

Наведено експериментальні дані про особливості будови, розвитку і функціонування рослинних і тваринних організмів, флору і фауну України, одержані науковцями НДІ фізіології імені Петра 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.

Приведены экспериментальные данные об особенностях строения, развития и функционирования растительных и животных организмов, полученные учеными НИИ физиологии имени Петра 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 students.

ВІДПОВІДАЛЬНИЙ РЕДАКТОР	Л. І. Остапченко, д-р біол. наук, проф.
РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ	Є. О. Торгалло, канд. біол. наук (відп. секр.); С. Є. Вакал, канд. біол. наук (техн. секр.); О. В. Жолос, д-р біол. наук, проф.; Брайон Каленгхем, д-р мед. наук, проф. (м. Кембридж, Великобританія); Т. В. Берегова, д-р біол. наук, проф.; С. В. Пилипенко, д-р біол. наук, проф. (м. Полтава, Україна); М. Є. Дзержинський, д-р біол. наук, проф.; О. Я. Склярів, д-р мед. наук, проф. (м. Львів, Україна); Абенаволі Людовіко, д-р мед. наук (м. Катандзаро, Італія)
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" 14.05.18 (протокол № 9)
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 № 16052-4524 Р 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 входить до наукометричних баз:	Index Copernicus (з 2012 р. ICV-2017 = 56,09), 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.).

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 students.

Наведено експериментальні дані про особливості будови, розвитку і функціонування рослинних і тваринних організмів, флору і фауну України, одержані науковцями НДІ фізіології імені Петра 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.

Приведены экспериментальные данные об особенностях строения, развития и функционирования растительных и животных организмов, полученные учеными НИИ физиологии имени Петра 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.

EDITOR-IN-CHIEF	Ostapchenko Lyudmila, D. Sci., Prof.
EDITORIAL BOARD	Torgalo Elizabeth, PhD; Sergii Vakal, PhD (Tech. Editor); Alexander Zholos, D. Sci., Prof.; Brian Callingham, D. Sci., M. D., Prof. (Cambridge, United Kingdom); Tetiana Berehova, D. Sci., Prof.; Sergey Pilipenko, D. Sci., Prof. (Poltava, Ukraine); Mykola Dzerzhynskyi, D. Sci., Prof.; Olexandr Sklyarov, D. Sci., M. D., Prof. (Lviv, Ukraine); Ludovico Abenavoli, PhD, M. D., Assoc. Prof. (Catanzaro, Italy)
Editorial address	ESC "Institute of Biology and Medicine", 2a, acad. Glushkov av., Kyiv, 03127, Ukrainian ☎ (38044) 521 35 98; www.biovestnik.com; bulletin.vestnik@gmail.com
Approved by	The Academic Council of the ESC "Institute of Biology and Medicine" 13.11.17 (Protokol № 4)
Attested by	Higher Attestation Commission of Ukraine HAC Presidio decree № 1-05/3 (April 14th, 2010)
Registered by	Ministry of Justice of Ukraine. Registration certificate KV № 16053-4524 ПП (November 9th, 2009)
Founded and Published	Kyiv National Taras Shevchenko University, Kiev, Ukraine, Publishing and Printing Center "Kiev University". The certificate is entered in the State Register DK № 1103 (October 31th 2002)
Publisher's Address	Publishing and Printing Centre "Kiev University" (off. 43), 14 Taras Shevchenko av., Kiyv, 01601, Ukraine ☎ (38044) 239 31 72, 239 32 22; Fax: 239 31 28
Abstracted and Indexed:	Index Copernicus (of 2012. ICV-2017 = 56,09), Cite Factor (of 2014), Research Bible (of 2013). Academic Keys (of 2013), DOAJ (of 2013), EBSCO.EJS (of 2012), Free medical journals list of Geneva Foundation for Medical Education and Research (of 2014); HINARI (of 2013 of); Medical Journals Links (of 2013); OAJI (of 2012); The Knowledge Network (of 2014); Ulrich's Periodicals Directory (of 2012); WorldCat (of 2013); E-Library.ru (of 2014).

ЗМІСТ

Арефех Амірі., Берегова Т., Нікітіна Н., Степанова Л. Вплив нанокристалічного церію на ранозагоюючий процес у щурів.....	6
Макаренко М., Ворона Р., Сокол І., Берестовий В., Говсєєв Д., Погрібна А., Корнелюк О., Гром М. Дослідження рівнів автоантитіл класів IgG та IgM до бактеріального аналога Hsp60, Тирозил-тРНК синтетази та її окремих доменів у жінок із фіброміомою матки.....	12
Дмитренко І., Дягіль І., Мінченко Ж., Мартіна З., Федоренко В., Шляхтиченко Т., Шолойко В., Дмитренко О. Прогностичні фактори відповіді на терапію інгібіторами тирозинкіназ в українській когорті пацієнтів із хронічною мієлоїдною лейкемією	17
Климець Г., Іскра Р. Вплив цитрату ванадію на активність лактатдегідрогенази в еритроцитах та тканинах щурів з експериментальним діабетом	24
Федорчук С., Лисенко О., Романюк В. Нейродинамічні властивості та психологічні характеристики спортсменок високої кваліфікації з різним стажем спортивного тренування	27
Негеля А., Нікуліна В., Сенчило Н., Торгалю Є., Гарманчук Л. Адгезія, міграція та лактатдегідрогеназна активність клітин раку молочної залози за умов активації TLR-лігандом тейхоевою кислотою.....	31
Драницина А., Блохіна О., Короткий О., Дворщенко К., Остапченко Л. Експресія гена PTGS2 у клітинах хрящової тканини колінного суглоба щурів за умов остеоартрозу та при введенні біологічно-активних речовин.....	36
Колосова О., Халявка Т. Скоротливі та релаксаційні характеристики м'язів у висококваліфікованих спортсменів-фрістайлістів.....	42
Черних М., Зима І. Вплив поточного контексту, створеного сприйняттям емоційно забарвлених виразів облич, на таргетне пред'явлення нейтральних зорових образів.....	46

СОДЕРЖАНИЕ

Арефех Амири., Береговая Т., Никитина Н., Степанова Л. Влияние нанокристаллического диоксида церия на ранозаживляющий процесс у крыс	6
Макаренко М., Ворона Р., Сокол И., Берестовой В., Говсеев Д., Погребная А., Корнелюк А., Гром М. Исследование уровней аутоантител классов IgG и IgM к бактериальному аналогу Hsp60, Тирозил-тРНК синтетазе и ее отдельным доменам у женщин с фибромиомой матки	12
Дмитренко И., Дягиль И., Минченко Ж., Мартина З., Федоренко В., Шляхтиченко Т., Шолойко В., Дмитренко Е. Прогностические факторы ответа на терапию ингибиторами тирозинкиназ в украинской когорте пациентов с хронической миелоидной лейкемией	17
Климец Г., Искра Р. Влияние цитрата ванадия на активность лактатдегидрогеназы в эритроцитах крови и тканях крыс с экспериментальным диабетом	24
Федорчук С., Лисенко О., Романюк В. Нейродинамические свойства и психологические характеристики спортсменов высокой квалификации с различным стажем спортивной тренировки	27
Негеля А., Никулина В., Сенчило Н., Торгало Е., Гарманчук Л. Адгезия, миграция и лактатдегидрогеназная активность клеток рака молочной железы в условиях активации TLR-лигандом тейхоевой кислоты	31
Драницина А., Блохина О., Короткий А., Дворщенко Е., Остапченко Л. Экспрессия гена PTGS2 в клетках хрящевой ткани коленного сустава крыс при остеоартрозе и при введении биологически активных веществ	36
Колосова Е., Халявка Т. Сократительные и релаксационные характеристики мышц у высококвалифицированных спортсменов-фристайлистов	42
Черных М., Зима И. Влияние текущего контекста, созданного восприятием эмоционально окрашенных выражений лиц, на таргетное предъявление нейтральных зрительных образов	46

CONTENTS

Arefeh Amiri, Beregova T., Nikitina N., Stepanova L. The influence of cerium oxide nanocrystal (nanoceria) on full-thickness wound healing process in rats	6
Makarenko M., Vorona R., Sokol I., Berestoviy V., Govsieiev D., Pogribna A., Kornelyuk A., Grom M. The investigation of levels of IgG and IgM autoantibodies against bacterial analog of Hsp60, Tyrosyl-tRNA synthetase, and its separated domains in sera of women with uterine leiomyoma	12
Dmytrenko I., Dyagil I., Minchenko Zh., Martina Z., Fedorenko V., Shlyakhtychenko T., Sholoyko V., Dmytrenko O. Prognostic factors of the tyrosinkinase inhibitors therapy response in Ukrainian cohort of patients with chronic myeloid leukemia	17
Klymets H., Iskra R. Influence of vanadium citrate on lactatdegidrogenase activity in bloody erythrocytes and tissues of rats with experimental diabetes	24
Fedorchuk S., Lusenko O., Romanyuk V. Neurodynamic properties and psychological characteristics of high qualification sportships with different sports trainings	27
Nehelia A., Nikulina V., Senchylo N., Torgolo Ie., Garmanchuk L. Adhesive, migration and lactate dehydrogenase activity in breast cancer cells under TLR-lagand teichoic acid	31
Dranitsina A., Blohina O., Korotkiy O., Dvorshchenko K., Ostapchenko L. Expression of PTGS2 gene in rat knee cartilage cells under conditions of osteoarthritis and with administration of biologically active substances	36
Kolosova O., Khalyavka T. Muscle contractile and relaxation indices in qualified freestyle athletes	42
Chernykh M., Zyma I. Influence of the current context created by the perception of emotional facial expressions on the target presentation of neutral visual images	46

THE INFLUENCE OF CERIUM OXIDE NANOCRYSTAL (NANOCERIA) ON FULL-THICKNESS WOUND HEALING PROCESS IN RATS

This work examines the effect of Cerium Dioxide Nanocrystal (Nanoceria) on healing process of full-thickness excisional wounds in rats. Rapid and effective wound healing requires a coordinated cellular response. Wound healing is a complex process in which the skin repairs itself after injury and replacing of devitalized and missing cellular structures, and tissue layers takes place. In the absence of underlying disease, almost every full-thickness wound will heal with minimal intervention; however, the process can be enhanced by judicious wound management and knowledge of wound healing principles and practices. Wound care encourages and speeds wound healing via cleaning and protection from re-injury or infection. Timing is important to wound healing. Critically, the timing of wound reepithelization can affect the outcome of the healing. Selection of an appropriate and efficient wound dressing material plays a key role. We have shown that a simple topical application of Nanoceria significantly reduces the timing of the healing process comparing to the untreated rats. In the present study, cerium oxide (CeO₂) nanoparticles were incorporated into Carbopol / gelatin films in order to develop a potential wound dressing material. The wound dressings were prepared by electrospinning. The film containing 0.05 % CeO₂ (dissolved in 0.5 % Carbopol) nanoparticles was chosen as the optimal dressing for the in vivo study on full-thickness excisional wounds of rats. The study showed that after 2 weeks the wounds treated with the CeO₂ nanoparticle-containing dressing achieved a significant closure to nearly 100 %. In the model of full-thickness skin wound, the complete wound closure in the control group of animals occurred on the 23.0 ± 0.8 day while in experimental group the time of full repair decreased by 13.0 % compared to the control and was equal to 20.0 ± 0.5 day. Thus, our results provide evidence supporting the possible applicability of CeO₂ nanoparticle-containing wound dressing for a successful wound treatment as it accelerates complete wound closure and reduced wound area in comparison with non-treated animals.

Key word: Cerium dioxide nanocrystal, full-thickness Wound.

Introduction. Wound healing is an innate process that re-establishes the integrity of skin as quickly as possible. Renovation of the skin is crucial due to the skins significance in survival through the prevention of infection, fluid loss and other vital functions [1]. Wound repair in adult skin begins with an acute inflammatory phase and ends with the formation of a permanent scar. In contrast, early gestation fetal wounds (first and second trimester) heal in a near perfect fashion, rapidly and without the production of a scar [1, 2]. Often there are also obstacles of scar-degenerative origin in the area of wound – hypertrophic and keloid scars; scar restrictions (contractions) of movements scar hernia and diastase on the basis of muscle atrophy, sores and rarely – tumours [2, 3]. Despite the great progress in dressings invention, wound treatment stays a serious problem of regenerative medicine [4]. One of the main requirements to wound dressing is the establishment and preservation of the ideal conditions for potent healing. Modern fashions in the technologies of local treatment are based mainly on the headway and evolution of cell medicine. However, because of high biological activity of prospective products, it is vital to study their effects on wound reformation. For example, the biomedical application of cerium oxide nanoparticles (nanoceria) is a focal point of research for a few years, Cerium Dioxide (Nanoceria) seems to be a promising tool due to its ability to regulate redox processes in biological tissues.

Depending on the size of the nanoparticles, Nanoceria displays oxidative and reductive properties, which is paralleled by changes in its toxicity [5]. The neuro- and radio-protective effects of Nanoceria are described [6–8]. Cerium salts are utilized in the treatment of burn wounds [9].

The antioxidant property of cerium oxide nanoparticles (Nanoceria) has been investigated recently; nanoceria were noticed to salvage superoxide radical [10, 11], hydrogen peroxide [12], hydroxyl radical [13] and nitric oxide radical [14]. Therefore, Nanoceria have been tested in biological systems wherein they can defend tissues against radiation induced damage [15], defend against laser-induced retinal damage [16], increase life span of photoreceptor cells [17], decrease spinal injury [18], reduce chronic inflammation [19] and elevate angiogenesis [20].

Cerium is a rare earth element that exhibits the ability to change in the oxidation state of Ce between Ce³⁺ and Ce⁴⁺ depending on the oxygen partial pressure in the surrounding atmosphere [21]. Such mixed valence state enables CeO₂ nanoparticles (CeO₂NPs) to have excellent catalytic activities and to act as free radical scavengers [22] (Fig. 1)

For example, hydroxyl radical which is one of the strongest oxidants and most biologically active free radicals and nitric oxide radical that is gaseous free radical that exhibits multifaceted biological effects, both beneficial and damaging.

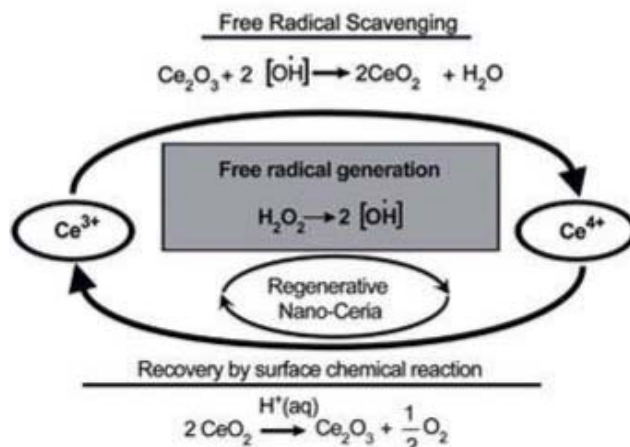


Fig. 1. Schematic representation of the proposed regenerative properties of CeONP and probable mechanism of the CeONP free-radical scavenging property and autocatalytic behaviour. (Copyright 2007, Elsevier)

Another important advantage CeO₂NPs can hydrolyze phosphate ester bonds which is crucial for regulation of protein activity, for energy transfer molecules, and for the stability of DNA and RNA. Recent studies suggested that CeONP are able to hydrolyze phosphate ester bonds of many biologically relevant molecules [23–25] Qian and colleagues [24] found that CeONP could effectively intercede the dephosphorylation of phosphopeptides.

Cerium exists in two oxidation states, i. e., +3 and +4, which provides it to represent two different oxide forms CeO₂ (Ce⁴⁺) or Ce₂O₃ (Ce³⁺) depending on the environment [23] (Fig. 2). The nanoparticle form of cerium oxide has been found to be highly superior to cerium oxide. The reduction / oxidation switch is responsible for observed antioxidant properties of nanoceria by giving rise to a number of oxygen vacancies on the surface of nanoparticles [24].

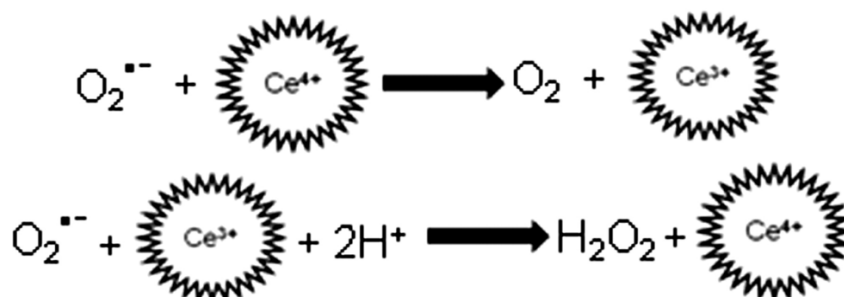


Fig. 2. Redox cycles between Ce³⁺ and Ce⁴⁺ oxidation states

Attendance of these oxygen vacancies makes nanoceria an intense antioxidant for therapeutic applications. It has superoxide dismutase (SOD) (Fig. 3), [25] and

catalase-mimetic activity (Fig. 4) [26] and also has capacity to salvage nitric oxide radicals [27].

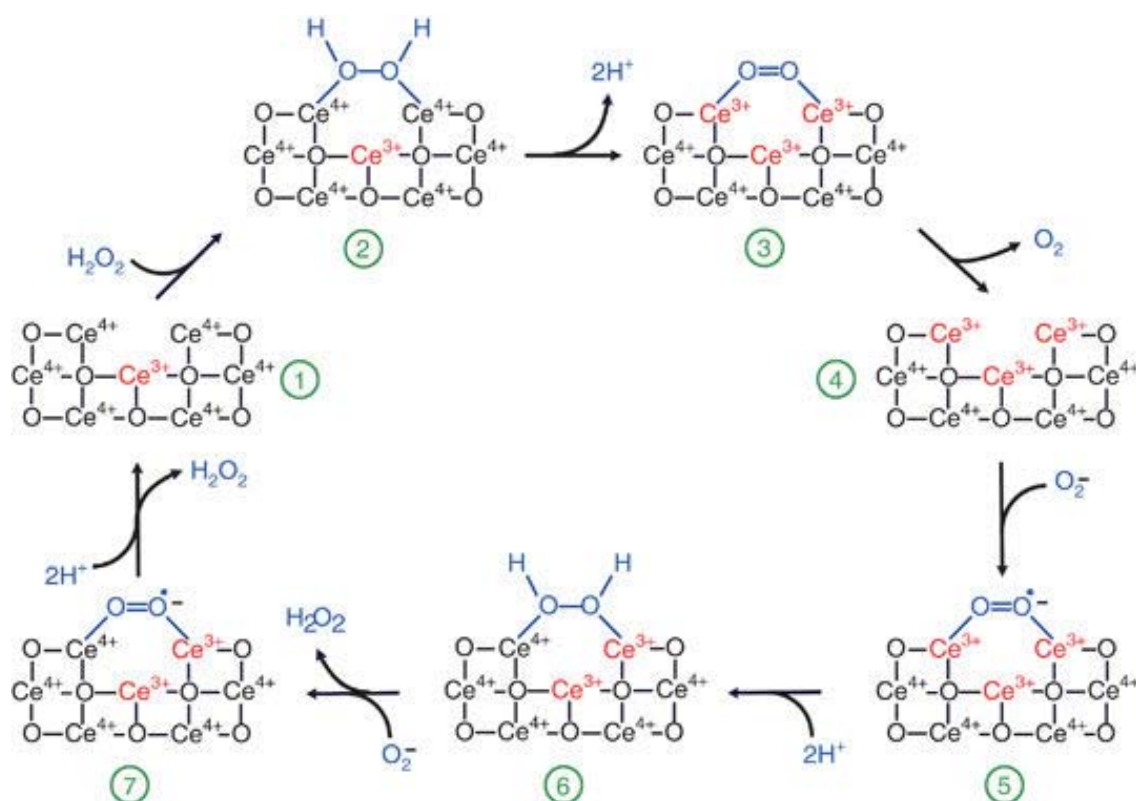


Fig. 3. A model of the reaction mechanism for the dismutation of superoxide by cerium oxide nanoparticle (CeONP) [31].
(Copyright 2011, Royal Society of Chemistry)

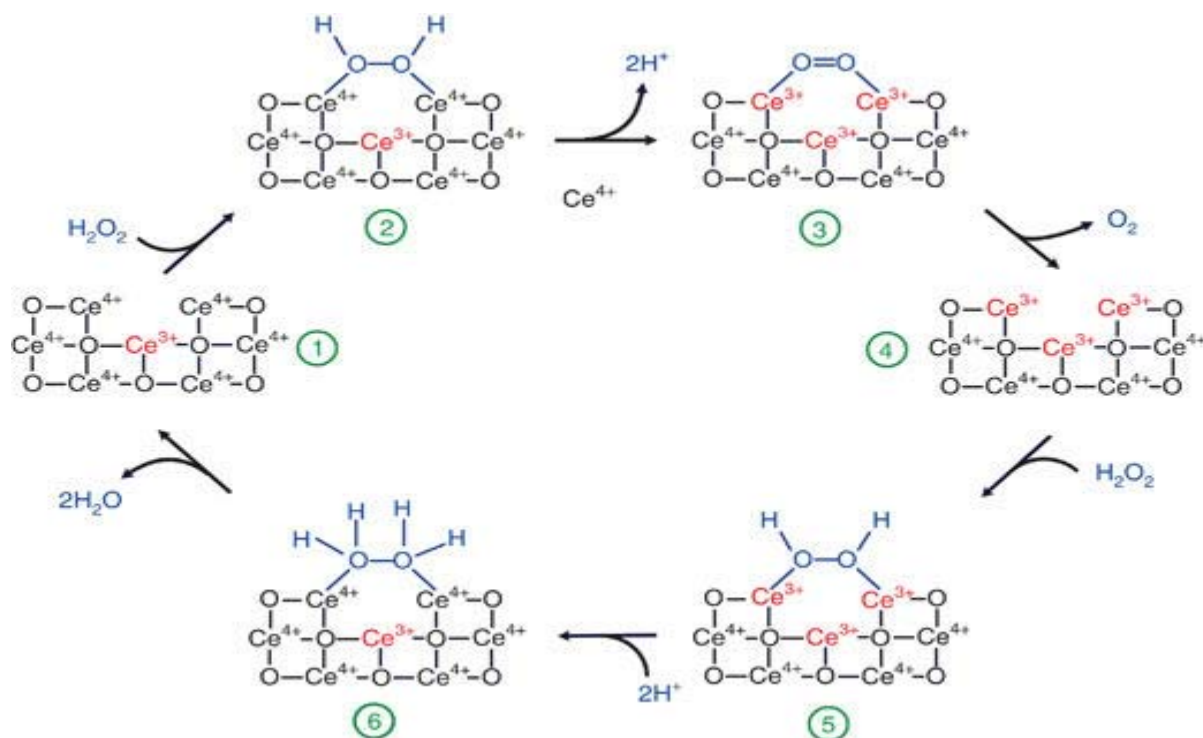


Fig. 4. A model of the reaction mechanism for the complete dismutation of hydrogen peroxide by cerium oxide nanoparticle (CeONP).
(Copyright 2011, Royal Society of Chemistry)

Nanocerium has earned attention as catalytic antioxidant in biological model systems. Due to its unbeatable ROS scavenging properties is considered as one of the important candidates for treatment of conditions involving oxidative stress. Apart from this, Nanocerium also has its impact in cancer therapy by enforcing cytotoxicity [28] and sensitizing the cancer cells to radiation therapy without modifying normal healthy cells [29]. In addition, it also has anti-angiogenic property [30].

The management of full-thickness wounds is a common part of dermatologic practice. The healing of these wounds is a complicated, interconnected series of events that eventually lead to both a structurally and functionally decent result. The initiation of this process is indicated by a haemorrhage to the tissues, whether due to an unintended trauma, such as abrasions, excoriations, blisters, burns, hypothermic injuries, ischemia, or numerous other etiologies, or a defect that has been planned, such as a surgical incision or piercing. The sequence that follows leads to the repair and restoration of the site in question. Generally, there are 4 stages seen in the healing of any wound: haemostasis, inflammation, proliferation or granulation, and matrix formation or remodelling [31–34]. A comprehension of this process permits the clinician to optimize wound healing. These stages are not presently chronologically exclusive, but rather a dynamic and integrated coordination of specific processes. These stages can be allowed to proceed ongoing, as in healing by secondary intention, or influenced by primary closure with sutures, staples, or adhesives; application of medications or topical products; or placement of various traditional or synthetic dressings. As healing proceeds, tensile strength of the wound ameliorates. In human cases, Wounds have minimal strength during the first week or so of healing, approximately 30 % to 50 % in 4 to 6 weeks and 60 % at around 6 months. Tensile strength slowly increases after this point but usually only reaches a maximum of 80 % that of normal, undisrupted skin. The duration and percentages noted are general guidelines for

the time frame and performance expected based on prior studies. Variation does occur due to the type, location, and size of the defect. Clearly, the less invasive, more superficial insults will conclude the entire process more rapidly.

In this study, we seek the potential therapeutic effect of Nanocerium in an animal model of wound healing.

Materials and Methods

1. Preparation of Nanocerium solution

The wound dressings were put together by electrospinning. The film comprising 0.05 % CeO_2 (dissolved in 0.5 % Carbopol) nanoparticles was elected as the optimal dressing for the in vivo study on full-thickness excisional wounds of rats. A peerless feature of these nanocrystals is that they can be applied multiple times: over weeks, cerium (IV) rich particles leisurely turn over to their initial cerium (III) content. In approximately all cases, the particles subsist colloiddally firm (e. g., non-aggregated) and could be applied multiple times.

2. Animal Model

Research was administered on white laboratory male rats weighing 200–250 g, which were divided into three groups. Before the experiment, the rats were retained in quarantine and were marked by given them notches on ears. Before performing the full-thickness wound model, animals were anesthetized by sodium thiopental (Biochemie GmbH/Austria), at a dosage of 50 mg/kg. The animals of experimental group were treated with "Nanocerium-Gel" which contains 0.05 % CeO_2 (dissolved in 0.5 % Carbopol) nanoparticles for wound dressing. In the intact series wound healing happened without drug and only Carbopol while the control group was remained untreated.

3. Skin Wound Model

Before the experiment epilation was carried out on the back area after anesthetizing rats and one full-thickness wounds of 1x1 cm² was formed in the skin of each rat using surgical scalpel and forceps. Rats were treated with

Nanoceria solution applied directly to the wound site once daily until healing.

Statistical analysis of data was carried out by the "Statistica 8.0" software package. Shapiro-Wilk's W criterion was used for the investigation of the data distribution type. *Post-hoc* analysis included Student's t-test for parametric data.

Results and Discussion. On 3rd, 6th, 9th, 14th day and after complete wound closure 8 rats from each group were sacrificed, photos were made, and exact area of the wound was measured.

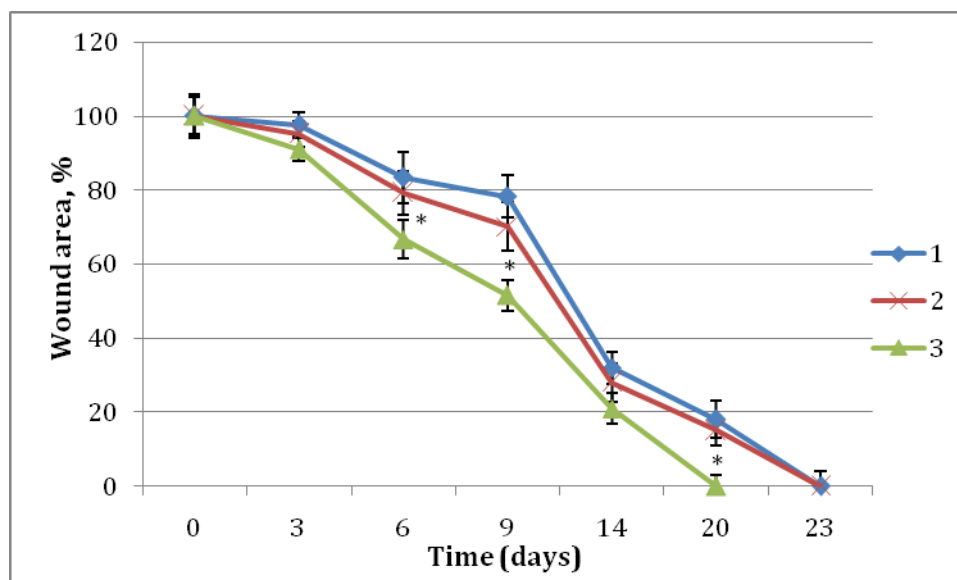


Fig. 5. The surface of full-thickness wound area with Nanoceria application (% of the original size), $M \pm m$ (n=8 in each group of animals)

1 – Group without drug;
2 – Group without drug and only Carbopol;
3 – Group treated with Nanoceria

* – $p < 0.05$ compared with control group

In the model of full-thickness skin wound, it was shown that complete wound closure in the control group of animals occurred on the 23.0 ± 0.8 day (Fig. 5, 6). In experimental group, the time of full repair decreased by 13.0 % ($p < 0.05$) compared to the control and was equal to 20.0 ± 0.5 day. On 6th, 9th and 20th day of experiment Cerium dioxide treated wounds areas were by 20.1 % ($p < 0.05$), 19.8 % ($p < 0.05$) and by 34.0 % ($p < 0.05$) accordance decreased in comparison with control. In other time periods, the rate of healing was approximately the same. On the 9th and 14th day of the experiment in the above mentioned group healing was more intense compared with the control group.

As mentioned above Cerium oxide nanoparticles can scavenge superoxide with a catalytic rate greater than cellular superoxide dismutase [35]. It was recently reported that Nanoceria enter cultured keratinocytes via clathrin-mediated endocytosis and are then distributed to multiple subcellular compartments including the cytoplasm, mitochondria, endoplasmic reticulum and nucleus [36]. We, therefore, specified whether Nanoceria applies biological actions on cells involved in wound healing.

According to recent studies, it was demonstrated that engineered Nanoceria with 3–5 nm size at low micromolar concentrations enhances the proliferation and migration of keratinocytes and fibroblasts, and accelerate the migration and tube-forming ability of vascular endothelial cells [37]. Daily topical application of Nanoceria to full-thickness dermal wounds catalyzed healing without modifying the nor-

mal cellular remodeling involved in the healing process. Previous studies demonstrated that Nanoceria possess superoxide dismutase activity [38] and can prevent the generation of nitric oxide and inflammatory cytokines in cultured macrophages [39]. Consistent with an antioxidant mechanism of action, we found that Nanoceria attenuated the accumulation of HNE- and nitrotyrosine- modified proteins in the wound tissue [37]. A previous study shown a mechanism by which Nanoceria can boost angiogenesis; Nanoceria exerts a controlling influence to the intracellular oxygen environment so as to stabilize hypoxia inducing factor 1a and increase the production of VEGF [20].

Additional data in the subsequent study suggest that the surface reactivity of CNPs and facile oxygen transport elevate angiogenesis. We found that Nanoceria treatment achieves the reduction in markers of oxidative stress in cultured vascular endothelial cells. The available data, therefore, indicates Nanoceria boosts angiogenesis by a mechanism inducing decreased levels of ROS including nitric oxide. We assume that Nanoceria decreases the oxidative stress in wounded region and defends regenerative tissue [5]. Basically, nanoceria due to its dual oxidation state could promote wound healing activity when compared to standard drug by salvaging ROS from the location of injury and protecting the native tissue by helping in producing high amount of collagen which is a marker for effective wound healing [10, 11].

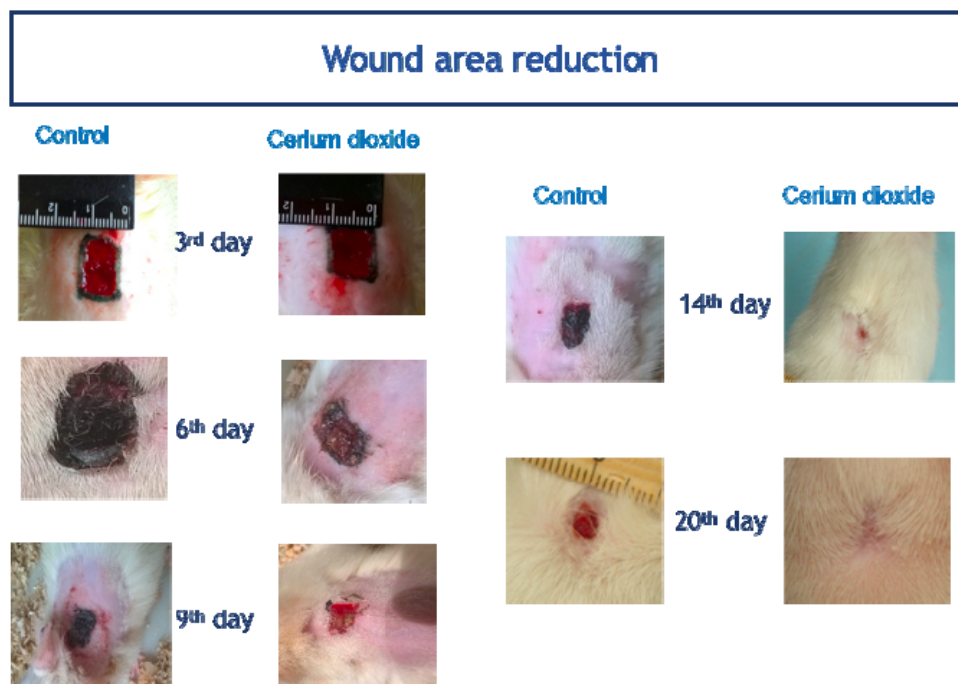


Fig. 6. Appearance of the full-thickness wound surface from control and experimental groups at the different time points (days) of experiment

It was recently suggested that Nanoceria can be administered intravascularly to rat with no apparent side effects, and with a therapeutic advantage to photoreceptor cells in a rat model of genetically determined retinal degeneration [40]. The capability of topical application of Nanoceria to enhance wound healing in an animal model brings up a principium to expand this technology for use in humans affected by traumatic injury, diabetes, and burns.

Conclusion. In summary, we have shown that a simple topical application of water soluble Nanoceria speeds up the healing of full-thickness dermal wounds in a rat model. This study indicates the therapeutic potential of Nanoceria particles for topical treatment of wounds and need for further research to establish the mechanisms of the obtained results. According to the results, we consider nanocrystal Cerium dioxide as a perspective drug for further investigations.

References

1. Penn J. The role of the TGF- β family in wound healing, burns and scarring: a review / J. Penn, A. Grobbelaar, K. Rolfe // *Int. J. Burn Trauma*, 2012. – Vol. 2(1). – P. 18–28.
2. The impact of cyclooxygenase-2 mediated inflammation on scarless fetal wound healing / T. Wilgus, V. Bergdall, Tober K. et al. // *American J. of Pathology*, 2004. – Vol. 165(3). – P. 753–761.
3. *Contractures in burn injury: defining the problem* / J. Schneider, R. Holvanahalli, P. Helm et al. // *J. Burn Care Res*-2006. – Vol. 27. – P. 508–514.
4. *Alekseev A. Local Conservative Therapy of Burns* / A. Alekseev, A. Bobrovnikov. – Moscow, 2015. – P. 207 (Russian)
5. Direct monitoring of the ROS-cerium dioxide nanoparticles interaction in living cells / N. Zholobak, A. Shcherbakov, E. Vitukova et al. // *RSC Adv*. 2014. – 51(4):– P. 703–710. doi: 10.1039 / C4RA08292C.
6. *Nanocrystalline Ceria: Properties, Production, Application* / V. Ivanov, A. Shcherbakov, A. Baranchikov, V. Kozik. – Tomsk, 2013 (Russian).
7. *Advances and Prospects of Using Nanocrystalline Ceria in Cancer Theranostics* / A. Shcherbakov, N. Zholobak, N. Spivak, V. Ivanov // *Russ. J. Inorg. Chem.*, 2014. – Vol. 59(13). – P. 1556–1575.
8. *Panthenol-stabilized cerium dioxide nanoparticles for cosmetic formulations against ROS-induced and UV-induced damage* / N. Zholobak, A. Shcherbakov, A. Bogorad-Kobelska et al. // *J. Photochem. Photobiol. B*, 2014. – Vol. 130. – P. 102–108. doi: 10.1016 / j.jphotobiol.2013.10.015.
9. *Allgöwer M. Burning the largest immune organ* / M. Allgöwer, G. Schoenenberger, B. Sparkes // *Burns*, 1995. – Vol. 21 Suppl. 1. – P. 7–47.
10. *Redox-active radical scavenging nanomaterials* / A. Karakoti, S. Singh, J. Dowling et al. // *Chem. Soc. Rev.*, 2010. – P. 4422–32.
11. *Superoxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles* / C. Korsvik, S. Patil, S. Seal, W. Self // *Chem. Commun.*, 2007. – P. 1056–8.

12. *Nanoceria exhibit redox state-dependent catalase mimetic activity* / T. Pirmohamed, J. Dowling, S. Singh et al. // *Chem. Commun.*, 2010. – P. 2736–38.
13. *Direct evidence for hydroxyl radical scavenging activity of cerium oxide nanoparticles* / Y. Xue, Q. Luan, D. Yang et al. // *J. Phys. Chem. C*, 2011. – P. 115.
14. *Cerium oxide nanoparticles scavenge nitric oxide radical ([radical dot] NO)* / J. Dowling, T. Dosani, A. Kumar et al. // *Chem. Commun.*, 2012. – P. 48.
15. *Vacancy engineered ceria nano-structures for protection from radiation-induced cellular damage* / E. Tarnuzzer, J. Colon, S. Patil, S. Seal // *Nano Lett.*, 2005. – P. 2573–7.
16. *Rare earth nanoparticles prevent retinal degeneration induced by intracellular peroxides* / J. Chen, S. Patil, S. Seal, J. McGinnis // *Nat Nanotechnol.*, 2006. – P. 142–50.
17. *Sustained protection against photoreceptor degeneration in tubby rat by intravitreal injection of nanoceria* / X. Cai, S. Sezate, S. Seal, J. McGinnis // *Biomaterials*, 2012. – P. 8771–81.
18. *Auto-catalytic ceria nanoparticles offer neuroprotection to adult rat spinal cord neurons* / M. Das, S. Patil, N. Bhargava et al. // *Biomaterials*, 2007.
19. *Anti-inflammatory properties of cerium oxide nanoparticles* / S. Hirst, A. Karakoti, R. Tyler et al. // *Small*, 2009. – P. 5:2848e56.
20. *The induction of angiogenesis by cerium oxide nanoparticles through the modulation of oxygen in intracellular environments* / S. Das, S. Singh, J. Dowling et al. // *Biomaterials*, 2012. – P. 33:7746e55.
21. *Size dependency variation in lattice parameter and valency states in nanocrystalline cerium oxide* / S. Deshpande, S. Patil, S. Kuchibhatla, S. Seal // *Appl. Phys. Lett.*, 2005. – Vol. 87. – P. 133113.
22. *Cerium oxide nanoparticles: Applications and prospects in nanomedicine* / S. Das, J. Dowling, K. Klump et al. // *Nanomedicine*, 2013. – Vol. 8(9). – P. 1483–1508.
23. *Buettner G. Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide* / G. Buettner // *Anticancer Agent Med. Chem.*, 2011. – Vol. 11. – P. 341–346.
24. *An efficient method for dephosphorylation of phosphopeptides by cerium oxide* / F. Tan, Y. Zhang, J. Wang et al. // *J. Mass Spectrom.*, 2008. – Vol. 43. – P. 628–632.
25. *Cerium oxide nanoparticle-mediated self-assembly of hybrid supramolecular hydrogels* / A. Patil, R. Kumar, N. Barron, S. Mann // *Chem. Commun.*, 2012. – Vol. 48. – P. 7934–7936.
26. *Nanoceria exhibit redox state-dependent catalase mimetic activity* / T. Pirmohamed, J. Dowling, S. Singh et al. // *Chem. Commun.*, 2010. – Vol. 46. – P. 2736–2738.
27. *Cerium oxide nanoparticles scavenge nitric oxide radical ((NO)-N-center dot)* / J. Dowling, T. Dosani, A. Kumar et al. // *Chem. Commun.*, 2012. – Vol. 48. – P. 4896–4898.
28. *Surface-charge-dependent cell localization and cytotoxicity of cerium oxide nanoparticles* / A. Asati, S. Santra, C. Kaittanis, J. Perez // *ACS nano*, 2010. – Vol. 4(9). – P. 5321–5331.
29. *Vacancy engineered ceria nanostructures for protection from radiation-induced cellular damage* / R. Tarnuzzer, J. Colon, S. Patil, S. Seal // *Nano Lett.*, 2005. – Vol. 5(12). – P. 2573–2577.

30. *Nanoceria*: a rare-earth nanoparticle as a novel anti-angiogenic therapeutic agent in ovarian cancer/ S. Giri, A. Karakoti, R. Graham et al. et al. // PLoS One, (2013). – Vol. 8(1). – P. e54578.
 31. Kanegaye J. A rational approach to the outpatient management of lacerations in pediatric patients / J. Kanegaye // Curr. Probl. Pediatr., 1998. – Vol. 28. – P. 205.
 32. *Textbook of pediatric emergency procedures* / R. McNamara, J. Loisel, F. Henretig, C. King // Laceration repair. In: Baltimore7 Williams and Wilkins, 1997. – P. 1141.
 33. Piacquadio D. Synthetic surgical dressings. In: Wheeland RG, editors / D. Piacquadio // Cutaneous surgery. WB Saunders Company, 1994. P. 122–36.
 34. Glat P. Wound healing. In: Aston SJ, Beasley RW, Thorne CH, editors / P. Glat, M. Longaker // Grabb and Smith's plastic surgery. 5th ed. Philadelphia7 Lippencott, 1997. – P. 3–12.
 35. Superoxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles / C. Korsvik, S. Patil, S. Seal, W. Self // Chem. Commun., 2007. – P. 1056e8.
 36. Unveiling the mechanism of uptake and sub-cellular distribution of cerium oxide nanoparticles / S. Singh, A. Kumar, A. Karakoti, S. Seal, W. Self // Mol. Bio-syst, 2010. – Vol. 6. – P. 1813e20.
 37. Effects of cerium oxide nanoparticles on the growth of keratinocytes, fibroblasts and vascular endothelial cells in cutaneous wound healing / S. Chigurupati et al // Biomaterials, 2012.
 38. The role of cerium redox state in the SOD mimetic activity of nanoceria / E. Heckert, A. Karakoti, S. Seal, W. Self // Biomaterials, 2008. – Vol. 29. – P. 2705e9.
 39. Anti-inflammatory properties of cerium oxide nanoparticles / S. Hirst, A. Karakoti, R. Tyler et al. // Small, 2009. – Vol. 5. – P. 2848e56.
 40. *Nanoceria* extend photoreceptor cell lifespan in tubby rat by modulation of apoptosis/survival signaling pathways / L. Kong, X. Cai, X. Zhou et al. // Neurobiol. Dis., 2011. – P. 514–23.
- References (Scopus)**
1. Penn J., Grobelaar A., Rolfe K. The role of the TGF- β family in wound healing, burns and scarring: a review. *Int J Burn Trauma* 2012; 2(1): 18-28.
 2. Wilgus T., Bergdall V., Tober K., Hill K., Mitra S., Flavahan N., Oberyszyn T. The impact of cyclooxygenase-2 mediated inflammation on scarless fetal wound healing. *American Journal of Pathology* 2004; 165(3): 753-761.
 3. Schneider J., Holvanahalli R., Helm P., Goldstein R., Kowalske K. Contractures in burn injury: defining the problem. *J Burn Care Res* 2006; 27: 508-514.
 4. Alekseev A., Bobrovnikov A. Local Conservative Therapy of Burns. Moscow, 2015: 207 (Russian)
 5. Zholobak N., Shcherbakov A., Vitukova E., Yegorova A., Scripinets Yu., Leonenko I., Baranchikov A., Antonovich V., Ivanov V. Direct monitoring of the ROS-cerium dioxide nanoparticles interaction in living cells. *RSC Adv.* 2014;(4):51,703-51,710. doi: 10.1039/C4RA08292C.
 6. Ivanov V., Shcherbakov A., Baranchikov A., Kozik V. Nanocrystalline Ceria: Properties, Production, Application. Toms, 2013. (Russian).
 7. Shcherbakov A., Zholobak N., Spivak N., Ivanov V. Advances and Prospects of Using Nanocrystalline Ceria in Cancer Theranostics. *Russ. J. Inorg. Chem.* 2014;59(13):1556-1575.
 8. Zholobak N., Shcherbakov A., Bogorad-Kobelska A., Ivanova O., Baranchikov A., Spivak N., Ivanov V. Panthenol-stabilized cerium dioxide nanoparticles for cosmeceutic formulations against ROS-induced and UV-induced damage. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2014;130:102-108. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2013.10.015.
 9. Allgöwer M., Schoenenberger G., Sparkes B. Burning the largest immune organ. *Burns.* 1995;21 Suppl. 1: 7-47.
 10. Karakoti A., Singh S., Dowding J., Seal S., Self W. Redox-active radical scavenging nanomaterials. *Chem Soc Rev* 2010: 4422-32.
 11. Korsvik C., Patil S., Seal S., Self W. Superoxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles. *Chem Commun* 2007: 1056-8.
 12. Pirmohamed T., Dowding J., Singh S., Wasserman B., Heckert E., Karakoti A. et al. Nanoceria exhibit redox state-dependent catalase mimetic activity. *Chem Commun* 2010:2736-38.
 13. Xue Y., Luan Q., Yang D., Yao X., Zhou K. Direct evidence for hydroxyl radical scavenging activity of cerium oxide nanoparticles. *J Phys Chem C* 2011;115.
 14. Dowding J., Dosani T., Kumar A., Seal S., Self W. Cerium oxide nanoparticles scavenge nitric oxide radical ([radical dot]NO). *Chem Commun* 2012: 48.
 15. Tarnuzzer R., Colon J., Patil S., Seal S. Vacancy engineered ceria nano- structures for protection from radiation-induced cellular damage. *Nano Lett* 2005:2573-7.
 16. Chen J., Patil S., Seal S., McGinnis J. Rare earth nanoparticles prevent retinal degeneration induced by intracellular peroxides. *Nat Nanotechnol* 2006:142-50.
 17. Cai X., Sezate S., Seal S., McGinnis J. Sustained protection against photoreceptor degeneration in tubby rat by intravitreal injection of nanoceria. *Biomaterials* 2012: 8771-81.
 18. Das M., Patil S., Bhargava N., Kang J., Riedel L., Seal S. et al. Auto-catalytic ceria nanoparticles offer neuroprotection to adult rat spinal cord neurons. *Biomaterials* 2007:
 19. Hirst S., Karakoti A., Tyler R., Sriranganathan N., Seal S., Reilly C. Anti-inflammatory properties of cerium oxide nanoparticles. *Small* 2009;5:2848e56.
 20. Das S., Singh S., Dowding J., Oommen S., Kumar A., Sayle T. et al. The induction of angiogenesis by cerium oxide nanoparticles through the modulation of oxygen in intracellular environments. *Biomaterials* 2012;33:7746e55.
 21. Deshpande S., Patil S., Kuchibhatla S., Seal S. Size dependency variation in lattice parameter and valency states in nanocrystalline cerium oxide. *Appl. Phys. Lett.* 87 (2005) 133113.
 22. Das S., Dowling J., Klump K., McGinnis J., Self W., Seal S. Cerium oxide nanoparticles: Applications and prospects in nanomedicine, *Nanomedicine* 8(9) (2013) 1483-1508
 23. Buettner G. Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide. *Anticancer Agent Med. Chem.* 11, 341–346 (2011).
 24. Tan F., Zhang Y., Wang J., Wei J., Cai Y., Qian X. H. An efficient method for dephosphorylation of phosphopeptides by cerium oxide. *J. Mass Spectrom.* 43,628–632 (2008).
 25. Patil A., Kumar R., Barron N., Mann S. Cerium oxide nanoparticle-mediated self-assembly of hybrid supramolecular hydrogels. *Chem. Commun.* 48,7934–7936 (2012).
 26. Pirmohamed T., Dowding J., Singh S., Wasserman B., Heckert E., Karakoti A., King J., Seal S., Self W. Nanoceria exhibit redox state-dependent catalase mimetic activity. *Chem. Commun.* 46, 2736–2738 (2010).
 27. Dowding J., Dosani T., Kumar A., Seal S., Self, W. Cerium oxide nanoparticles scavenge nitric oxide radical ((NO)-N-center dot). *Chem. Commun.* 48, 4896–4898 (2012).
 28. Asati A., Santra S., Kaftanis C., Perez J. Surface-charge-dependent cell localization and cytotoxicity of cerium oxide nanoparticles, *ACS nano* 4 (9) (2010) 5321–5331.
 29. Tarnuzzer R., Colon J., Patil S., Seal S. Vacancy engineered ceria nanostructures for protection from radiation-induced cellular damage, *Nano Lett.* 5 (12) (2005) 2573–2577.
 30. Giri S., Karakoti A., Graham R., Maguire J., Reilly C., Seal S., Rattan R., Shridhar V. Nanoceria: a rare-earth nanoparticle as a novel anti-angiogenic therapeutic agent in ovarian cancer, *PLoS One* 8 (1) (2013) e54578.
 31. Kanegaye JT. A rational approach to the outpatient management of lacerations in pediatric patients. *Curr Probl Pediatr* 1998; 28:205.
 32. McNamara R., Loisel F. Laceration repair. In: Henretig F, King C, editors. *Textbook of pediatric emergency procedures*. Baltimore7 Williams and Wilkins; 1997. p. 1141.
 33. Piacquadio D. Synthetic surgical dressings. In: Wheeland RG, editor. *Cutaneous surgery*. WB Saunders Company, 1994. p. 122 – 36.
 34. Glat P., Longaker M. Wound healing. In: Aston SJ, Beasley RW, Thorne CH, editors. *Grabb and Smith's plastic surgery*. 5th ed. Philadelphia7 Lippencott; 1997. p. 3 – 12.
 35. Korsvik C., Patil S., Seal S., Self W. Superoxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles. *Chem Commun* 2007: 1056e8.
 36. Singh S., Kumar A., Karakoti A., Seal S., Self W. Unveiling the mechanism of uptake and sub-cellular distribution of cerium oxide nanoparticles. *Mol Bio-syst* 2010;6:1813e20.
 37. Chigurupati S. et al., Effects of cerium oxide nanoparticles on the growth of keratinocytes, fibroblasts and vascular endothelial cells in cutaneous wound healing. *Biomaterials* (2012).
 38. Heckert E., Karakoti A., Seal S., Self W. The role of cerium redox state in the SOD mimetic activity of nanoceria. *Biomaterials* 2008;29:2705e9.
 39. Hirst S., Karakoti A., Tyler R., Sriranganathan N., Seal S., Reilly C. Anti-inflammatory properties of cerium oxide nanoparticles. *Small* 2009;5:2848e56.
 40. Kong L., Cai X., Zhou X., Wong L., Karakoti A., Seal S. et al. Nanoceria extend photoreceptor cell lifespan in tubby rat by modulation of apoptosis / survival signaling pathways. *Neurobiol Dis* 2011:514-23.

Надійшла до редколегії 12.03.2018
Отримано виправлений варіант 17.04.2018
Підписано до друку 18.04.2018

Received in the editorial 12.03.2018
Received a revised version on 17.04.2018
Signed in the press on 18.04.2018

Арефех Амірі асп., Т. Берегова, д-р біол. наук,
Н. Нікітіна асп., Л. Степанова, канд. біол. наук,
ННЦ "Інститут біології та медицини",
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ВПЛИВ НАНОКРИСТАЛІЧНОГО ДІОКСИДУ ЦЕРІЮ НА РАНОЗАГОЮЮЧИЙ ПРОЦЕС У ЩУРІВ

Досліджено вплив нанокристалічного діоксиду церію (*Nanoceria*) на процес загоєння площинної рани у щурів. Швидко й ефективно загоєння ран вимагає скоординованої клітинної реакції, залучення фібробластів, кератиноцитів та ендотеліальних клітин судин (VECs), що стало основною причиною використання *Nanoceria* завдяки його багаторазовим вражаючим функціям (протизапальній, антиоксидантній, захист шкіри та клітин від ультрафіолетових променів – світло, онкотерапія тощо). Тваринам дослідної групи, починаючи з наступного дня після моделювання площинної рани, кожного дня впродовж усіх термінів спостереження наносили на ранову поверхню 0,05 % CeO_2 (розчинений у 0,5 % карбополі) за допомогою металевого шпателя. Унікальною особливістю цих нанокристалів є те, що їх можна застосовувати кілька разів: протягом декількох тижнів збагачені церієм частки повільно повертаються до вихідного стану церію. Майже в усіх випадках частинки залишаються колоїдно стабільними (напру, не агреговані) і можуть застосовуватися декілька разів. Дослідження *in vivo* показують, що наночастинки *Nanoceria* для тканини щурів є непатогенними. Вражається, що наночастинки діоксиду церію добре поглинаються шкірою. Дослідження показали, що після 2 тижнів рани, оброблені нанокристалічним діоксидом церію, досягли значного загоєння приблизно до 100 %. Наші результати показали, що використання нанокристалічного діоксиду церію в лікуванні ран є успішним і перспективним для подальшого дослідження, оскільки прискорює повне загоєння рани та зменшує її ділянку порівняно з необробленими ділянками шкіри тварин.

Ключові слова: нанокристалічний діоксид церію, площинна рана.

Арефех Амири асп., Т. Береговая, д-р биол. наук,
Н. Никитина асп., Л. Степанова, канд. биол. наук,
УНЦ "Институт биологии и медицины",
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ВЛИЯНИЕ НАНОКРИСТАЛЛИЧЕСКОГО ДИОКСИДА ЦЕРИЯ НА РАНОЗАЖИВЛЯЮЩИЙ ПРОЦЕСС У КРЫС

В работе исследовано влияние нанокристаллического диоксида церия (*Nanoceria*) на процесс заживления плоскостной раны у крыс. Быстрое и эффективное заживление ран требует скоординированной клеточной реакции, привлечения фибробластов, кератиноцитов и эндотелиальных клеток сосудов (VECs), что стало основной причиной использования *Nanoceria* благодаря его многократным впечатляющим функциям (противовоспалительная, антиоксидантная, защита кожи и клеток от ультрафиолетовых лучей – свет, онкотерапия т. д.). Животным опытной группы, начиная со следующего дня после моделирования раны, каждый день на протяжении всех сроков наблюдения наносили на раневую поверхность 0,05 % CeO_2 (растворенный в 0,5 % карбополе) с помощью металлического шпателя. Уникальной особенностью этих нанокристаллов является то, что их можно применять несколько раз: в течение нескольких недель обогащенные церием частички медленно возвращаются к исходному состоянию церия. Почти во всех случаях частицы остаются колоидно стабильными (напр., не агрегированные) и могут применяться несколько раз. Исследования *in vivo* показывают, что наночастицы *Nanoceria* для ткани крыс является непатогенными. Считается, что наночастицы диоксида церия хорошо поглощаются кожей. Исследования показали, что после 2 недель раны, обработанные нанокристаллическим диоксидом церия, достигли значительного закрытия примерно до 100 %. Наши результаты показали, что использование нанокристаллического диоксида церия в лечении ран является успешным и перспективным для дальнейшего исследования, поскольку ускоряет полное заживление раны и уменьшает ее участок по сравнению с необработанными участками кожи животных.

Ключевые слова: нанокристаллический диоксид церия, плоскостная рана.

УДК: 577.27; 618.14-006.363.03- 07:612.017.1

М. Макаренко, д-р мед. наук, Р. Ворона, асист.,
І. Сокол, асист., В. Берестовий, асист., Д. Говсєєв, канд. мед. наук,
Інститут післядипломної освіти
Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, Київ,
А. Погрібна, канд. біол. наук, О. Корнелюк, д-р біол. наук, М. Гром, мол. наук. співроб.,
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

ДОСЛІДЖЕННЯ РІВНІВ АВТОАНТИТІЛ КЛАСІВ IGG ТА IGM ДО БАКТЕРІАЛЬНОГО АНАЛОГА HSP60, ТИРОЗИЛ-ТРНК СИНТЕТАЗИ ТА ЇЇ ОКРЕМИХ ДОМЕНІВ У ЖІНОК ІЗ ФІБРОМІОМОЮ МАТКИ

Фіброміома (лейоміома, міома) – доброякісне новоутворення міометрія, що вражає більшість жінок репродуктивного віку, але при цьому механізми його розвитку досліджені недостатньо. Тирозил-тРНК синтетаза та Hsp60 – білки домашнього господарства, які можуть бути у різних спосіб залучені до патогенезу ряду захворювань. Мета роботи – визначити рівні автоантитіл до Hsp60, тирозил-тРНК синтетази (TyrPC) та її окремих доменів (міні-TyrPC та С-кінцевого домену) у сироватці крові жінок із фіброміомою. Матеріали і методи: рівні автоантитіл класів IgM та IgG до білків Hsp60, TyrPC, міні-TyrPC і С-кінцевого домену в сироватках 5 здорових донорів та 25 жінок із фіброміомою до початку лікування, що визначалось методом твердофазного імуоферментного аналізу (ІФА). Специфічність реакції IgG автоантитіл проти білків Hsp60 та міні-TyrPC перевірено за допомогою вестерн-блот тесту. Статистичний аналіз даних здійснено за допомогою програмного забезпечення STATISTICA 10.0. (StatSoft, США). Непараметричні дані порівнювались у тесті Манна-Уїтні (Mann-Whitney U-test). Результати: не часта поява підвищених рівнів автоантитіл класу IgM до усіх 4 білків як у контрольній, так і дослідній групах без будь-якої закономірності. У групі здорових донорів крові не виявлено особин з підвищеними рівнями автоантитіл IgG до жодного з досліджуваних білків. Серед жінок з фіброміомою були серопозитивні до міні-TyrPC 19 із 25 (76 %), до Hsp60 – 18 із 25 (72 %). При цьому 17 зразків дослідної групи (68 %) були позитивні до обох антигенів порівняно зі здоровими донорами. Рівень автоантитіл до міні-TyrPC у жінок із фіброміомою був вищим від рівня здорових донорів у 1,7 раза, для Hsp60 такий показник становив 2,1 раза. Підвищення рівнів автоантитіл проти кожного з 2 білків було статистично значимими зі ступенем достовірності $p < 0,01$. Результати вестерн-блот аналізу підтвердили дані ІФА для Hsp60, але не для міні-TyrPC. Висновок: Високі рівні автоантитіл до міні-TyrPC та Hsp60 у жінок із фіброміомою вказують на дані білки як на перспективних учасників комплексної маркерної панелі моніторингу захворювання.

Ключові слова: Hsp60, TyrPC, фіброміома, автоантитіла.

Вступ. Фіброміома (лейоміома, міома) – доброякісне новоутворення міометрія, що за різними статистичними даними вражає 60–70 % жінок репродуктивного

віку [5]. Незважаючи на високу частоту виявлення новоутворення, молекулярні чинники виникнення та розвитку міоми вивчені недостатньо [5]. Протягом остан-

ніх десятиліть було показано, що багато білків домашнього господарства, які у нормі забезпечують гомеостаз клітини, можуть виконувати й інші функції, зокрема при розвитку різних патологій [14]. Тирозил-тРНК синтетаза та Hsp60 внутрішньоклітинні білки домашнього господарства, які за умов стресу змінюють свою локалізацію, експонуються на поверхню клітини та/або у міжклітинний простір та можуть бути залучені до патогенезу різними способами – впливати на передачу клітинних сигналів, спричиняти автоімунні реакції, здійснювати проангіогенну дію.

Тирозил-тРНК синтетаза належить до аміноацил-тРНК синтетаз – групи консервативних ферментів, які відіграють ключову роль у біосинтезі білка, а також беруть участь у транскрипції, трансляції, сплайсингу, запальних реакціях, ангіогенезі, апоптозі. Повнорозмірний фермент неактивний у передачі клітинного сигналу, але за умов стресу фермент може бути екскретований у міжклітинний простір і розщеплений на два окремі білки, кожен з яких має власні цитокинові властивості [12]. Це пояснюється особливостями структури білка. Амінокислотні послідовності, що відповідають за цитокинові функції обох доменів у повнорозмірному білку просторово недоступні, натомість при розщепленні синтетази вони експонуються. Зокрема, С-кінцевий домен синтетази завдяки сигнальному гептапептиду є потужним хемоатрактантом для лейкоцитів і моноцитів, стимулює продукцію тканинного фактора, мієлопероксидазу та фактора некрозу пухлин α , а також спричиняє ангіогенний вплив різної спрямованості [12]. N-кінцевий домен (міні-ТирРС) містить амінокислотну послідовність Glu-Leu-Arg – ELR-мотив, подібний до такого у IL-8, що дозволяє стимулювати міграцію поліморфоядерних клітин і забезпечувати проангіогенні властивості ферменту [6, 12].

Hsp60 є шапероном, який у мітохондріях забезпечує правильне згортання білків, запобігає їх агрегації та денатурації, у цитоплазмі виконує антиапоптичний вплив [1]. Шаперони є високо консервативними білками, а саме: амінокислотна послідовність Hsp60 людини та його бактеріального аналога *E.coli* (GroEL) на 50–60 % ідентична. Під дією стресових факторів білок активно експресується на поверхні клітинної мембрани, а також потрапляє в позаклітинний простір у вигляді вільних молекул або у ліпідних везикулах [2]. Позаклітинний Hsp60 є важливою сигнальною молекулою, що здатна активувати Т- та В-лімфоцити, макрофаги, нейтрофіли, а також індукувати проліферацію В-лімфоцитів, секрецію медіаторів запалення – IL-6, -10, -12, -15, TNF α , IFN- γ , активних форм кисню, протеаз тощо. Шаперон може зв'язувати TLR2 і TLR4 на Т-лімфоцитах, що дозволяє модифікувати активність клітин вродженого та набутого імунітету. Окрім того, Hsp60 бере участь в ангіогенезі, пухлинній інвазії та метастазуванні [1].

Рівні ТирРС та Hsp60, а також автоантитіл до них значно змінюються при різних патологіях [7, 1]. Метою даної роботи було з'ясувати, чи відрізняються рівні автоантитіл до Hsp60 і тирозил-тРНК синтетази та її окремих доменів у сироватці жінок із фіброміомою – надзвичайно гетерогенним доброякісним новоутворенням, розвиток якого характеризується прозапальними реакціями та надмірною васкуляризацією.

Матеріали і методи. Забір зразків. Обстежено 30 жінок: 5 клінічно здорових і 25 жінок із фіброміомою до операції, яким було проведено лабораторні та інструментальні дослідження згідно з Наказом МОЗ України від 15.07.2011 р. № 417 "Про організацію амбулаторної аку-

шерсько-гінекологічної допомоги в Україні" та отримано поінформовану згоду на дослідження згідно з рішенням Комісії з питань біоетичної експертизи та етики наукових досліджень при НМУ імені О.О. Богомольця від 10.02.2017. Особи контрольної та дослідної групи були співставні за віком: $45,1 \pm 2,7$ та $42,8 \pm 5,3$ роки відповідно.

Отримання рекомбінантних білків. Рекомбінантні білки бичачої повнорозмірної тирозил-тРНК синтетази та її окремих модулів отримували як описано в [8]. Рекомбінантний білок GroEL отримували згідно з [9] із незначними модифікаціями: для гель-фільтрації та іонообмінної хроматографії використовували TSK-GEL Toyorearl HW-65F, DEAE-Toyorearl 650M відповідно.

Чистоту отриманих білків контролювали методом електрофореза в денатуруючих умовах з використанням градієнта поліакриламідного гелю 7–22 %. Концентрацію рекомбінантного білка визначали спектрофотометрично.

ELISA. Рівні автоантитіл класів IgM та IgG проти рекомбінантних білків GroEL, а також тирозил-тРНК синтетази та її окремих доменів у сироватках здорових донорів і пацієнток до початку лікування визначали методом ELISA, як описано в [7]. Серопозитивною вважали сироватку, оптична густина якої перевищувала середню величину оптичної густини зразків сироватки крові здорових донорів (М) на два стандартних відхилення (sd) – $(M+2sd)$.

Вестерн-блот аналіз. Специфічність реакції IgG автоантитіл проти GroEL та міні-ТирРС перевіряли методом вестерн-блот аналізу згідно з [7]. Результати реакції фіксували електрохемілюмінесцентним методом на рентгенівську плівку.

Статистична обробка даних. Статистичний аналіз даних здійснювали за допомогою програмного забезпечення STATISTICA 10.0. (StatSoft, США) Непараметричні дані порівнювали в тесті Манна-Уїтні (Mann-Whitney U-test).

Результати та їх обговорення. Сироватки крові 5 здорових донорів та 25 жінок із фіброміомою до оперативного втручання було проскринено методом ІФА на наявність автоантитіл класів IgG та IgM до 4 білків: GroEL, ТирРС, міні-ТирРС та С-кінцевого домену тирозинової синтетази.

Підвищені рівні автоантитіл класу IgM до всіх 4 білків траплялись не часто як у контрольній, так і дослідній групах без якоїсь закономірності (дані не представлені). Такі результати були передбачуваними, оскільки високі рівні імуноглобулінів класу М вказують на гостру фазу запалення, найчастіше інфекційного походження, тоді як для міоми характерні хронічні запальні процеси.

У контрольній групі здорових донорів крові не було виявлено особин з підвищеними рівнями автоантитіл IgG до жодного з досліджуваних білків. Серед жінок із фіброміомою 19 з 25 (76 %) пацієнток були серопозитивні до міні-ТирРС, 18 з 25 (72 %) до бактеріального шапероніна. При цьому 17 дослідних зразків (68 %) були позитивні до обох антигенів порівняно зі здоровими донорами. Рівень автоантитіл до міні-ТирРС був вищим, ніж у здорових донорів у 1,7 раза, для GroEL такий показник становив 2,1 раза. Підвищення рівнів автоантитіл проти кожного з 2 білків було статистично значиме зі ступенем достовірності $p < 0,01$.

Натомість рівні імуноглобулінів IgG до білків ТирРС та її С-кінцевого домену статистично значимо не відрізнялись у групі жінок із фіброміомою від когорти здорових донорів. До повнорозмірної ТирРС 7 з 25 (28 %) жінок із фіброміомою були серопозитивні, також статис-

тично значимо підвищені рівні автоантитіл до С-кінцевого домену було відмічено у 4 з 25 (16 %) пацієнток. Зауважимо, що підвищені рівні антитіл до ТирРС і С-кінцевого домену були виявлені у пацієнток, що також були серопозитивними до міні-ТирРС та GroEL.

Слід сказати, що у жінок з фіброміомою були підвищені рівні автоантитіл до одного домену синтетази (міні-ТирРС) значно частіше, ніж до іншого (С-кінцевого) – 76 % порівняно з 16 %. Як вже було зазначено, вважається, що повнорозмірний білок розщеплюється у цитоплазмі на два модулі, відповідно, співвідношення доменів має бути один до одного. Виходячи з цього, можна зробити припущення, що міні-ТирРС є більш імуногенним, ніж інший домен, принаймні, для обстежених пацієнток, адже раніше нами було показано, що при раку простати більшу автореактивність викликав С-кінцевий домен: 46 % серопозитивних пацієнтів порівняно з 30 % позитивних до міні-ТирРС [6]. Можливо, існують і інші, більш тонкі механізми екскреції ТирРС або її окремих модулів з клітини, що дозволяють вивільняти з клітини один чи інший домен синтетази при різних станах, адже цитокінові функції цих молекул, хоча і подібні, але не ідентичні.

Помірна автореактивність до повнорозмірної ТирРС (28 %) у жінок з фіброміомою може бути пов'язана з перехресною реактивністю до міні-ТирРС. На користь такого припущення свідчить те, що всі 7 жінок, у яких були підвищені рівні автоантитіл до повнорозмірного білка, також були серопозитивні до міні-ТирРС. Водночас такі висновки не виключають можливості наявності певних антигенних детермінант, властивих саме ТирРС.

Виявлення автоантитіл проти Hsp60 і ТирРС та її фрагментів непрямо свідчить про експанованість цих білків у міжклітинному просторі. Як шаперонін, так і окремі домени синтетази беруть участь у розвитку запалення та ангіогенних перебудовах, які є характерними для росту і розвитку міоми [3], а отже, можуть бути залучені або до розвитку патології, або до її елімінації організмом. Дослідження ролі даних білків, автоантитіл до них та їхньої взаємодії при розвитку міоми дозволить оцінити роль цих молекул у прогресії патології.

Результати ІФА на автоантитіла класу IgG до білків GroEL та міні-ТирРС було перевірено методом вестерн-блоту. Дані імуноблотинга підтвердили результати ІФА для автоантитіл утворених до GroEL, але не до міні-ТирРС (рис. 2). Відповідність результатів аналізів для автоантитіл до GroEL узгоджується з літературними даними та свідчить про переважне утворення антитіл до лінійної антигенної детермінанти (або кількох лінійних епітопів) [15, 4]. При ІФА автоантитіла з сироватки приєднуються до нативного білка у третинній структурі, коли на поверхні білка експоновані як лінійні, так і просторові антигенні детермінанти, тоді як при імуноблоті білки розділяють у поліакриламідному

гелі при денатуруючих умовах, коли білок перебуває у розгорнутому стані, тому зберігаються тільки лінійні епітопи. Результати ІФА та імуноблотингу для автоантитіл проти міні-ТирРС узгоджуються не в усіх зразках. Це можна пояснити утворенням автоантитіл при фіброміомі до різних епітопів на поверхні білка. Можливо, у зразках для яких результати отримані різними методами аналізів співставні, переважають антитіла до лінійних антигенних детермінант, а у зразках, результати для яких відрізняються в ІФА та вестерн-блоті – антитіла до просторових епітопів.

Статистично значиме підвищення рівнів антитіл проти GroEL та міні-ТирРС у сироватці більшості жінок із фіброміомою (72 та 76 %, відповідно) порівняно зі здоровими донорами крові дозволяє розглядати дані молекули як перспективні діагностичні та прогностичні маркери. Різними авторами показано прогностичну роль зміни експресії HSP60 або автоантитіл до даного шапероніну при раку шийки матки, раку простати, при колоректальному раку, раку молочної залози [11]. X. Zhou зі співавторами розглядають ТирРС як потенційний неінвазивний маркер аденокарциноми легень [16]. У роботі [7] було показано підвищення рівнів автоантитіл до С-кінцевого домену тирозил-тРНК синтетази при раку простати. Білкові маркери для діагностування фіброміоми не потрібні, адже пухлини виявляють або завдяки виразним гінекологічним симптомам, або випадково, при ультрасонографічному або радіологічному обстеженні. Натомість використання прогностичних маркерів для моніторингу патології після хірургічного втручання або для оцінки ефективності медикоментозної терапії міомою може бути зручним неінвазивним методом при веденні пацієнтів з даною патологією. За відсутності специфічних та надійних маркерів при фіброміомі ми розділяємо погляд *Levi та ін.* [10] щодо перспективності використання маркерної панелі білків.

Слід зазначити, що нами було обстежено два донори, які були позитивні до GroEL, а один з них був позитивний до міні-ТирРС. Позитивна реакція на GroEL може бути пояснена для одного донора наявністю у сімейному анамнезі по материнській лінії артеріальної гіпертензії, для другого автоімунним тиреоїдитом, при яких показано підвищені рівні автоантитіл до цих білків [13, 2, 8].

Отже, розглядаючи автоантитіла проти GroEL та міні-ТирРС як потенційні маркери для моніторингу стану патології у жінок з фіброміомою, необхідно враховувати те, що наявність антитіл до цих білків у сироватці крові може бути пов'язана і з іншими ускладненнями анамнезу. Натомість, можливо саме використання більш широкої панелі маркерних білків, виявлення зміни співвідношення між окремими показниками, дозволить більш точно визначати зміни у розвитку даної патології.

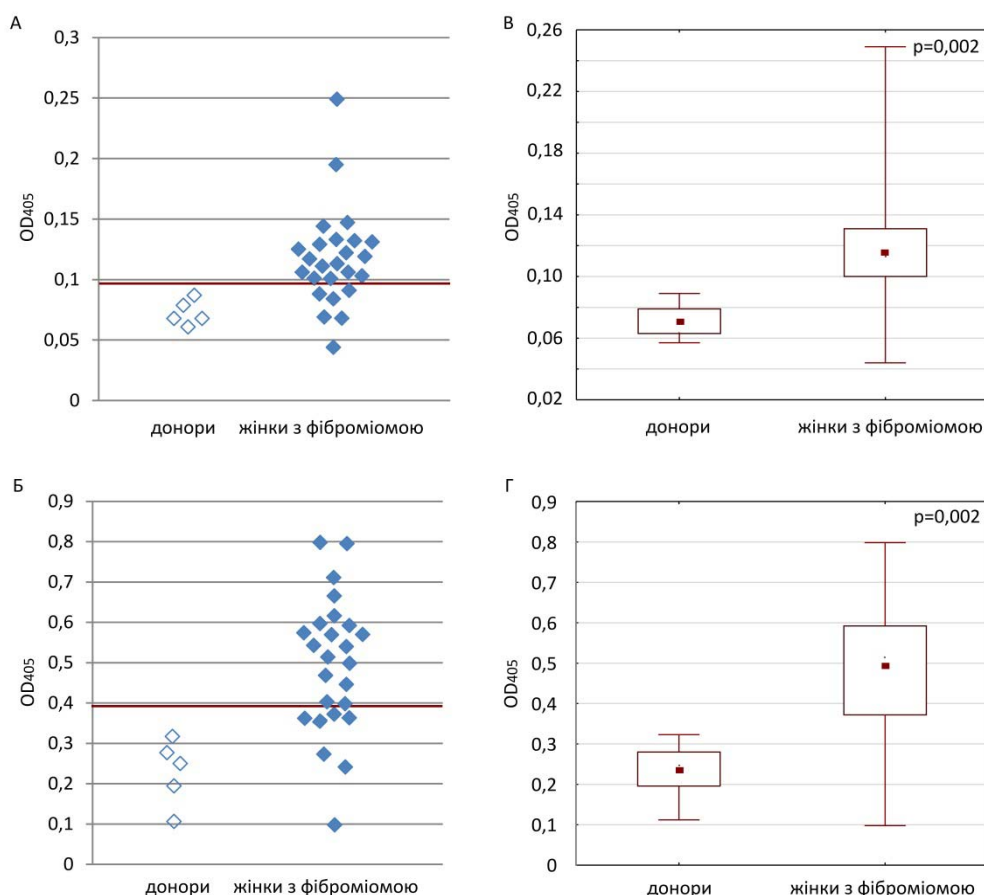


Рис. 1. Рівні автоантитіл проти міні-ТирРС (А, В) і GroEL (Б, Г) у сироватці крові жінок із фіброміомою та здорових донорів. Вище маркерної лінії (А, Б), яка чисельно дорівнює середньому значенню плюс 2 стандартні відхилення відповідної донорської групи, розташовані позитивні зразки сироватки. Графіки (В, Г) відображають середнє, максимальне та мінімальне значення, а також діапазон у якому знаходиться 50 % значень для кожної вибірки



Рис. 2. Імунореактивність сироватки здорових донорів крові (зразки 1–5) і жінок із фіброміомою до оперативного втручання (зразки 6–30) до GroEL (А) та міні-ТирРС (В) за результатами вестерн-блот аналізу

Висновки

Таким чином, високі рівні автоантитіл до міні-ТирРС та GroEL у жінок із фіброміомою вказують на дані білки як на перспективних учасників комплексної маркерної панелі для моніторингу захворювання.

Список використаних джерел

1. *Hsp60* chaperonopathies and chaperonotherapy: targets and agents / F. Cappello, A. Gammazza, A. Piccionello et al. // *Expert Opin. Ther. Targets*, 2014. – Vol. 18, N 2. – P. 185–208.
2. *Exosomal HSP60*: a potentially useful biomarker for diagnosis, assessing prognosis, and monitoring response to treatment / C. Caruso Bavi-

sotto, F. Cappello, A. Macario et al. // *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2017. – Vol. 17, N 9. – P. 815–822.

3. *Activin-A* and myostatin response and steroid regulation in human myometrium: disruption of their signaling in uterine fibroid / P. Ciarmela, E. Bloise, P. Gray et al. // *J Clin Endocrinol Metab*, 2011. – Vol. 96, N 3. – P. 755–765.

4. *Deniset J. F.* Heat Shock Proteins: Mediators of Atherosclerotic Development / J. Deniset, G. Pierce // *Curr Drug Targets*, 2015. – Vol. 16, N 8. – P. 816–26.

5. *Molecular* and clinical attributes of uterine leiomyomas / D. Dvorska, D. Brany, Z. Danková et al. // *Tumor Biology*, 2017. – Vol. June. – P. 1–16.

6. The novel fragment of tyrosyl-tRNA synthetase, mini-TyrRS, is secreted to induce an angiogenic response in endothelial cells / Y. Greenberg, M. King, W. Kiosses et al. // FASEB J., 2008. – Vol. 22, N 5. – P. 1597–605.

7. Tyrosyl-tRNA synthetase and its separated domains are suppositional components of prostate cancer pathogenesis / M. Grom, L. Yakovenko, L. Sidorik et al. // Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series: Problems of Physiological Functions Regulation, 2016. – Vol. 1, N 20. – P. 38–44.

8. Autoantibodies against tyrosyl-tRNA synthetase and its separated domains at essential hypertension / M. Grom, L. Yakovenko, V. Granich et al. // Biopolymers and Cell, 2015. – Vol. 31, N 4. – P. 255–63.

9. Obtaining recombinant chaperon GroEL and its immunological cross-reactivity with Hsp60 / L. Kapustian, R. Kyamova, V. Gryshkova et al. // Biopolymers and Cell, 2006. – Vol. 22, N 2. – P. 117–120.

10. Biomarkers in uterine leiomyoma / G. Levy, T. Plowden, W. Catherino, A. Armstrong // Fertil Steril., 2013. – Vol. 99, N 4. – P. 1146–1152.

11. Lianos G. The role of heat shock proteins in cancer / G. Lianos, G. Alexiou, A. Mangano // Cancer Lett., 2015. – Vol. 360, N 2. – P. 114–8.

12. Wakasugi K. Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase / K. Wakasugi, P. Schimmel // Science, 1999. – Vol. 284. – P. 147–151.

13. Anti-Hsp60 antibodies in patients with arterial hypertension and persons with a complicated heredity for hypertension / L. Yakovenko, Yu. Smalyuk, L. Kapustian et al. // Medical case, 2015. – Vol. 3-4. – P. 43–52.

14. Yao P. Aminoacyl-tRNA synthetases in medicine and disease / P. Yao, P. Fox // EMBO Mol Med., 2013. – Vol. 5, N 3. – P. 332–43.

15. Autoantibodies against chaperonin CCT in human sera with rheumatic autoimmune diseases: comparison with antibodies against other Hsp60 family proteins / Sh. Yokota, D. Hirata, S. Minota et al. // Cell Stress & Chaperones, 2000. – Vol. 5, N 4. – P. 337–46.

16. Proteomics-based identification of tumor-relevant proteins in lung adenocarcinoma / X. Zhou, L. Xue, L. Hao et al. // Biomed Pharmacother, 2013. – Vol. 67, N 7. – P. 621–7.

References (Scopus)

1. Cappello F., Marino Gammazza A., Palumbo Piccionello A., Campanella C., Pace A., Conway de Macario E., Macario A. Hsp60 chaperonopathies and chaperonotherapy: targets and agents. Expert Opin. Ther Targets. 2014;18(2):185-208.

2. Caruso Bavisotto C., Cappello F., Macario A., Conway de Macario E., Logozzi M., Fais S., Campanella C. Exosomal HSP60: a potentially useful biomarker for diagnosis, assessing prognosis, and monitoring response to treatment. Expert Review of Molecular Diagnostics. 2017;17(9):815-22.

3. Ciarmela P., Bloise E., Gray P., Carrarelli P., Islam M., De Pascalis F., Severi F., Vale W., Castellucci M., Petraglia F. Activin-A and myostatin response and steroid regulation in human myometrium: disruption of their signaling in uterine fibroid. J Clin Endocrinol Metab. 2011;96(3):755–765.

4. Deniset J., Pierce G. Heat Shock Proteins: Mediators of Atherosclerotic Development. Curr Drug Targets. 2015;16(8):816-26.

5. Dvorska D., Braný D., Danková Z., Halašová E., Višňovský J. Molecular and clinical attributes of uterine leiomyomas. Tumor Biology. 2017;39:1–16.

6. Greenberg Y., King M., Kiosses W., Ewalt K., Yang X., Schimmel P., Reader J., Tzima E. The novel fragment of tyrosyl-tRNA synthetase, mini-TyrRS, is secreted to induce an angiogenic response in endothelial cells. FASEB J. 2008;22(5):1597–605.

7. Grom M., Yakovenko L., Sidorik L., Kornelyuk A., Grygorenko V., Vikarchuk M. [Tyrosyl-tRNA synthetase and its separated domains are suppositional components of prostate cancer pathogenesis]. Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series: Problems of Physiological Functions Regulation. 2016;1(20):38-44.

8. Grom M., Yakovenko L., Granich V., Dobrohod A., Torbas O., Radchenko G., Sirenko Yu., Sidorik L., Kornelyuk A. Autoantibodies against tyrosyl-tRNA synthetase and its separated domains at essential hypertension. Biopolym and Cell. 2015;31(4):255–63.

9. Kapustian L., Kyamova R., Gryshkova V., Terentiev A., Filonenko V., Sidorik L. Obtaining recombinant chaperon GroEL and its immunological cross-reactivity with Hsp60. Biopolymers and cell. 2006; 22(2):117-120.

10. Levy G., Hill M., Plowden T., Catherino W., Armstrong A. Biomarkers in uterine leiomyoma. Fertil Steril. 2013;99(4):1146–52.

11. Lianos G., Alexiou G., Mangano A., Mangano A., Rausei S., Boni L., Dionigi G., Roukos D. The role of heat shock proteins in cancer. Cancer Lett. 2015;360(2):114-8.

12. Wakasugi K., Schimmel P. Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase. Science. 1999;284:147–151.

13. Yakovenko L., Smalyuk Yu., Kapustian L., Chornyi S., Pogribna A., Granich V., Dobrohod A., Torbas O., Radchenko G., Sirenko Yu., Sidorik L. [Anti-Hsp60 antibodies in patients with arterial hypertension and persons with complicated heredity for hypertension]. Medical case. 2015;3-4:43-52.

14. Yao P., Fox P. Aminoacyl-tRNA synthetases in medicine and disease. EMBO Mol Med. 2013;5(3):332-43.

15. Yokota Sh., Hirata D., Minota S., Higashiyama T., Kurimoto M., Yanagi H., Yura T., Kubota H. Autoantibodies against chaperonin CCT in human sera with rheumatic autoimmune diseases: comparison with antibodies against other Hsp60 family proteins. Cell Stress & Chaperones. 2000;5(4):37–46.

16. Zhou X., Xue L., Hao L., Liu Sh., Zhou F., Xiong H., Qi X., Lin D., Shao Sh. Proteomics-based identification of tumor-relevant proteins in lung adenocarcinoma. Biomed Pharmacother. 2013;67(7):621-7.

Надійшло до редакції 19.03.2018

Отримано виправлений варіант 23.04.2018

Підписано до друку 23.04.2018

Received in the editorial 19.03.2018

Received a revised version on 23.04.2018

Signed in the press on 23.04.2018

М. Макаренко, д-р мед. наук, Р. Ворона, ассист.,
И. Сокол, ассист., В. Берестовой, ассист., Д. Говсеев, канд. мед. наук,
Институт последипломного образования
Национального медицинского университета имени А.А. Богомольца, Киев, Украина,
А. Погребная, канд. биол. наук, А. Корнелюк, д-р биол. наук, М. Гром, мл. научн. сотrud.,
Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, Украина

ИССЛЕДОВАНИЕ УРОВНЕЙ АУТОАНТИТЕЛ КЛАССОВ IGG И IGM К БАКТЕРИАЛЬНОМУ АНАЛОГУ HSP60, ТИРОЗИЛ-ТРНК СИНТЕТАЗЕ И ЕЕ ОТДЕЛЬНЫМ ДОМЕНАМ У ЖЕНЩИН С ФИБРОМИОМОЙ МАТКИ

Фибромиома (лейомиома, миома) – доброкачественное новообразование миометрия, которое поражает большинство женщин репродуктивного возраста, однако механизмы его развития изучены недостаточно. Тирозил-тРНК (ТирРС) синтетаза и Hsp60 – белки домашнего хозяйства, которые могут быть вовлечены в патогенез ряда заболеваний различными способами. Целью данной работы стало определение уровней аутоантител к Hsp60, ТирРС и её отдельным доменам (мини-ТирРС и С-конечному домену) в сыворотке крови женщин с фибромиомой. Материалы и методы: уровни аутоантител классов IgM и IgG к белкам Hsp60, ТирРС, мини-ТирРС и С-конечному домену в сыворотке крови 5 здоровых доноров и 25 женщин с фибромиомой до начала лечения, что определялось методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Специфичность реакции аутоантител класса IgG с белками Hsp60 и мини-ТирРС проверялась при помощи вестерн-блот теста. Статистический анализ данных проведен при помощи программного обеспечения STATISTICA 10.0. (StatSoft, США). Непараметрические данные сравнивались в тесте Манна-Уитни (Mann-Whitney U-test). Результаты: повышенные уровни аутоантител класса IgM к каждому из 4 изучаемых белков идентифицировали не часто как в контрольной, так и опытной группе без определенной закономерности. В группе здоровых доноров не были обнаружены образцы с повышенными уровнями аутоантител IgG ни к одному из исследуемых белков; среди женщин с фибромиомой были серопозитивны к мини-ТирРС 19 из 25 (76 %), а к Hsp60 – 18 из 25 (72 %). При этом 17 образцов опытной группы (68 %) были позитивны к обоим антигенам по сравнению с такими у здоровых доноров. Уровень аутоантител к мини-ТирРС был повышен у женщин с фибромиомой в 1,7 раз по сравнению со здоровыми донорами, для белка Hsp60 соответствующий показатель составил 2,1. Повышение уровней аутоантител к мини-ТирРС и Hsp60 было статистически значимым со степенью достоверности $p < 0,01$. Результаты иммуноблота подтвердили данные ИФА для Hsp60, но не для мини-ТирРС. Вывод: высокие уровни аутоантител к мини-ТирРС и Hsp60 у женщин с фибромиомой свидетельствуют о перспективности исследуемых белков как участников комплексной маркерной панели мониторинга заболевания.

Ключевые слова: Hsp60, ТирРС, фибромиома, аутоантитела.

M. Makarenko, M. D., R. Vorona, Assist. Prof., I. Sokol, Assist. Prof., V. Berestoviy, Assist. Prof., D. Govsieiev, Ph. D., Bogomolets National Medical University, Postgraduate Education Institute, Kyiv, Ukraine, A. Pogribna, Ph. D., Res., A. Kornelyuk, D. Sci., M. Grom, J. Res. Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

THE INVESTIGATION OF LEVELS OF IGG AND IGM AUTOANTIBODIES AGAINST BACTERIAL ANALOG OF HSP60, TYROSYL-TRNA SYNTHETASE, AND ITS SEPARATED DOMAINS IN SERA OF WOMEN WITH UTERINE LEIOMYOMA

Uterine leiomyomas are common gynecologic tumor in reproductive-aged women. The molecular mechanisms behind the origin of leiomyomas are still relatively unknown. Tyrosyl-tRNA synthetase (TyrRS) and Hsp60 are housekeeping proteins that could be involved into different pathologies in various ways. The aim of the study was to investigate the levels of antibodies to Hsp60 and TyrRS and its distinct domains: mini-TyrRS and C-terminal domain in sera of patients with uterine leiomyoma (UL). Materials and methods: Specific IgG and IgM autoantibodies in sera of 25 women with UL before therapy and 5 healthy subjects were measured by ELISA. The specificity of the reaction of IgG autoantibodies against the Hsp60 and mini-TyrRS proteins was checked using a western blot assay. Statistical analysis was performed using the STATISTICA 10.0 software. (StatSoft, USA). Non-parametric data were compared in the Mann-Whitney U-test. Results: The elevated levels of IgM autoantibodies against all the proteins studied occur frequently neither in control nor in experimental cohort. In the group of healthy donors, individuals with elevated levels of IgG autoantibodies against any of the proteins studied were not detected. Meanwhile 19 of 25 (76 %) and 18 of 25 (72 %) women with UL had significantly increased serum levels of autoantibodies to mini-TyrRS and Hsp60 respectively. Intriguingly, 17 of 25 samples from women with uterine fibroids (68 %) were positive against mini-TyrRS and Hsp60 analog simultaneously. The levels of autoantibodies to mini-TyrRS in sera of women with UL were 1.7 times higher than in sera of healthy donors, for Hsp60 the corresponding index was 2.1. Increasing levels of autoantibodies against each of the two proteins was statistically significant with a degree of reliability of $p < 0.01$. The data obtained by ELISA were confirmed by western-blot analysis for Hsp60 but not for mini-TyrRS. Conclusion: We propose that elevated levels of autoantibodies to Hsp60 and mini-TyrRS in sera of persons with UL may serve as element of panel of protein markers for monitoring of pathology.

Key words: Hsp60, TyrRS, uterine leiomyoma, autoantibodies.

УДК:616.155.392:544.475:615.616-085

І. Дмитренко, канд. біол. наук, І. Дягель, д-р мед. наук, Ж. Мінченко, д-р біол. наук, З. Мартіна, канд. мед. наук, В. Федоренко, канд. мед. наук, Т. Шляхтиченко, канд. мед. наук, В. Шолойко, канд. біол. наук, О. Дмитренко, канд. біол. наук, Державна установа "Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України", Київ, Україна

ПРОГНОСТИЧНІ ФАКТОРИ ВІДПОВІДІ НА ТЕРАПІЮ ІНГІБІТОРАМИ ТИРОЗИНКІНАЗ В УКРАЇНСЬКІЙ КОГОРТІ ПАЦІЄНТІВ ІЗ ХРОНІЧНОЮ МІЄЛОЇДНОЮ ЛЕЙКЕМІЄЮ

Порівняно динаміку редукції BCR/ABL-позитивного клону у пацієнтів із хронічною мієлоїдною лейкемією (ХМЛ) при тривалій терапії іматинібом (ІМ) і нілотинібом (НІ) і сформовано комплекс ініціальних прогностичних факторів, що впливають на редукцію лейкемічного клону і тривалість життя хворих на ХМЛ. Із загальної когорти 1095 хворих на ХМЛ, обстежених за період 2002–2018 рр., у 937 пацієнтів на терапії ІМ та 72 пацієнтів на терапії НІ оцінено ефективність терапії за рівнем експресії гена BCR/ABL1 та показниками виживаності. Для визначення прогностичних факторів, асоційованих з кращою відповіддю на терапію та виживаністю, використано метод регресії Кокса. На 12-й міс. терапії відсоток пацієнтів, які досягли редукції пухлинного клону до рівня великої молекулярної відповіді (ВМВ), був істотно вищим в групі пацієнтів, які отримували НІ, ніж в групі пацієнтів на терапії ІМ (61,0 % vs 23,7 %, $p < 0,001$). На 24-му міс. терапії зниження рівня експресії гена BCR/ABL1 до рівня глибокої молекулярної відповіді (МВ4) було зареєстровано у 38,3 % пацієнтів, які отримували НІ, і лише у 12,4 % пацієнтів, які лікувалися ІМ ($p < 0,001$). Медіана часу досягнення ВМВ і МВ4 була меншою для пацієнтів, які отримували НІ, порівняно із пацієнтами на ІМ ($p < 0,001$). Доведено, що відмінності в ефективності ІМ і НІ виражалися тільки в динаміці відповіді, але не в показниках виживаності. Найбільш впливовим чинником прогресії, загальної та безпосередньої виживаності виявилася тривалість періоду лікування до початку терапії ІМ та НІ. Нілотиніб обумовлює глибшу і швидшу редукцію пухлинного клону. Проте затримання зі своєчасним призначенням терапії інгібіторами тирозинкіназ призводить до зниження ефективності терапії як іматинібом, так і нілотинібом.

Ключові слова: ХМЛ, інгібітори тирозинкіназ, термін передлікованості, ефективність терапії.

Вступ. Хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ) – клональне мієлопроліферативне захворювання, яке становить 20 % уперше діагностованих випадків лейкемій у дорослих. У країнах Європи і Північної Америки це захворювання за частотою займає третє місце серед лейкемій (після гострих лейкемій і хронічної лімфобластної лейкемії).

За даними реєстру EUTOS (European Treatment and Outcome Study), що включає 2904 пацієнти з діагнозом ХМЛ, установленим в 2008–2012 рр., захворюваність на ХМЛ у країнах Європи коливається від 0,69 на 100 тис. населення, в Польщі, Італії до 1,39 на 100 тис. [1]. Кількість випадків ХМЛ зростає з віком. Медіана віку на час встановлення діагнозу ХМЛ в країнах Європи в середньому дорівнює 56 років [1].

Згідно з "Показниками діяльності гематологічної служби України в 2016 році" протягом останнього десятиріччя в Україні захворюваність на ХМЛ становила 0,93–1,11 на 100 тис. населення. У 2016 р. в Україні вперше діагностовано ХМЛ у 279 пацієнтів, а загальна чисельність хворих була 2323. [2].

Розкриття молекулярного патогенезу ХМЛ сприяло розвитку таргетної терапії із застосуванням специфічних інгібіторів тирозинкіназ (ІТК). Перші клінічні випробування іматинібу у хворих на ХМЛ почалися у червні 1998 р. Їх результати виявилися настільки переконалими, що вже в травні 2001 р. препарат був дозволений для широкого використання. На сьогодні за даними міжнародного дослідження IRIS загальна виживаність пацієнтів на 8 років терапії іматинібом перевищує 80 % [3], тобто тривалість життя пацієнтів з ХМЛ, які отримують терапію ІТК, стала порівнянною з тривалістю життя здорових людей.

Поява ІТК 2-го і 3-го покоління ще більше розширило можливості терапії ХМЛ. Вони відрізняються спектром кіназ, які інгібують, а також більш високою афінністю до BCR/ABL-тирозинкінази. У світі на сьогодні пройшли клінічні випробування і використовуються в практиці п'ять ІТК: іматиніб, нілотиніб, дазатиніб, бозутиніб та понатиніб.

В Україні для терапії ХМЛ схвалено застосування іматинібу та нілотинібу. Іматиніб перші пацієнти отримали з 2002 р. в межах програми Glivec International Patient Access Program (GIPAP). Нілотиніб (ITK 2-го покоління) був зареєстрований в 2008 р., як терапія 2-ї лінії для пацієнтів, резистентних до іматинібу, а з 2012 р. – як препарат 1-ї лінії терапії.

На сьогодні дані про ефективність терапії ІТК представлені в основному результатами клінічних випробувань [4, 5]. Однак у реальній клінічній практиці немає критеріїв включення та виключення. І хоча оцінка відповіді на терапію ІТК проводиться відповідно до міжнародних рекомендацій [6, 7], ефективність лікування багато в чому визначається ініціальними факторами, до яких належать клініко-лабораторні показники, на підставі яких встановлюється діагноз, стать, вік, тривалість попередньої терапії.

Мета дослідження. Порівняти динаміку редукції BCR/ABL-позитивного клону у пацієнтів із ХМЛ при тривалій терапії іматинібом і нілотинібом та сформувати комплекс ініціальних прогностичних факторів, що впливають на редукцію лейкоемічного клону і тривалість життя хворих на ХМЛ.

Матеріали та методи. У дослідження було залучено 1095 пацієнтів із ХМЛ, які перебували під наглядом або на консультативному прийомі у відділенні радіаційної онкогематології і трансплантації стовбурових клітин Інституту клінічної радіології Національного наукового центру радіаційної медицини за період з 2002 по 2018 р. за умови надання інформованої згоди на використання їх біоматеріалу для дослідження. Із них 523 (47,8 %) чоловіка та 572 (52,2 %) жінки. Медіана віку пацієнтів на час встановлення діагнозу становила 42 роки (від 18 до 82 років).

Фазу захворювання на час обстеження визначали згідно з рекомендаціями ELNet 2013 [6]. Для пацієнтів із хронічною фазою ХМЛ при встановленні діагнозу оцінювали групу ризику за допомогою індексів Sokal, Hasford (Euro), EUTOS та ELTS [8–10]. Частина пацієнтів отримували попереднє лікування різними препаратами (гідроксисечовина, бусульфан, інтерферон) до призначення інгібіторів тирозинкінази (ІТК). Тривалість передлікованої становила від 1 до 268 міс. у (медіана 9,8 міс.).

Іматиніб отримували 1019 пацієнтів. Стартова стандартна доза становила 400 мг на добу. У випадку недосягнення оптимальної відповіді або втрати досягнутої цитогенетичної чи молекулярної відповіді дозу препарату збільшували до 600–800 мг на добу. Нілотиніб отримували 76 пацієнтів у дозі 600 мг на добу. У 234 пацієнтів іматиніб був неефективним, і вони були переведені на лікування нілотинібом у дозі 800 мг на добу. Пацієнти отримували терапію ІТК у різних гематологічних відділеннях України. Тривалість спостереження за пацієнтами на терапії іматинібом становила 33,3 міс. (1,5–196,0) міс., а для пацієнтів, які отримували нілотиніб – 30,8 міс. (3,5–90,2) міс.

Молекулярний моніторинг методом РТ-ПЛР з детекцією у реальному часі виконували в 3, 6 та 12 міс. терапії ІТК, далі кожні 6 міс. згідно з ELNet рекомендаціями [6]. Рівень транскрипта гена BCR/ABL1 нижче 1 % вважали еквівалентом повної цитогенетичної відповіді (ПЦВ). Як контрольний ген використовували ген *ABL1*. Велика молекулярна відповідь (ВМВ) визначалась як рівень експресії BCR/ABL1-транскрипту $\leq 0,1$ %. Глибока молекулярна відповідь (МБ4) визначалась як рівень експресії BCR/ABL1-транскрипту $\leq 0,01$ % при кількості *ABL1* копій не менше 10 000 [6].

Для порівняння ефективності іматинібу та нілотинібу як ІТК-терапії 1-ї лінії оцінювали відповідь на терапію на

12 міс. за критеріями ELN 2013 [6], досягнення глибокої молекулярної відповіді на 24 міс. терапії, динаміку досягнення повної цитогенетичної, великої молекулярної та глибокої молекулярної відповіді, а також 5-тирічну загальну, безподійну виживаність і виживаність без прогресії в групах пацієнтів із ХМЛ, які отримували іматиніб та нілотиніб. Різницю між показниками оцінювали за допомогою χ^2 -тесту і точного критерію Фішера для категоріальних змінних та U-тесту Манна-Уїтні для безперервних змінних. Імовірність загальної виживаності (OS), виживаності без прогресії (PFS) і безподійної виживаності (EFS) розраховували за методом Kaplan-Meier [11]. PFS визначали як виживаність без ознак прогресії (трансформації у фазу акселерації або бластного кризу). Подією при розрахунку ймовірності EFS вважали смерть від будь-яких причин, прогресію і втрату досягнутої ПЦВ або ВМВ. Подією при розрахунку OS вважали смерть на терапії ІТК 1-ї лінії. Відмінності між групами оцінювали за допомогою log-rank тесту [11]. Кумулятивну ймовірність ПЦВ, ВМВ і МБ4 оцінювали методом Kaplan-Meier за період від початку терапії до часу досягнення відповіді. При цьому дані про пацієнтів, які не отримали адекватної відповіді, були переведені на інший ІТК, померли або спогресували, цензурували за останньою датою спостереження.

Для визначення прогностичних факторів, асоційованих з кращою відповіддю на терапію та виживаністю, використовували аналіз однофакторних та багатфакторних моделей пропорційних інтенсивностей Кокса (регресію Кокса). Статистично значущі фактори, отримані за допомогою однофакторного аналізу, використовували як змінні в багатфакторній моделі пропорційних інтенсивностей Кокса. Фактори, що залишалися значущими у багатфакторному аналізі, інтерпретували як незалежні прогностичні фактори [12]. Статистичний аналіз проводили з використанням пакета статистичних програм SPSS for Windows (версія 20.0) [11, 12]. Розбіжності між параметрами, що порівнювалися, вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. У 1009 (92,2 %) пацієнтів на час обстеження встановлено хронічну фазу захворювання. Фаза акселерації та бластного кризу реєструвалися у 68 (6,2 %) та 18 (1,6 %) пацієнтів, відповідно. У зв'язку з тим, що серед пацієнтів із фазою акселерації тільки 4 отримували нілотиніб, а всі пацієнти з бластним кризом отримували іматиніб, порівняння ефективності терапії іматинібом і нілотинібом проводили тільки в групах пацієнтів із хронічною фазою ХМЛ (937 пацієнтів, які отримували іматиніб, та 72 пацієнта, які отримували нілотиніб).

Ініціальні клініко-лабораторні характеристики пацієнтів із хронічною фазою ХМЛ, які отримували терапію іматинібом та нілотинібом, наведено в табл. 1. Обстежені групи пацієнтів не відрізнялися за статтю, віком, та клініко-гематологічними характеристиками на час встановлення діагнозу. Розподіл за групами ризику за системами Sokal, Hasford, EUTOS та ELTS був порівняним в обох групах.

Медіана спостереження за пацієнтами, які отримували терапію іматинібом та нілотинібом становила 33,6 (2,0–196,2) міс. та 32,1 (3,5–90,2) міс., відповідно. Протягом всього періоду спостереження в групі пацієнтів, які отримували терапію нілотинібом, повної цитогенетичної відповіді досягли 83,1 % пацієнтів, великої молекулярної відповіді – 67,1 % та глибокої молекулярної відповіді – 46,4 % пацієнтів, що статистично значуще перевищувало ці показники у групі пацієнтів, які отримували терапію іматинібом (59,3 %, 41,1 % та 24,4 %, відповідно, $p < 0,001$ для всіх порівнянь).

Таблиця 1. Загальна характеристика пацієнтів із хронічною фазою ХМЛ, які отримували терапію іматинібом та нілотинібом

Показник	Перша лінія ІТК-терапії		Рівень значущості, <i>p</i>
	Іматиніб (n = 937)	Нілотиніб (n = 72)	
Вік, роки медіана (діапазон)	43 (18 – 80)	42,5 (21 – 82)	0,983
Стать чоловіки n (%)	445 (47,5)	35 (48,6)	0,607
Рівень гемоглобіну, г/л медіана (діапазон)	118 (60 – 193)	123,5 (78 – 163)	0,338
Кількість лейкоцитів, 10 ⁹ /л медіана (діапазон)	107,2 (4,3 – 860)	100,0 (17,7 – 336,2)	0,384
Кількість тромбоцитів, 10 ⁹ /л медіана (діапазон)	347,5 (100 – 2100)	284 (110 – 1500)	0,158
Кількість бластів, % медіана (діапазон)	1 (0 – 14)	1 (0 – 18)	0,769
Кількість еозинофілів, % медіана (діапазон)	2 (0 – 15)	2,5 (0 – 13)	0,724
Кількість базофілів, % медіана (діапазон)	2 (0 – 16)	2,5 (0 – 10)	0,960
Розмір селезінки, см з-під краю реберної дуги медіана (діапазон)	3 (0 – 40)	2 (0 – 20)	0,390
Sokal індекс			
низький ризик, %	38,8	47,2	0,669
проміжний ризик, %	41,2	37,5	
високий ризик, %	20,0	15,3	
Hasford індекс			
низький ризик, %	51,7	41,6	0,643
проміжний ризик, %	36,7	47,2	
високий ризик, %	11,6	11,2	
EUTOS індекс			
низький ризик, %	87,5	94,4	0,349
високий ризик, %	12,5	5,6	
ELTS індекс			
низький ризик, %	59,8	59,7	0,531
проміжний ризик, %	27,7	20,8	
високий ризик, %	12,5	19,5	
Час до початку терапії ІТК, міс. медіана (діапазон)	9,0 (0 – 268,0)	13,0 (0,3 – 177,0)	0,792
Час спостереження, міс. медіана (діапазон)	33,6 (2,0 – 196,2)	32,1 (3,5 – 90,2)	0,178

Примітка: ІТК – інгібітори тирозинкінази.

Оцінка ефективності терапії за критеріями ELN 2013 показала, що вже на 12 міс. терапії відсоток пацієнтів, які досягли великої молекулярної відповіді (оптимальна відповідь за критеріями ELN 2013) був значуще вищим в групі пацієнтів, які отримували нілотиніб, ніж в групі пацієнтів на терапії іматинібом (61,0 % vs 23,7 %, $p < 0,001$). Окрім того, частка пацієнтів з редукцією пухлинного клону тільки до рівня повної цитогенетичної відповіді на 12 міс. терапії (група "спостереження" за критеріями ELN 2013) була менша також серед пацієнтів, що лікувалися нілотинібом, порівняно із пацієнтами, які отримували іматиніб (8,5 % vs 20,7 %, $p < 0,001$). Більша ефективність нілотинібу виявилася також при аналізі глибокої молекулярної відповіді. На 24 міс. терапії зниження рівня експресії гена *BCR/ABL1* до рівня $\leq 0,01$ % (MB4) реєструвалося у 38,3 % пацієнтів, які отримували нілотиніб і лише у 12,4 % пацієнтів, які лікувалися іматинібом ($p < 0,001$).

Відсоток випадків досягнення повної цитогенетичної та великої молекулярної відповіді був вищим у пацієнтів,

які отримували нілотиніб, порівняно з пацієнтами, які отримували іматиніб, на 3, 6 та 12 міс. терапії (3 міс. терапії: ПЦВ 50,0 % vs 20,9 % та ВМВ 53,3 % vs 2,5 % відповідно; 6 міс. терапії: ПЦВ 57,9 % vs 24,6 % та ВМВ 55,5 % vs 8,3 % відповідно; 12 міс. ПЦВ 69,0 % vs 45,0 % та ВМВ 60,3 % vs 23,8 %, відповідно).

Аналіз динаміки редукції пухлинного клону методом Karlan-Meier показав, що пацієнти, які отримували нілотиніб, досягали повної цитогенетичної, великої молекулярної та глибокої молекулярної відповіді швидше, ніж пацієнти на терапії іматинібом (табл. 2). Медіана часу досягнення великої молекулярної відповіді та глибокої молекулярної відповіді була меншою для пацієнтів, які отримували нілотиніб (13,8 та 38,4 міс. відповідно) порівняно з пацієнтами на іматинібі (78,2 міс. і медіана не досягнута відповідно). Вірогідність досягнення ВМВ та MB4 у різні часові проміжки була вище у пацієнтів на нілотинібі порівняно з пацієнтами, що отримували іматиніб ($p < 0,001$).

Таблиця 2. Динаміка досягнення ПЦВ, ВМВ та MB4 у пацієнтів із хронічною фазою ХМЛ, які отримували терапію іматинібом та нілотинібом

Показник	Перша лінія ІТК-терапії		Відношення ризиків (95 % ДІ)	Рівень значущості, <i>p</i>
	Іматиніб (n = 937)	Нілотиніб (n = 72)		
Медіана часу досягнення ПЦВ, міс. (95 % ДІ)	19,6 (17,1 – 22,0)	6,6 (5,7 – 7,5)	0,35 (0,25 – 0,51)	$< 0,001$
Медіана часу досягнення ВМВ, міс. (95 % ДІ)	Не досягнута	13,8 (0 – 35,9)	0,30 (0,19 – 0,46)	$< 0,001$
Медіана часу досягнення MB4, міс. (95 % ДІ)	Не досягнута	38,4 (33,5 – 43,4)	0,27 (0,17 – 0,43)	$< 0,001$

Примітка: ІТК – інгібітори тирозинкінази, ДІ – довірчий інтервал, ПЦВ – повна цитогенетична відповідь, ВМВ – велика молекулярна відповідь, MB4 – глибока молекулярна відповідь.

Для оцінки довгострокових показників відповіді на терапію ІТК порівнювали показники 5-тирічної безпідйомності, загальної виживаності та виживаності без прогресії у пацієнтів, які отримували терапію іматинібом і нілотинібом (табл. 3). За весь період спостереження прогресію у фазу акселерації та/або бластного кризу зафіксо-

вано у 14,3 % (134 з 937) пацієнтів, які отримували іматиніб, та у одного пацієнта на терапії нілотинібом. Усього за період спостереження померло 13,3 % (125 з 937) пацієнтів, які отримували іматиніб, та один пацієнт, який лікувався нілотинібом.

Таблиця 3. Довгострокові показники відповіді на терапію іматинібом та нілотинібом

Показник	Перша лінія ІТК-терапії		Відношення ризиків (95 % ДІ)	Рівень значущості, <i>p</i>
	Іматиніб (<i>n</i> = 937)	Нілотиніб (<i>n</i> = 72)		
Розрахункова вірогідність 5-тирічної безпідійної виживаності (EFS), % (95 % ДІ)	70,1 (66,0 – 74,2)	91,2 (82,5 – 100,0)	3,93 (1,25 – 12,29)	0,011
Розрахункова вірогідність 5-тирічної виживаності без прогресії (PFS), % (95 % ДІ)	81,3 (78,0 – 84,6)	97,6 (92,9 – 100,0)	8,57 (1,2 – 61,33)	0,01
Розрахункова вірогідність 5-тирічної загальної виживаності (OS), % (95 % ДІ)	81,7 (78,2 – 85,2)	97,7 (91,9 – 100,0)	7,34 (1,02 – 52,17)	0,020

Примітка: ІТК – інгібітори тирозинкіназ, ДІ – довірчий інтервал, PFS – виживаність без прогресії, EFS – безпідійна виживаність, OS – загальна виживаність.

5-тирічна розрахункова вірогідність загальної виживаності (97,7 % та 81,7 %, *p* = 0,02), виживаності без прогресії (97,6 % та 81,3 %, *p* = 0,01) та безпідійної виживаності (91,2 % та 70,1 %, *p* = 0,011) була вищою в групі пацієнтів, які перебували на терапії нілотинібом, що свідчить про його вищу ефективність порівняно з іматинібом.

Для визначення впливу ініціальних клініко-лабораторних та демографічних факторів ризику, а також виб-

раного ІТК (іматинібу або нілотинібу) на ефективність терапії використано метод побудови та аналізу однофакторних моделей пропорційних інтенсивностей Кокса (однофакторний регресійний аналіз Кокса). Оцінювали вплив кожного фактора на кумулятивну вірогідність досягнення великої молекулярної відповіді, глибокої молекулярної відповіді та загальну, безпідійну виживаність і виживаність без прогресії. Результати розрахунків наведено в табл. 4 та 5.

Таблиця 4. Оцінка факторів ризику досягнення великої молекулярної відповіді та глибокої молекулярної відповіді у пацієнтів із хронічною фазою ХМЛ за результатами однофакторного регресійного аналізу Кокса

Показник	Досягнення ВМВ		Досягнення МВ4	
	Відношення ризиків (95 % ДІ)	<i>p</i>	Відношення ризиків (95 % ДІ)	<i>p</i>
Вік	1,0 (0,99 – 1,0)	0,524	1,01 (0,99 – 1,02)	0,113
Стать	1,1 (0,8 – 1,41)	0,682	0,87 (0,64 – 1,19)	0,401
Рівень гемоглобіну, г/л	1,0 (1,0 – 1,02)	0,152	1,0 (0,99 – 1,02)	0,128
Кількість лейкоц., $10^9/\text{л}$	1,0 (0,99 – 1,0)	0,071	0,997 (0,995 – 0,999)	0,008*
Кількість тромбоц., $10^9/\text{л}$	1,0 (0,99 – 1,0)	0,523	1,0 (1,0 – 1,001)	0,104
Кількість бластів, %	0,83 (0,75 – 0,93)	0,002*	0,84 (0,74 – 0,95)	0,007*
Кількість еозинофілів, %	1,01 (0,95 – 1,09)	0,690	0,89 (0,80 – 1,0)	0,041*
Кількість базофілів, %	0,93 (0,86 – 1,02)	0,138	1,02 (0,95 – 1,11)	0,564
Розмір селезінки, см	0,95 (0,92 – 0,99)	0,009*	0,94 (0,9 – 0,98)	0,005*
Термін передлікованості, міс.	0,96 (0,95 – 0,97)	<0,001*	0,97 (0,96 – 0,98)	<0,001*
Sokal індекс: низький vs проміжний та високий ризик	1,49 (0,97 – 2,27)	0,065	1,71 (1,1 – 2,67)	0,016*
Hasford індекс: низький та проміжний ризик vs високий ризик	3,23 (1,01 – 10,24)	0,036*	0,72 (0,29 – 1,81)	0,487
EUTOS індекс: низький vs високий ризик	1,08 (0,52 – 2,27)	0,831	0,96 (0,41 – 2,23)	0,916
ELTS індекс: низький та проміжний ризик vs високий ризик	3,2 (1,17 – 8,77)	0,017*	1,91 (0,77 – 4,76)	0,158
Терапія ІТК, іматиніб vs нілотиніб	0,3 (0,19 – 0,46)	<0,001*	0,27 (0,17 – 0,43)	<0,001*

Примітка: * – статистично значущі розбіжності, ВМВ – велика молекулярна відповідь, МВ4 – глибока молекулярна відповідь, ДІ – довірчий інтервал.

Результати однофакторного регресійного аналізу показали що наявність бластів у периферичній крові (*p* = 0,002), спленомегалія (*p* = 0,009), тривалий термін передлікованості (*p* < 0,001), група високого ризику за системою Hasford (*p* = 0,036), та ELTS (*p* = 0,017) і терапія іматинібом знижують вірогідність досягнення великої молекулярної відповіді на терапію ІТК у хворих на ХМЛ.

Аналіз впливу тих самих факторів на кумулятивну вірогідність досягнення глибокої молекулярної відповіді

виявив, що прогностично сприятливими факторами щодо досягнення МВ4 є клінічні ознаки ранньої хронічної фази на час встановлення діагнозу (низький рівень лейкоцитів у периферичній крові (*p* = 0,008), низький відсоток бластів у периферичній крові (*p* = 0,007), низький відсоток еозинофілів у периферичній крові (*p* = 0,041), відсутність спленомегалії (*p* = 0,005)), а також короткий термін передлікованості (*p* < 0,001) і застосування нілотинібу як терапії 1-ї лінії ІТК (*p* < 0,001).

Таблиця 5. Оцінка факторів ризику, що обумовлюють вірогідність виживаності без прогресії, безпідійної та загальної виживаності глибокої молекулярної відповіді у пацієнтів з хронічною фазою ХМЛ за результатами однофакторного регресійного аналізу Кокса

Показник	PFS		EFS		OS	
	Відношення ризиків (95 % ДІ)	<i>p</i>	Відношення ризиків (95 % ДІ)	<i>p</i>	Відношення ризиків (95 % ДІ)	<i>p</i>
Вік	1,02 (1,0 – 1,03)	0,010*	1,01 (0,995 – 1,02)	0,310	1,02 (1,006 – 1,03)	0,004*
Стать	0,95 (0,68 – 1,34)	0,781	0,88 (0,67 – 1,15)	0,348	0,95 (0,67 – 1,36)	0,790
Рівень гемоглобіну, г/л	0,99 (0,98 – 1,01)	0,202	0,99 (0,98 – 1,0)	0,158	0,99 (0,98 – 1,01)	0,353
Кількість лейкоц., 10 ⁹ /л	0,1 (0,99 – 1,0)	0,492	1,0 (0,998 – 1,0)	0,842	1,0 (0,998 – 1,003)	0,622
Кількість тромбоц., 10 ⁹ /л	1,0 (1,0 – 1,001)	0,329	1,00 (1,00 – 1,001)	0,045*	1,0 (1,00 – 1,001)	0,172
Кількість бластів, %	1,06 (0,96 – 1,18)	0,249	1,02 (0,93 – 1,12)	0,680	1,07 (0,96 – 1,19)	0,251
Кількість еозинофілів, %	1,1 (0,99 – 1,22)	0,082	1,10 (1,12 – 1,20)	0,019*	1,06 (0,94 – 1,2)	0,340
Кількість базофілів, %	1,11 (1,02 – 1,22)	0,016*	1,11 (1,04 – 1,19)	0,003*	1,11 (1,01 – 1,22)	0,030*
Розмір селезінки, см	1,07 (1,04 – 1,1)	<0,001*	1,04 (1,02 – 1,07)	<0,001*	1,07 (1,04 – 1,1)	<0,001*
Термін передлікованості, міс.	1,01 (1,01 – 1,02)	<0,001*	1,01 (1,01 – 1,013)	<0,001*	1,02 (1,01 – 1,02)	<0,001*
<u>Sokal індекс:</u> низький та проміжний vs високий ризик	0,44 (0,24 – 0,79)	0,006*	0,56 (0,35 – 0,9)	0,015*	0,44 (0,24 – 0,81)	0,008*
<u>Hasford індекс</u> низький та проміжний ризик vs високий ризик	0,35 (0,16 – 0,77)	0,009*	0,51 (0,25 – 1,04)	0,065*	0,36 (0,15 – 0,83)	0,017*
<u>EUTOS індекс</u> низький vs високий ризик	0,31 (0,15 – 0,67)	0,003*	0,4 (0,21 – 0,77)	0,007*	0,33 (0,15 – 0,73)	0,007*
<u>ELTS індекс</u> низький vs проміжний та високий ризик	0,5 (0,23 – 0,91)	0,022*	0,65 (0,41 – 1,03)	0,067*	0,51 (0,27 – 0,94)	0,030*
Терапія ІТК, іматиніб vs нілотиніб	8,57 (1,2 – 61,33)	0,032*	3,93 (1,25 – 12,29)	0,019*	7,34 (1,02 – 52,57)	0,047*

Примітка: ІТК – інгібітори тирозинкіназ, ДІ – довірчий інтервал, PFS – виживаність без прогресії, EFS – безпідійна виживаність, OS – загальна виживаність.

Однофакторний регресійний аналіз Кокса виявив вплив на загальну виживаність віку ($p = 0,004$), відсотку базофілів у периферичній крові ($p = 0,030$), терміну попереднього лікування ($p < 0,001$), груп ризику за системами Sokal ($p = 0,008$), Hasford ($p = 0,017$), EUTOS ($p = 0,007$), ELTS ($p = 0,03$) і обраного інгібітора (0,049).

При подальшому аналізі багатофакторних моделей пропорційних інтенсивностей Кокса для вибору найбільш значущих прогностичних факторів щодо досягнення великої молекулярної відповіді, глибокої молеку-

лярної відповіді та загальної виживаності пацієнтів на терапії ІТК були отримані результати, наведені в табл. 6–8.

У результаті багатофакторного регресійного аналізу найбільш значущими ініціальними факторами, що впливали на досягнення великої молекулярної відповіді на терапію ІТК, виявилися кількість бластів у периферичній крові, розмір селезінки з-під краю реберної дуги, тривалість лікування до призначення ІТК, а також вибраний ІТК (табл. 6).

Таблиця 6. Результати багатофакторного регресійного аналізу Кокса для оцінки факторів ризику досягнення великої молекулярної відповіді на терапію ІТК у пацієнтів із хронічною фазою ХМЛ

Показник	Статистична значущість, <i>p</i>	Відношення ризиків	95 % ДІ
Кількість бластів, %	0,013	0,77	0,63 – 0,95
Розмір селезінки, см	0,040	0,90	0,82 – 0,99
Термін передлікованості, міс.	<0,001	0,87	0,82 – 0,91
Терапія ІТК: іматиніб vs нілотиніб	0,002	0,25	0,10 – 0,59

Примітка: χ^2 моделі = 52,44, $p < 0,001$. ДІ – довірчий інтервал, ІТК – інгібітори тирозинкіназ.

Серед ініціальних факторів, які зумовлювали редукцію пухлинного клону до рівня глибокої молекулярної відповіді, згідно з результатами багатофакторного

регресійного аналізу найбільш значущими були тривалість лікування до призначення ІТК, а також вибраний ІТК (табл. 7).

Таблиця 7. Результати багатофакторного регресійного аналізу Кокса для оцінки факторів ризику досягнення глибокої молекулярної відповіді на терапію ІТК у пацієнтів із хронічною фазою ХМЛ

Показник	Статистична значущість, <i>p</i>	Відношення ризиків	95 % ДІ
Термін передлікованості, міс.	<0,001	0,87	0,82 – 0,91
Терапія ІТК: іматиніб vs нілотиніб	0,002	0,25	0,10 – 0,59

Примітка: χ^2 моделі = 44,09, $p < 0,001$. ДІ – довірчий інтервал, ІТК – інгібітори тирозинкіназ.

Подібний багатофакторний регресійний аналіз був проведений для виділення найбільш впливових ініціаль-

них факторів, які зумовлюють загальну виживаність пацієнтів, які отримують терапію ІТК. Виявлено, що найбільш

значущими ініціальними факторами були кількість тромбоцитів у периферичній крові на час встановлення діагнозу, наявність спленомегалії та тривалість лікування до

призначення діагнозу. При цьому вид ІТК не визначався як незалежний прогностичний фактор, який обумовлює загальну виживаність пацієнтів (табл. 8).

Таблиця 8. Результати багатофакторного регресійного аналізу Кокса для оцінки факторів, що обумовлюють загальну виживаність пацієнтів із хронічною фазою ХМЛ, які отримують терапію ІТК

Показник	Статистична значущість, <i>p</i>	Відношення ризиків	95 % ДІ
Кількість тромбоцитів, $10^9/\text{л}$	0,011	1,002	1,000–1,003
Розмір селезінки, см	0,024	1,14	1,02 – 1,28
Термін передлікованості, міс.	<0,001	1,04	1,02 – 1,05

Примітка: χ^2 моделі = 55,89, $p < 0,001$. ДІ – довірчий інтервал.

Ефективність іматинібу і нілотинібу як першої лінії терапії ХМЛ добре вивчена в межах клінічних досліджень [3–5, 13]. Однак дані, отримані в організованих дослідженнях, не завжди відображають результати терапії в реальній клінічній практиці. Багато в чому це пояснюється наявністю в клінічних дослідженнях критеріїв включення–виключення, які забезпечують однорідність групи, але водночас нівелюють особливості локальної когорти, яка може істотно вплинути на ефективність проведеної терапії. У нашому дослідженні систематизовано дані, отримані при тривалій терапії хворих на ХМЛ з використанням іматинібу й нілотинібу, та проаналізовано прогностичне значення ініціальних клініко-лабораторних і демографічних чинників щодо динаміки редукції пухлинного клону та виживаності пацієнтів із ХМЛ.

Результати проведеного дослідження показали більш виражену ефективність нілотинібу порівняно з іматинібом, що узгоджується з результатами багатоцентрових рандомізованих досліджень [13]. При цьому редукція пухлинного клону (досягнення ПЦВ, ВМВ і МВ4) відбувалася глибше і раніше у пацієнтів, які отримували нілотиніб. Кількість випадків прогресії до фази акселерації або бластного кризу, втрати досягнутої відповіді, а також смерті від захворювання, також була нижче в групі пацієнтів, які перебувають на терапії нілотинібом.

За допомогою багатофакторного аналізу чинників, що впливають на досягнення великої молекулярної відповіді і глибокої молекулярної відповіді, показано значимість обраного інгібітора поряд з клініко-лабораторними параметрами, що відображають важкість захворювання (кількістю бластів у периферичній крові, розміром селезінки з-під краю реберної дуги), а також тривалістю попередньої терапії. Разом з тим було доведено, що відмінності в ефективності іматинібу і нілотинібу виражалися тільки в динаміці відповіді, але не в показниках виживаності. Найбільш впливовим чинником як щодо ступеня редукції пухлинного клону, так і відносно ймовірності прогресії, загальної та безпідійної виживаності виявилася тривалість періоду попереднього лікування до початку терапії ІТК.

Заключення. Таким чином, отримані дані свідчать, що вибір ІТК обумовлює швидкість редукції пухлинного клону. Але найбільш впливовим прогностичним маркером серед ініціальних клініко-лабораторних та демографічних показників є термін передлікованості до початку терапії ІТК. Цей показник мінімізує не тільки прогностичний вплив ініціальних клініко-лабораторних показників на ефективність терапії ІТК, а й значення вибору ІТК 1-ї лінії терапії (іматинібу чи нілотинібу), якщо йдеться про прогнозування довгострокових показників ефективності терапії – показників виживаності. Тобто затримання зі своєчасним призначенням терапії ІТК призводить до зниження ефективності терапії іматинібом та нілотинібом, що виражається у зниженні ймовірності досягнення оптимальної відповіді на 12 міс. терапії ІТК, уповільнення редукції пухлинного клону, підви-

щенні вірогідності втрати досягнутої цитогенетичної та молекулярної відповіді та прогресії захворювання.

Автори висловлюють подяку всім лікарям-гематологам, організаторам охорони здоров'я та благодійному фонду пацієнтів "Крапля крові" за допомогу в організації діагностики і моніторингу пацієнтів із хронічною мієлоїдною лейкемією.

Список використаних джерел

1. The EUTOS population-based registry: incidence and clinical characteristics of 2904 CML patients in 20 European Countries / V. Hoffmann, M. Baccarani, J. Hasford et al. // *Leukemia*, 2015. – Vol. 29(6). – P. 1336–43.
2. *Pokaznyky diyalnosti gematologichnoyi sluzhby Ukrainy v 2016 rotsi* / V. Novak, Z. Maslyak, S. Klymenko et al. // Lviv : TzOV "ZUKTS", 2017. 44 p. (Ukrainian).
3. International Randomized Study of Interferon Vs STI571 (IRIS) 8-Year Follow up: Sustained Survival and Low Risk for Progression or Events in Patients with Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase (CML-CP) Treated with Imatinib / M. Deininger, S. O'Brien, F. Guilhot et al. // *Blood*, 2009. – Vol. 114. – P. 1126.
4. Five year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia / B. J. Druker, F. Guilhot, S. O'Brien et al. // *N. Engl. J. Med.*, 2006. – Vol. 355. – P. 2408–17.
5. Long-term benefits and risks of frontline nilotinib vs imatinib for chronic myeloid leukemia in chronic phase: 5-year update of the randomized ENESTnd trial / A. Hochhaus, G. Saglio, T. Hughes et al. // *Leukemia*, 2016. – Vol. 30(5). – P. 1044–54.
6. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia / M. Baccarani, M. Deininger, G. Rosti et al. // *Blood*, 2013. – Vol. 122. – P. 872–84.
7. Chronic myelogenous leukemia, version 1.2015. / S. O'Brien, J. Radich, C. Abboud et al. // *J. Natl. Compr. Canc. Netw.*, 2014. – Vol. 12. – P. 1590–610.
8. Prognosis of long-term survival considering disease-specific death in patients with chronic myeloid leukemia / M. Pfirrmann, M. Baccarani, S. Saussele et al. // *Leukemia*, 2016. Jan. Vol. 30(1) – P. 48–56.
9. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia / J.E. Sokal, E.B. Cox, M. Baccarani et al. // *Blood*, 1984. Vol. 63(4). – P. 789–99.
10. Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group. A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa / J. Hasford, M. Pfirrmann, R. Hehlmann et al. // *J. Natl. Cancer Inst.*, 1998. Vol. 90(11). – P. 850–8.
11. *Primenenie analiza vyzyvaemosti v zdavoohranenii s ispolzovaniem paketa statisticheskikh program SPSS* / E. Sharashova, K. Holmatova, M. Gorbatovala, A. Grzhybovskiy // *Nauka i zdavoohranenie*, 2017. – Vol. 5. – P. 5–28 (Russian).
12. *Primenenie regressii Koksa v zdavoohranenii s ispolzovaniem paketa statisticheskikh program SPSS* / E. Sharashova, K. Holmatova, M. Gorbatovala, A. Grzhybovskiy // *Nauka i zdavoohranenie*, 2017. – Vol. 6. – P. 5–27 (Russian).
13. Saglio G. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. / Saglio G., Kim D., Issaragrisil S., le Coutre P., Etienne G., Lobo C. et al. // *N. Engl. J. Med.* 2010; 362(24):2251–9.
14. Marin D. Assessment of BCR-ABL1 Transcript Levels at 3 Months Is the Only Requirement for Predicting Outcome for Patients With Chronic Myeloid Leukemia Treated With Tyrosine Kinase Inhibitors. / Marin D., Ibrahim A., Lucas C., Gerrard G., Wang L., Szydlo R. et al. // *J. Clin. Oncol.* 2012; 30(3): 232–8.
15. Early Response (Molecular and Cytogenetic) and Long-Term Outcomes in Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase (CML-CP): Exploratory Analysis of DASISION 3-Year Data / G. Saglio, H. Kantarjian, N. Shah et al. // *ASH Annual Meeting Abstracts*, 2012. – Vol. 120(21). – P. 1675.
16. Outcome of Patients with Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase (CML-CP) Based On Early Molecular Response and Factors Associated with Early Response: 4-Year Follow-up Data From Enestnd (Evaluating Nilotinib Efficacy and Safety in Clinical Trials Newly Diagnosed Patients) / A. Hochhaus, T. Hughes, G. Saglio et al. // *ASH Annual Meeting Abstracts*, 2012. – Vol. 120(21). – P. 167.

17. Improved survival in chronic myeloid leukemia since the introduction of imatinib therapy: a single-institution historical experience / H. Kantarjian, S. O'Brien, E. Jabbour et al. // *Blood*, 2012. Vol. 119(9). – P. 1981–7.

References (Scopus)

- Hoffmann V., Baccarani M., Hasford J., Lindorfer D., Burgstaller S., Sertic D. et al. The EUTOS population-based registry: incidence and clinical characteristics of 2904 CML patients in 20 European Countries. *Leukemia*. 2015;29(6):1336–43.
- Novak V., Maslyak Z., Klymenko S., Voytsitskiy Y., Bereketa Y., Prymak S. et al. Pokaznyky diyalnosti gematologichnoyi sluzhby Ukrainy v 2016 rotsi. Lviv: TzOV "ZUKTS"; 2017. 44 p. Ukrainian.
- Deininger M., O'Brien S., Guilhot F., Goldman J., Hochhaus A., Hughes T. et al. International Randomized Study of Interferon Vs ST1571 (IRIS) 8-Year Follow-up: Sustained Survival and Low Risk for Progression or Events in Patients with Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase (CML-CP) Treated with Imatinib. *Blood*. 2009;114:1126.
- Druker B., Guilhot F., O'Brien S., Gathmann I., Kantarjian H., Gattmann N. et al. Five year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2006;355:2408–17.
- Hochhaus A., Saglio G., Hughes T., Larson R., Kim D., Issaragrisil S. et al. Long-term benefits and risks of frontline nilotinib vs imatinib for chronic myeloid leukemia in chronic phase: 5-year update of the randomized ENE-STnd trial. *Leukemia*. 2016;30(5):1044–54.
- Baccarani M., Deininger M., Rosti G., Hochhaus A., Soverini S., Apperley J. et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*. 2013;122:872–84.
- O'Brien S., Radich J., Abboud C., Akhtari M., Altman J., Berman E. et al. Chronic myelogenous leukemia, version 1.2015. *J Natl Compr Canc Netw*. 2014;12:1590–610.
- Pfirschmann M., Baccarani M., Saussele S., Guilhot J., Cervantes F., Ossenkoppele G. et al. Prognosis of long-term survival considering disease-specific death in patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2016 Jan;30(1):48–56.
- Sokal J., Cox E., Baccarani M., Tura S., Gomez G., Robertson J. et al. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. *Blood*. 1984;63(4):789–99.
- Hasford J., Pfirschmann M., Hehlmann R., Allan N., Baccarani M., Kluin-Nelemans J. et al. Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group. A new prognostic score for survival of patients

with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90(11):850–8.

- Sharashova E., Holmatova K., Gorbatova M., Grzhybovskiy A. Primenenie analiza vyzyvaemosti v zdavoohranenii s ispolzovaniem paketa statisticheskikh program SPSS. *Nauka I zdavoohranenie*. 2017;5:5–28. Russian.
- Sharashova E., Holmatova K., Gorbatova M., Grzhybovskiy A. Primenenie regressii Koks v zdavoohranenii s ispolzovaniem paketa statisticheskikh program SPSS. *Nauka I zdavoohranenie*. 2017;6:5–27. Russian.
- Saglio G., Kim D., Issaragrisil S., Coutre P., Etienne G., Lobo C. et al. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med*. 2010; 362(24):2251–9.
- Marin D., Ibrahim A., Lucas C., Gerrard G., Wang L., Szydlo R. et al. Assessment of BCR-ABL1 Transcript Levels at 3 Months Is the Only Requirement for Predicting Outcome for Patients With Chronic Myeloid Leukemia Treated With Tyrosine Kinase Inhibitors. *J. Clin. Oncol*. 2012; 30(3): 232–8.
- Saglio G., Kantarjian H., Shah N., Jabbour E., Quintas-Cardama A., Steegmann J. et al. Early Response (Molecular and Cytogenetic) and Long-Term Outcomes in Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase (CML-CP): Exploratory Analysis of DASISION 3-Year Data. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2012;120(21):1675.
- Hochhaus A., Hughes T., Saglio G., Guilhot F., Al-Ali H., Rostiet G. et al. Outcome of Patients with Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase (CML-CP) Based On Early Molecular Response and Factors Associated with Early Response: 4-Year Follow-up Data From Enestnd (Evaluating Nilotinib Efficacy and Safety in Clinical Trials Newly Diagnosed Patients). *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2012;120(21):167.
- Kantarjian H., O'Brien S., Jabbour E., Garcia-Manero G., Quintas-Cardama A., Shan J. et al. Improved survival in chronic myeloid leukemia since the introduction of imatinib therapy: a single-institution historical experience. *Blood*. 2012;119(9):1981–7.

Надійшла до редколегії 26.03.2018

Отримано виправлений варіант 30.04.2018

Підписано до друку 30.04.2018

Received in the editorial 26.03.2018

Received a revised version on 30.04.2018

Signed in the press on 30.04.2018

И. Дмитренко, канд. биол. наук, И. Дягиль, д-р мед. наук, Ж. Минченко, д-р биол. наук, З. Мартина, канд. мед. наук, В. Федоренко, канд. мед. наук, Т. Шляхтиченко, канд. мед. наук, В. Шолойко, канд. биол. наук, Е. Дмитренко, канд. биол. наук, Государственное учреждение "Национальный научный центр радиационной медицины НАМН Украины", Киев, Украина

ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ОТВЕТА НА ТЕРАПИЮ ИНГИБИТОРАМИ ТИРОЗИНКИНАЗ В УКРАИНСКОМ КОГОРТЕ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ МИЕЛОИДНОЙ ЛЕЙКЕМИЕЙ

Проведено сравнение динамики редукции BCR/ABL-положительного клона у пациентов с хронической миелоидной лейкемией (ХМЛ) при длительной терапии иматинибом (ИМ) и нилотинибом (НИ), а также сформирован комплекс инициальных прогностических факторов, влияющих на редукцию лейкоэмического клона и продолжительность жизни больных ХМЛ. Из общей когорты 1095 больных ХМЛ, обследованных за период 2002–2018 гг., у 937 пациентов на терапии ИМ и 72 пациентов на терапии НИ оценена эффективность терапии по уровню экспрессии гена BCR/ABL1 и показателям выживаемости. Для определения прогностических факторов, ассоциированных с лучшим ответом на терапию и выживаемостью, использован метод регрессии Кокса.

На 12 мес. терапии процент пациентов, достигших редукции опухолевого клона до уровня большого молекулярного ответа (БМО), был существенно выше в группе пациентов, получавших НИ, чем в группе пациентов на терапии ИМ (61,0 % vs 23,7 %, $p < 0,001$). На 24 мес. терапии снижение уровня экспрессии гена BCR/ABL1 до уровня глубокого молекулярного ответа (МО4) регистрировалось у 38,3 % пациентов, получавших НИ, и только в 12,4 % пациентов, лечившихся ИМ ($p < 0,001$). Медиана времени достижения БМО и МО4 была меньше у пациентов, получавших НИ, по сравнению с пациентами на ИМ ($p < 0,001$). Доказано, что различия в эффективности ИМ и НИ выражались только в динамике ответов, но не в показателях выживаемости. Наиболее влиятельным фактором прогрессии, общей и бессобытийной выживаемости оказалась продолжительность периода лечения до начала терапии ИМ и НИ.

Нилотиниб обуславливает глубокую и быструю редукцию опухолевого клона, однако задержка со своевременным назначением терапии ингибиторами тирозинкиназ приводит к снижению эффективности терапии как иматинибом, так и нилотинибом.

Ключевые слова: ХМЛ, ингибиторы тирозинкиназ, длительность предлеченности, эффективность терапии.

I. Dmytrenko, Ph. D., I. Dyagil, M. D., Zh. Minchenko, D. Sci., Z. Martina, Ph. D., V. Fedorenko, Ph. D., T. Shlyakhtychenko, Ph. D., V. Sholoyko, Ph. D., O. Dmytrenko, Ph. D., State institution "National Scientific Center for Radiation Medicine of NAMS of Ukraine", Kyiv, Ukraine

PROGNOSTIC FACTORS OF THE TYROSINKINASE INHIBITORS THERAPY RESPONSE IN UKRAINIAN COHORT OF PATIENTS WITH CHRONIC MYELOID LEUKEMIA

To compare the dynamics of BCR/ABL-positive clone reduction in patients with chronic myeloid leukemia (CML) during long-term treatment with imatinib (IM) and nilotinib (NI) and to make a complex of initial prognostic factors that influence the reduction of leukemia clone and survival in CML patients.

The therapy efficacy by the level of BCR/ABL1 gene expression and survival rates was evaluated in 937 patients on IM and 72 patients on NI therapy from the total 1095 CML patients cohort examined during the period 2002–2018 years. The Cox regression was used to determine the prognostic factors associated with the best response to therapy and survival.

At 12 months of therapy the rate of patients who achieved reduction of tumor clone to the level of major molecular response (MMR) was significantly higher in the group of patients on NI than in the group of patients on IM (61.0 % vs 23.7 %, $p < 0.001$). At 24 months of therapy the reduction of BCR/ABL1 gene expression to the level of deep molecular response (MR4) was revealed in 38.3 % of NI patients and only 12.4 % of IM patients ($p < 0.001$). The median of the time to MMR and MR4 was less in patients treated with NI in comparison with patients with IM ($p < 0.001$). It was proved that differences in the efficiency of IM and NI referred only to the dynamics of responses, but not to survival rate. The most significant factor of progression, overall and event free survival was the duration of the period between diagnosis and the initiation of IM and NI therapy.

Nilotinib causes deep and rapid reduction of the tumor clone. However, the delay with the timely appointment of tyrosinekinases inhibitors leads to decline of efficiency imatinib as well as nilotinib.

Key words: CML, tyrosine kinases inhibitors, pretreatment, therapy efficiency.

УДК: 546.881:577.124.8

Г. Климець, асп., Р. Іскра, д-р біол. наук
Інститут біології тварин НААН, Львів

ВПЛИВ ЦИТРАТУ ВАНАДІЮ НА АКТИВНІСТЬ ЛАКТАТДЕГІДРОГЕНАЗИ В ЕРИТРОЦИТАХ КРОВІ ТА ТКАНИНАХ ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ ДІАБЕТОМ

Досліджено вплив цитрату ванадію на активність лактатдегідрогенази в еритроцитах крові та тканинах печінки, нирок і скелетного м'язу стегна лабораторних щурів з індукованим цукровим діабетом. Тварини були розділені на п'ять груп: I – контрольна, II, III, IV і V – дослідні. У тварин усіх дослідних груп експериментально індукували діабет в результаті введення алоксану. Окрім того, тварини III, IV і V груп споживали розчин цитрату ванадію в кількості 0,125, 0,5 і 2,0 мкг V/мл води. Визначення активності лактатдегідрогенази в еритроцитах та тканинах здійснювали спектрофотометричним методом, що базується на використанні спряжених систем окиснення нікотинамідних коензимів. При експериментальному діабеті спостерігалось вірогідне зростання активності лактатдегідрогенази в еритроцитах крові, скелетних м'язах та нирках, однак у печінці – вірогідне зниження активності ензиму, щодо контролю. Підвищення активності лактатдегідрогенази в еритроцитах при діабеті зумовлене виникненням оксидативного стресу, що зумовлює її пошкодження. Випоювання цитрату ванадію щурам з експериментальним діабетом сприяє нормалізації активності ензимів обміну вуглеводів, зокрема гліколізу. Цитрат ванадію нормалізує рівень глюкози в крові, сприяє впливає на еритропоез, пришвидшує дозрівання еритроцитів, посилює антиоксидантний захист у клітинах тканин організму, що сприяє нормалізації активності лактатдегідрогенази у тканинах та еритроцитах із наближенням показників її активності до контрольних значень.

Ключові слова: цитрат ванадію, лактатдегідрогеназа, еритроцити, тканини, діабет, щури.

Вступ. Цукровий діабет (ЦД) характеризується гіперглікемією та низкою інших метаболічних розладів, що відбуваються внаслідок панкреатичної інсулінонедостатності і дефектів рецепторів інсулін-чутливої тканини. Порушення вуглеводного обміну призводить до розладів кінцевої ланки анаеробного гліколізу [1].

Важливе завдання, яке зараз стоїть перед науковцями, – пошук альтернативних терапевтичних засобів для лікування цього захворювання. Причому зосереджується увага на гіпоглікемічній дії деяких мікроелементів. Зокрема, з 1980 р. сполуки ванадію розглядались як потенційні терапевтичні агенти за цукрового діабету I [2] та II типу [3]. Відомо, що сполуки ванадію із органічними лігандами володіють високою біологічною активністю, вони більш ефективні і безпечні, ніж неорганічні солі [4]. Ванадію властивий гіпоглікемічний ефект, що стимулює автофосфорилування рецепторів інсуліну, сприяє зростанню активності тирозинкінази [5]. Однак досі не знайдено сполуки ванадію, ефективність якої була б доведена для тривалого лікування та профілактики цього захворювання у людей [6].

У літературі наявні дані про те, що в інсулінчутливих тканинах, таких як печінка та жирові тканини, метаболізм ванадію може прискорюватись. У патологічних умовах (рак, інфекція чи запалення) ванадій накопичується в печінці, нирках, легенях, жировій тканині, серці, кістках і зубах [7]. Цей мікроелемент нормалізує вуглеводний обмін за рахунок імітації дії інсуліну та регуляції активності ензимів, зокрема лактатдегідрогенази (ЛДГ). Широкий спектр антидіабетичної дії сполук ванадію *in vivo* зумовлений їх здатністю впливати на метаболізм вуглеводів, ліпідів та білків, а також процеси, що контролюють експресію ключових генів, які беруть участь у цих метаболічних шляхах. Деякі автори вважають, що ванадій регенерує β -клітини острівкового апарату підшлункової залози у тварин з діабетом [8].

Метою нашої роботи було: визначити активність ЛДГ у гомогенатах тканин та еритроцитах крові щурів з експериментальним діабетом та дослідити вплив різних концентрацій цитрату ванадію на цей ензим.

Матеріали та методи дослідження. Дослідження було проведено на 40 лабораторних щурах, яких утримували у віварію Інституту біології тварин НААН, масою тіла від 100 до 120 г. Тварини були розділені на п'ять груп: I група – контрольна, II, III, IV і V – дослідні. Щурам

I та II груп давали пити чисту воду без домішок, а тваринам III, IV і V груп протягом місяця до питної води додавали розчин цитрату ванадію в кількостях 0,125, 0,5 і 2,0 мкг V/мл води. Через три тижні від початку постановки досліду, тваринам усіх дослідних груп на тлі 24-годинного голодування індукували експериментальний цукровий діабет (ЕЦД) шляхом внутрішньочеревного введення 5 % розчину алоксан моногідрату ("Синбіас") у кількості 150 мг/кг маси тіла. Динаміку змін рівня глюкози виявляли, відбираючи кров із хвостової вени, за допомогою портативного глюкометра ("Gamma M"). На 40-ву добу досліджень проводили забиття під легким наркозом. Визначення активності лактатдегідрогенази (ЛДГ, КФ 1.1.1.27) проводили в еритроцитах крові, гомогенатах печінки, стегового м'язу та нирок, спектрофотометричним методом, що базується на окисненні чи відновленні NAD-коензимів [9].

Результати досліджень та їх обговорення. Лактатдегідрогеназа є наочним діагностичним показником процесу запалення, яке відбувається за діабету. Це цитоплазматичний ензим, присутній практично у всіх системах організму. Зовнішньоклітинні та внутрішньоклітинні зміни активності ЛДГ сигналізують про пошкодження клітини або клітинну смерть [1].

Наші дослідження продемонстрували (табл.), що активність ЛДГ в еритроцитах крові щурів II групи зростала на 37 % ($p < 0,001$) щодо I групи (контрольної). Оскільки глюкоза є головним енергетичним субстратом еритроцитів, то зростання її кількості за діабету призводить до активації гліколізу та підвищення активності ЛДГ. Крім цього, відомо, що за діабету збільшується кількість молодих еритроцитів, для яких характерне переважання ізоформ ЛДГ3, ЛДГ4 та ЛДГ5, що сприяє зростанню загальної активності ЛДГ в еритроцитах [10]. Випоювання цитрату ванадію щурам з експериментальним діабетом сприяло достовірному зниженню активності ЛДГ в еритроцитах крові тварин III-, IV- та V-ї дослідних груп, відповідно на 23,0 % ($p < 0,001$), 34,5 % ($p < 0,001$) та 45,0 % ($p < 0,001$) відносно II групи з експериментальним діабетом. Таке зниження активності ЛДГ може бути зумовлене властивістю ванадію чинити сприятливий вплив на еритропоез та дозрівання клітин, пришвидшувати регенерацію червоних кров'яних клітин [11].

Таблиця. Активність лактатдегідрогенази в еритроцитах крові і тканинах щурів з експериментальним діабетом (II-V) та за дії цитрату ванадію в кількостях 0,125 мкг/мл (III), 0,5 мкг/мл (IV) і 2,0 мкг/мл (V), мкмоль/хв·мг протеїну ($M \pm m$, $n=8$)

Група	Еритроцити	Тканини		
		Печінка	М'язи	Нирки
I-контрольна	6851,0 $\pm$ 53,4	4017,5 $\pm$ 38,1	2212,1 $\pm$ 31,69	4,61 $\pm$ 0,37
II-дослідна	9365,0 $\pm$ 102,7***	3373,04 $\pm$ 26,2***	4420,34 $\pm$ 28,2***	10,16 $\pm$ 0,91***
III-дослідна	7209,33 $\pm$ 157,8####	3947,1 $\pm$ 33,5###	2558,74 $\pm$ 81,2####	10,074 $\pm$ 0,72***
IV-дослідна	6129,97 $\pm$ 202,68####	3256,61 $\pm$ 21,6*	2566,61 $\pm$ 109,35***	8,234 $\pm$ 0,69***
V-дослідна	5146,40 $\pm$ 258,2####	3283,99 $\pm$ 16,8**	3129,56 $\pm$ 313,24####	4,981 $\pm$ 0,32###

Примітка: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ – вірогідно відносно I групи, # $p<0,05$, ## $p<0,01$, ### $p<0,001$ – вірогідно відносно II групи.

У печінці щурів II групи з ЕЦД відбувається зниження активності ЛДГ на 16,04 % ($p<0,001$) стосовно контролю. Печінка – основний орган, який атакується активними формами кисню, що надмірно продукуються за діабету [12; 13]. Паренхімальні клітини печінки першочергово піддаються пошкодженням при оксидативному стресі, що зумовлює вихід цього ензиму з цитозолу клітин печінки в кров'яне русло, як наслідок активність ЛДГ в цьому органі знижується [14]. Зниження активності печінкової ЛДГ також може бути наслідком глікування ензиму, що спричиняє зміни у його структурі та функції і призводить до патофізіологічних ускладнень за цукрового діабету, модифікує імунологічні функції ЛДГ та її активність [15].

У печінці тварин III-ї групи відбувалось зростання активності ЛДГ на 17 % ($p<0,001$), в той час як у IV-й і V-й групах вірогідних змін не спостерігалось, лише незначне зниження її активності на 3,45 % та 2,64 % відповідно стосовно II групи. Відомо, що ванадій модулює I та II фази гепатометаболізуючих ензимів та посилює антиоксидантний статус печінки [16], що сприяє наближенню активності ЛДГ у цій тканині тварин III групи до контрольної. Крім цього, є повідомлення, що вказують на властивість антиоксидантів інгібувати глікування ензимів [17]. При низьких концентраціях сполуки ванадію діють за антиоксидантним механізмом, що зумовлює стабілізацію активності ЛДГ в дослідних групах через призупинення процесу її глікування. Також відомо, що сполуки ванадію покращують печінкову чутливість до інсуліну. Є дані, які показують, що ванадил сульфат зумовлює 20 %-е зниження концентрації глюкози натще, а також пригнічує вихід глюкози із печінки за гіперінсулінемії [18], що призводить до нормалізації ензимів вуглеводного обміну у кров'яному руслі та печінці.

Скелетні м'язи є основною мішенню для інсулінзалежної утилізації глюкози з крові. У цій тканині інсулін індукуює розміщення білка-транспортера глюкози (GLUT4) з внутрішнього середовища клітини до поверхонь плазматичних мембран, що призводить до підвищення рівня глюкози у м'язових клітинах. Зростання екзоцитозу GLUT4 у відповідь на інсулін спрацьовує через сигналізацію рецептора інсуліну, який індукуює активацію його сигнальних шляхів [19].

Активність ЛДГ у м'язах тварин II групи достовірно зростала вдвічі відносно контролю. Зростання активності ЛДГ у м'язах може зумовлювати ацидоз молочною кислотою, яке спричиняє метаболічні ускладнення за цукрового діабету [20].

У щурів III-, IV- і V-ї груп відбулось зниження активності ЛДГ у м'язах, відповідно, на 42,11 % ($p<0,001$), 41,94 % ($p<0,01$) та 29,2 % ($p<0,001$) стосовно II групи. Інсуліноподібний ефект ванадію проявляється стимуляцією поглинання та використання глюкози периферичними тканинами, такими як печінка та м'язи для підтримання нормального рівня глюкози в крові. У результаті підтримання нормального рівня глюкози в крові відбувається стабілізація активності ЛДГ у м'язах тварин IV- і V-ї груп [21].

Активність ЛДГ в нирках щурів II групи з ЕЦД зростала в 2,2 раза ($p<0,001$) стосовно контролю. Зростання рівня глюкози в крові та необхідності інтенсивнішого сприйняття та екскреції її нирками за цукрового діабету порушує функціонування нирок, знижує ефективність цих органів і зумовлює підвищення активності ЛДГ [22]. Високий рівень глюкози та гіпертензія відіграють головну роль у розвитку діабетичних нефропатій. Надмірне продукування сечі діабетичними щурами може спричинити втрату життєво важливих елементів, що може призвести до дисфункції цілого організму. Системний оксидативний стрес за діабету, як вважають, відіграє вирішальну роль у патофізіології захворювань нирок [23].

Цитрат ванадію сприяв нормалізації активності ЛДГ в нирковій тканині, зокрема спостерігалось зниження її активності у IV-й групі – на 18,96 % і V-й – на 51 % ($p<0,001$), стосовно II групи. Випоювання цитрату ванадію щурам сприяє нормалізації активності ензимів обміну вуглеводів та покращує загальний стан організму [24]. Проведені дослідження свідчать про відсутність побічних ефектів на ниркову тканину у тварин з ЕЦД, які отримували сполуки ванадію(IV) у комплексі з вітаміном А [25]. Іншими авторами встановлено, що ванадій сульфат нейтралізує шкоду, якої зазнають клітини нирок внаслідок оксидативного стресу [26].

Висновки

У щурів із експериментальним діабетом спостерігалось вірогідне зростання активності ЛДГ в еритроцитах крові, скелетних м'язах та нирках, а в печінці – вірогідне зниження її активності, стосовно контролю. Випоювання цитрату ванадію щурам із ЕЦД сприяло нормалізації активності ЛДГ в еритроцитах і тканинах та наближувало показники її активності до контрольних значень.

Список використаних джерел

1. Lehninger A. Principles of Biochemistry / A. Lehninger, D. Nelson, M. Cox, 2002. – Worth Pub. – 3rd ed.
2. Absorption, transport and insulin-mimetic properties of bis(maltolato)oxovanadium (IV) in streptozotocin-induced hyperglycemic rats by integrated mass spectrometric techniques / T. Iglesias-González, C. Sánchez-González, M. Montes-Bayón et al. // Anal. Bioanal. Chem., 2012. – Vol. 402. – P. 277–285.
3. Vanadium treatment of type 2 diabetes: a view to the future / K. Thompson, J. Lichter, C. LeBel et al. // Inorg. Biochem., 2009. – Vol. 103. – P. 554–558.
4. The vanadium compounds: chemistry, synthesis, insulinomimetic properties / E. Fedorova, A. Buriakina, N. Vorob'eva, N. Baranova // Biomed. Khim., 2014. – Vol. 60, №4. – P. 416–429.
5. Possible mode of action for insulinomimetic activity of vanadyl(IV) compounds in adipocytes / K. Kawabe, Y. Yoshikawa, Y. Adichi, H. Sakurai // Life Sci., 2006. – Vol. 78. – P. 2860–2866.
6. Makinen M.W. The Structural Basis of Action of Vanadyl (VO²⁺) Chelates in Cells / M.W. Makinen, M. Salehitazangi // Coord. Chem. Rev., 2014. – Vol. 279. – P. 1–22.
7. The anti-obesity effect of natural vanadium-containing Jeju ground water / S. Park, C. Youn, J. Hyun, H. You // Biol. Trace Elem. Res., 2013. – Vol. 151, № 2. – P. 294–300. doi: 10.1007/s12011-012-9557-8. Epub 2012.
8. Bolken S. Protective effect of vanadylsulfate on the pancreas of streptozotocin-induced diabetic rats / S. Bolken, R. Yanardag, S. Tunali // Diabetes Res. Clin. Pract., 2005. – Vol. 70. – P. 103–109.
9. Laboratory methods of research in biology, veterinary medicine: a guide / V. Vlizlo, I. Fedoruk, I. Ratych et al.; red. V.V. Vlizlo. – Lviv: SPOLOM, 2012. – 764 p. (In Ukrainian).
10. Xue Q. Variability of intracellular lactate dehydrogenase isoenzymes in single human erythrocytes / Q. Xue, E. Yeung // Anal. Chem., 1994. – Vol. 66, №7. – P. 1175–1178.

11. Chekman I. Vanadium: clinic, pharmacological and toxicological properties / I. Chekman, V. Kaplunenko, K. Haiduk // Ukrainian Medical J., 2016. – Vol. 1, № 111. – P. 28–32.
12. Effect of oral administration of diphenyl diselenide on antioxidant status, and activity of delta aminolevulinic acid dehydratase and isoforms of lactate dehydrogenase, in streptozotocin-induced diabetic rats / I. Kade, V. Borges, L. Savegnago et al. // Cell. Biol. Toxicol., 2009. – Vol. 25 – P. 415–424.
13. Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: A review. / V. Sanchez-Valle, N. Chavez-Tapia, M. Uribe, N. Mendez-Sanchez // Curr. Med. Chem., 2012. – Vol. 19. – P. 4850–4860.
14. Lott J. Determination of reference ranges for serum enzymes via a large interlaboratory survey / J. Lott, D. Tholen, C. Massion // Arch. Pathol. Lab. Med., 1987. – Vol. 111, №1. – P. 9–15.
15. Estimation and characterization of glycosylated carbonic anhydrase I in erythrocytes from patients with diabetes mellitus / T. Kondo, K. Murakami, Y. Ohtsuka et al. // Clinica Chimica Acta, 1987. – Vol. 166. – P. 227–236.
16. Chakraborty A. Differential modulation of xenobiotic metabolizing enzymes by vanadium during diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in Sprague-Dawley rats / A. Chakraborty, S. Selvaraj // Neoplasma, 2000. – Vol. 47, № 2. – P. 81–89.
17. Davie S. Effect of vitamin C on glycosylation of proteins / S. Davie, B. Gould, J. Yudkin // Diabetes, 1992. – Vol. 41 – P. 167–73.
18. Effects of vanadyl sulfate on carbohydrate and lipid metabolism in patients with non-insulindependent diabetes mellitus / G. Boden, X. Chen, J. Ruiz et al. // Metabolism, 1996. – Vol. 45. – P. 1130–1135.
19. Kanzaki M. Insulin receptor signals regulating GLUT4 translocation and actin dynamics / M. Kanzaki // Endocr. J., 2006. – Vol. 53 – P. 267–293.
20. *Trigonella foenum graecum* (fenugreek) seed powder improves glucose homeostasis in alloxan diabetic rat tissues by reversing the altered glycolytic, gluconeogenic and lipogenic enzymes / J. Raju, D. Gupta, A. Rao et al. // Molecular and Cellular Biochemistry, 2001. – Vol. 224, № 1-2. – P. 45–51.
21. Hypoglycemic properties of oxovanadium (IV) coordination compounds with carboxymethyl-carrageenan and carboxymethyl-chitosan in alloxan-induced diabetic mice / H. Zhang, Y. Yi, D. Feng et al. // Evidence Based Complement Altern Med., 2011. – Vol. 69, №1. – P. 67–70.
22. Karihaloo A. Anti-fibrosis therapy and diabetic nephropathy / A. Karihaloo // Curr. Diab. Rep., 2012. – Vol. 12. – P. 414–422.
23. Evaluation of trace elements and oxidative stress levels in the liver and kidney of streptozotocin-induced experimental diabetic rat model / D. Ozcelik, M. Tuncdemir, M. Ozturk, H. Uzun // Gen. Physiol. Biophys., 2011. – Vol. 30. – P. 356–363.
24. Investigation of trace element concentration in diabetic rat's tissues / J. Kowalska, M. Krośniak, R. Gryboś, W. Kwiatek // Acta Phys. Polon A, 2009. – Vol. 115. – P. 556–560.
25. Synthesis of a new insulin-mimetic antidiabetic drug containing vitamin A and vanadium(IV) salt: Chemico-biological characterizations International / A. Adam, A. Naglah, M. Al-Omar, M. Refat // Journal of Immunopathology and Pharmacology, 2017. – Vol. 30, № 3. – P. 272–281.
26. Effects of vanadium on oxidative stress and electrolytes balance of dyslipidemic male rats treated with simvastatin / S. Eweda, N. Rezk, A. Ahmed, O. Rezk // African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2018. – Vol. 12, № 7. – P. 87–96.
6. Makinen M., Salehitazangi M. The Structural Basis of Action of Vanadyl (VO₂⁺) Chelates in Cells. Coord Chem Rev. 2014;279:1-22.
7. Park S., Youn C., Hyun J., You H. The anti-obesity effect of natural vanadium-containing Jeju ground water. Biol Trace Elem Res. 2013;151(2):294-300. doi: 10.1007/s12011-012-9557-8.
8. Bolkent S., Bolkent S., Yanardag R., Tunali S. Protective effect of vanadylsulfate on the pancreas of streptozotocin-induced diabetic rats. Diabetes Res Clin Pract. 2005; 70:103-109.
9. Vlizlo V., Fedoruk R., Ratych I. et al. (red. Vlizlo V.V.). Laboratory methods of research in biology, veterinary medicine: a guide. Lviv: SPOLOM, 2012. 764 p. (In Ukrainian).
10. Xue Q., Yeung E. Variability of intracellular lactate dehydrogenase isoenzymes in single human erythrocytes. Anal Chem. 1994;66(7):1175-1178.
11. Chekman I., Kaplunenko V., Haiduk K. Vanadium: clinic, pharmacological and toxicological properties. Ukrainian Medical J. 2016;1(111):28-32.
12. Kade I., Borges V., Savegnago L., Ibukun E., Zeni G., Nogueira C., Rocha J. Effect of oral administration of diphenyl diselenide on antioxidant status, and activity of delta aminolevulinic acid dehydratase and isoforms of lactate dehydrogenase, in streptozotocin-induced diabetic rats. Cell Biol Toxicol. 2009;25:415-424.
13. Sanchez-Valle V., Chavez-Tapia N., Uribe M., Mendez-Sanchez N. Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: A review. Curr. Med. Chem. 2012;19:4850-4860.
14. Lott J., Tholen D., Massion C.. Determination of reference ranges for serum enzymes via a large interlaboratory survey. Arch Pathol Lab Med. 1987;111(1):9-15.
15. Kondo T., Murakami K., Ohtsuka Y., Tsuji M., Gasa Sh., Taniguchi N., Kawakami Y. Estimation and characterization of glycosylated carbonic anhydrase I in erythrocytes from patients with diabetes mellitus Clinica Chimica Acta. 1987;166:227-236.
16. Chakraborty A., Selvaraj S. Differential modulation of xenobiotic metabolizing enzymes by vanadium during diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in Sprague-Dawley rats. Neoplasma. 2000;47(2):81-89.
17. Davie S., Gould B., Yudkin J. Effect of vitamin C on glycosylation of proteins. Diabetes. 1992;41:167-73.
18. Boden G., Chen X., Ruiz J., Van Rossum G., Turco S. Effects of vanadyl sulfate on carbohydrate and lipid metabolism in patients with non-insulindependent diabetes mellitus. Metabolism. 1996;45:1130-1135.
19. Kanzaki M. Insulin receptor signals regulating GLUT4 translocation and actin dynamics. Endocr. J. 2006;53:267-293.
20. Raju J., Gupta D., Rao A. et al. *Trigonella foenum graecum* (fenugreek) seed powder improves glucose homeostasis in alloxan diabetic rat tissues by reversing the altered glycolytic, gluconeogenic and lipogenic enzymes. Molecular and Cellular Biochemistry. 2001;224(1-2):45-51.
21. Zhang H., Yi Y., Feng D., Wang Y., Qin S. Hypoglycemic properties of oxovanadium (IV) coordination compounds with carboxymethyl-carrageenan and carboxymethyl-chitosan in alloxan-induced diabetic mice. Evidence Based Complement Altern Med. 2011;69(1):67-70.
22. Karihaloo A. Anti-fibrosis therapy and diabetic nephropathy. Curr Diab Rep. 2012; 12:414-422.
23. Ozcelik D., Tuncdemir M., Ozturk M., Uzun H. Evaluation of trace elements and oxidative stress levels in the liver and kidney of streptozotocin-induced experimental diabetic rat model. Gen Physiol Biophys. 2011;30:356-363.
24. Kowalska J., Krośniak M., Gryboś R., Kwiatek W. Investigation of trace element concentration in diabetic rat's tissues. Acta Phys Polon A. 2009;115:556-560.
25. Adam A., Naglah A., Al-Omar M., Refat M. Synthesis of a new insulin-mimetic antidiabetic drug containing vitamin A and vanadium(IV) salt: Chemico-biological characterizations International Journal of Immunopathology and Pharmacology 2017; 30(3):272-281.
26. Eweda S., Rezk N., Ahmed A., Rezk O. Effects of vanadium on oxidative stress and electrolytes balance of dyslipidemic male rats treated with simvastatin. African Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2018; 12(7):87-96.

References (Scopus)

1. Lehninger A., Nelson D., Cox M. Principles of Biochemistry, third ed., Worth Pub. 2002.
2. Iglesias-González T., Sánchez-González C., Montes-Bayón M., Llopis-González J., Sanz-Medel A. Absorption, transport and insulin-mimetic properties of bis(maltolato)oxovanadium (IV) in streptozotocin-induced hyperglycemic rats by integrated mass spectrometric techniques. Anal Bioanal Chem. 2012; 402:277-285.
3. Thompson K., Lichter J., LeBel C., Scaife M., McNeill J., Orvig C. Vanadium treatment of type 2 diabetes: a view to the future. J Inorg Biochem. 2009; 103:554-558.
4. Fedorova E., Buriakina A., Vorob'eva N., Baranova N. The vanadium compounds: chemistry, synthesis, insulinomimetic properties. Biomed Khim. 2014;60(4):416-29.
5. Kawabe K., Yoshikawa Y., Adichi Y., Sakurai H. Possible mode of action for insulinomimetic activity of vanadyl(IV) compounds in adipocytes. Life Sci. 2006;78:2860-6.

Г. Климец, асп., Р. Іскра, д-р биол. наук,
Інститут біології живих НААН, Львів, Україна

ВЛИЯНИЕ ЦИТРАТА ВАНАДИЯ НА АКТИВНОСТЬ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ЭРИТРОЦИТАХ КРОВИ И ТКАНЯХ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ДИАБЕТОМ

Исследовано влияние цитрата ванадия на активность лактатдегидрогеназы в эритроцитах крови и тканях печени, почек и скелетной мускулатуры лабораторных крыс с индуцированным диабетом. Животные были разделены на пять групп: I – контрольная, II, III, IV и V – исследовательские. Крысам I-й и II-й групп давали пить чистую воду без добавок, а животным III, IV и V групп в питьевую воду добавляли раствор цитрата ванадия в количестве 0,125, 0,5 и 2,0 мг/мл воды. Определение активности лактатдегидрогеназы в эритроцитах и тканях осуществляли спектрофотометрическим методом, основанным на использовании сопряженных систем окисления никотинамидных кофакторов. При экспериментальном диабете наблюдалось достоверное повышение активности лактатдегидрогеназы в эритроцитах крови, скелетных мышцах и почках, однако в печени – достоверное снижение активности энзима относительно контроля. Повышение активности лактатдегидрогеназы в эритроцитах при диабете обусловлено интенсификацией процессов гликолиза. Рост активности этого энзима в мышцах вызывает ацидоз молочной кислотой. Высокий уровень глюкозы и гипертензия играют главную роль в развитии диабетических нефропатий и рост активности лактатдегидрогеназы в почках. Снижение активности энзима в печени при диабете обусловлено возникновением окислительного стресса, что приводит к

Надійшла до редколегії 05.02.2018
Отримано виправлений варіант 12.03.2018
Підписано до друку 12.03.2018

Received in the editorial 05.02.2018
Received a revised version on 12.03.2018
Signed in the press on 12.03.2018

ее повреждению. Выводка цитрата ванадия крысам с экспериментальным диабетом способствует нормализации активности энзимов обмена углеводов, в частности гликолиза. Цитрат ванадия нормализует уровень глюкозы в крови, благоприятно влияет на эритропоэз, ускоряет созревание эритроцитов, усиливает антиоксидантную защиту в клетках тканей организма, что способствует нормализации активности лактатдегидрогеназы в тканях и эритроцитах с приближением показателей ее активности к контрольным значениям.

Ключевые слова: цитрат ванадия, лактатдегидрогеназа, эритроциты, ткани, диабет, крысы.

H. Klymets, Ph. D. stud., R. Iskra, D. Sci.
Institute of Animal Biology NAAS, Lviv, Ukraine

INFLUENCE OF VANADIUM CITRATE ON LACTATE DEHYDROGENASE ACTIVITY IN BLOODY ERYTHROCYTES AND TISSUES OF RATS WITH EXPERIMENTAL DIABETES

The influence of vanadium citrate on the activity of lactate dehydrogenase in erythrocytes of blood and liver, kidney and skeletal muscle tissues of the experimental rats with induced diabetes was studied. Animals were divided into five groups: I – control, II, III, IV and V – experimental. Rats of the 1st and 2nd groups were given pure water without additives to drink, and animals of the groups III, IV and V were given drinking water, to which the solution of vanadium citrate in the amount of 0,125, 0,5 and 2,0 µg V/ml of water was added. The determination of lactate dehydrogenase activity in erythrocytes and tissues was carried out by spectrophotometric method, based on the use of conjugated oxidation systems of nicotinamide coenzymes. Under experimental diabetes, a significant increase in lactate dehydrogenase activity was observed in blood erythrocytes, skeletal muscles and kidneys. However, in the liver, a significant decrease in the enzyme activity was observed according to the control. The increase in lactate dehydrogenase activity in erythrocytes under diabetes is due to the intensification of glycolysis processes. The increase in this enzyme activity in muscles causes lactic acidosis. High levels of glucose and hypertension play a major role in the development of diabetic nephropathies and increase in lactate dehydrogenase activity in kidneys. The decrease in the enzyme activity in the liver under diabetes is due to the occurrence of oxidative stress, which leads to its damage. Watering vanadium citrate to experimentally diabetic rats promotes normalization of the activity of carbohydrate metabolism enzymes, particularly glycolysis. Vanadium citrate normalizes glucose level in the blood, favorably affects erythropoiesis, accelerates the maturation of red blood cells, enhances antioxidant defense in the cells of body tissues, which promotes normalization of lactate dehydrogenase activity in tissues and erythrocytes with the approximation of its activity indicators to control values.

Key words: vanadium citrate, lactate dehydrogenase, erythrocytes, tissues, diabetes, rats.

УДК 797.122.2/3:611.81:159.923.4

С. Федорчук, канд. біол. наук, О. Лисенко, д-р біол. наук,
Національний університет фізичного виховання і спорту України, Київ, Україна,
В. Романюк, канд. біол. наук,
Рівненський державний гуманітарний університет, Рівне, Україна

НЕЙРОДИНАМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ТА ПСИХОЛОГІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ СПОРТСМЕНОК ВИСОКОЇ КВАЛІФІКАЦІЇ З РІЗНИМ СТАЖЕМ СПОРТИВНОГО ТРЕНУВАННЯ

Метою дослідження було порівняння нейродинамічних і індивідуально-типологічних властивостей темпераменту у спортсменок високого класу з різним стажем спортивного тренування, що спеціалізувалися у веслуванні на байдарках і каное. Для визначення нейродинамічних характеристик, психофізіологічних властивостей нервової системи використовували діагностичний комплекс "Діагност-1" (М.В. Макаренко, В.С. Лизогуб); для визначення індивідуально-типологічних властивостей темпераменту застосовано тест Г. Айзенка. Переважна більшість спортсменок-каноесток характеризувалась середньою функціональною рухливістю нервових процесів і низькою силою нервової системи, зниженою ефективністю сенсомоторної діяльності, тоді як більшість спортсменок, що спеціалізувалися у веслуванні на байдарках – вище середньої функціональною рухливістю нервових процесів і середньою силою нервової системи та високою/вище середньої ефективністю сенсомоторної діяльності. У групі спортсменок з більшим спортивним стажем (веслування на байдарках) виявлено превалювання респонденток із холеричним і сангвінічним типом темпераменту, низькою та середньою емоційною стійкістю. Серед спортсменок-каноесток виявлено переважання емоційно нестійких респонденток із холеричним типом темпераменту. Більш високий психофізіологічний статус (за показниками функціональної рухливості і сили нервових процесів та ефективності сенсомоторної діяльності) продемонстрували спортсменки з більшим спортивним стажем (веслування на байдарках) порівняно зі спортсменками-каноестками, які мали менший стаж спортивного тренування. Виявлені відмінності індивідуально-типологічних властивостей вищих відділів центральної нервової системи у спортсменок-веслувальниць з різним рівнем адаптації до доєвотривалих фізичних навантажень певного типу (каное/байдарка) можуть мати прогностичну цінність і використовуватися для оптимізації спортивного удосконалення в даному виді спорту.

Ключові слова: спортсменки високої кваліфікації, веслування на байдарках і каное, темперамент, нейродинамічні властивості.

Вступ. За сучасними уявленнями конституція (соматотип) є сукупністю морфологічних і функціональних (у т. ч. психічних і поведінкових) особливостей організму, яка склалася на базі спадкової програми під впливом модифікуючих чинників середовища існування, що формує його реактивність (конституція: генотип – фенотип – реактивність) [20]. Окрім того, конституція визначає адаптаційні особливості організму, своєрідність перебігу фізіологічних, біохімічних і патологічних процесів, а також схильність до певних соматичних хвороб, у т. ч. психічної і поведінкової патології [1, 10, 22, 25]. На сьогодні поняття конституції містить не тільки морфологічні, але й фізіологічні, психологічні та поведінкові особливості організму, його реактивність, опірність до хвороботворних чинників, особливості процесів обміну, які пов'язані з впливом нервової та ендокринної систем [20]. При цьому актуальною залишається думка

І.П. Павлова, що "темперамент є важливою частиною конституції" [26]. Отже, тип нервової системи як нейроморфологічну і нейрофізіологічну основу темпераменту можна вважати в цілому важливою складовою конституції (соматотипу) людини.

Зазначимо, що моніторинг функціонального стану центральної нервової системи спортсменів у взаємозв'язку з їх індивідуально-типологічними характеристиками є одним із методів прогнозування надійності та успішності спортивної діяльності [6, 11, 16, 27]. Відомо, що у спортсменів, які регулярно займалися одним із видів спорту, показники властивостей основних нервових процесів, психологічні характеристики різняться, що свідчить про узгодженість, адекватність розвитку властивостей основних нервових процесів, психологічних якостей характеру фізичних навантажень [11, 15, 16, 23]. Доведено, що результативність у видах спорту на витривалість залеж-

нить від сили (працездатності головного мозку) нервових процесів, тоді як результативність у швидкісних, силових, швидкісно-силових та ігрових видах – від швидкісних процесів у нервовій системі спортсменів [12]. Проте знання про взаємозв'язки типологічних властивостей основних нервових процесів, психомоторних функцій з особливостями занять різними видами спорту недостатні, не задовольняють практичні вимоги фахівців. Подальше дослідження особливостей формування нейродинамічних функцій, у т. ч. і індивідуально-типологічних властивостей, основних нервових процесів спортсменів у взаємозв'язку з успішністю спортивної діяльності, рівнем адаптації до довготривалих специфічних фізичних навантажень безумовно має не лише теоретичний інтерес, але й практичне значення [11, 12, 24].

На разі актуальним стає визначення особливостей нейродинамічних характеристик і індивідуально-типологічних властивостей темпераменту спортсменок високого класу, що спеціалізуються у веслуванні на каное (порівняно з веслувальницями на байдарках), оскільки цей вид спорту у жінок нещодавно включено до олімпійських видів спорту.

Метою дослідження було порівняння нейродинамічних характеристик і індивідуально-типологічних властивостей темпераменту спортсменок високого класу з різним стажем спортивного тренування, що спеціалізувалися в циклічному виді спорту, а саме: веслування на байдарках і каное.

Об'єкт і методи досліджень. У дослідженні брали участь 12 спортсменок високого класу (майстри спорту, майстри спорту міжнародного класу і заслужені майстри спорту) жіночої статі, вид спорту – веслування на байдарках і каное, у віці 19–24 років. Для визначення нейродинамічних характеристик спортсменок використовували діагностичний комплекс "Діагност-1" (М.В. Макаренко, В.С. Лизогуб) [13, 14, 18]. Для визначення індивідуально-типологічних властивостей темпераменту обстежених спортсменок застосовувався тест Г. Айзенка (з виділенням даних за шкалою нейротизму, що виявляє рівень емоційної стійкості індивіда) [2, 4, 7]. Статистичну обробку даних проводили за допомогою методів непараметричної статистики. Отримані результати обробляли методами статистичного аналізу за допомогою комп'ютерної програми STATISTICA 6.0.

При проведенні комплексних біологічних досліджень за участю спортсменів згідно з принципами 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 і науки України.

Результати та їх обговорення. У групу обстежених увійшли спортсменки, що займаються циклічним видом спорту, який характеризується повторенням одних і тих самих рухових актів і високою функціональною стійкістю центральної нервової системи (ЦНС) до монотонії, що стосується веслування на байдарках і каное на довгі дистанції (10 000 м). Спеціальна витривалість у циклічних видах спорту, як відомо, залежить від довжини дистанції [19, 21]. Веслування на дистанції 500–1000 м характеризується навантаженнями анаеробно-аеробного характеру і стійкістю ЦНС до недостатнього кисневого постачання [5, 21]. Крім того, робота на витривалість формує високу стійкість ЦНС до перешкод. Особлива здатність до довготривалих циклічних навантажень притаманна спортсменам з сильною зрівноваженою нервовою системою і невисоким рівнем рухливості (флегматикам) [21].

Відповідно до мети роботи досліджувалися властивості нервової системи (у т. ч. функціональна рухливість нервових процесів – ФРНП і сила нервових процесів – СНП), ефективність сенсомоторної діяльності, індивідуально-типологічні властивості темпераменту спортсменок, що були розподілені на дві групи: I група – спортсменки, які спеціалізувалися у веслуванні на каное ($n=5$) і II група – спортсменки, які спеціалізувалися у веслуванні на байдарках.

За віком і загальним спортивним стажем виділені групи не відрізнялись, але стаж у веслуванні і спеціальний спортивний стаж (каное/байдарка) був значуще різним у обстежених спортсменок (табл. 1): у II групи (веслування на байдарках) потрапили більш досвідчені спортсменки.

За вимірюваними психофізіологічними показниками виділені групи спортсменок відрізнялись не тільки за показниками функціональної рухливості нервових процесів, сили нервових процесів, але і за часом мінімальної експозиції сигналів у режимі зворотного зв'язку, що характеризував ефективність сенсомоторної діяльності (табл. 1). За отриманими результатами переважна більшість спортсменок I групи (веслування на каное) характеризувалась середньою функціональною рухливістю нервових процесів і низькою силою нервових процесів, тоді як більшість спортсменок II групи (веслування на байдарках) – вище середньої ФРНП і середньої СНП.

Таблиця 1. Психофізіологічні показники спортсменок-веслувальниць з різним рівнем адаптації до довготривалих фізичних навантажень ($n=12$), Ме [25 %, 75 %]

Показники	I група (каное), $n=5$	II група (байдарка), $n=7$
Показник функціональної рухливості нервових процесів (ФРНП), Т1, с	71,00 [69,00; 75,00]*	62,00 [59,00; 66,00]
Мінімальний час експозиції сигналів, мс	160,00 [140,00; 160,00]*	80,00 [60,00; 100,00]
Час виходу на мінімальну експозицію, с	48,00 [36,00; 56,00]	34,00 [33,00; 41,00]
Показник сили нервових процесів (тест 5 хв), кількість подразників	558,00 [551,00; 602,00]**	678,00 [660,00; 795,00]
Показник ФРНП (тест 5 хв), Т2, с	72,50 [69,17; 72,93]**	62,14 [58,59; 62,28]
Мінімальний час експозиції сигналів (тест 5 хв), мс	100,00 [80,00; 120,00]*	40,00 [20,00; 80,00]
Час виходу на мінімальну експозицію (тест 5 хв), с	112,00 [91,00; 158,00]	135,00 [103,00; 202,00]
Показник ФРНП (режим нав'язаного ритму), сигн/хв.	90,00 [90,00; 100,00]	90,00 [90,00; 110,00]
Показник сили нервових процесів (режим нав'язаного ритму), % помилок	23,17 [18,23; 25,72]*	13,46 [12,61; 17,89]
Показник сили нервових процесів (режим нав'язаного ритму), кількість помилок	136,00 [107,00; 151,00]*	79,00 [74,00; 101,00]
Вік, роки	19 [19; 21]	22 [21; 23]
Спеціальний спортивний стаж (каное/байдарка), роки	6,00 [5,00; 6,00]**	12,00 [11,00; 13,00]
Спортивний стаж (веслування), роки	9,00 [7,00; 10,00]*	12,00 [11,00; 13,00]
Загальний спортивний стаж, роки	16,00 [9,00; 18,00]	15,00 [11,00; 17,00]

Примітки: * $p<0.05$, ** $p<0.01$ – значущі різниці між I і II групами за тестом Манна-Уїтні.

Загалом, за психофізіологічними показниками спортсменки II групи (байдарка) продемонстрували значуще вищі результати ($p < 0.05$, $p < 0.01$). Як було зазначено, стаж у веслуванні і спеціальний спортивний стаж (каное/байдарка) був значуще різним у обстежених спортсменок: в II групу потрапили більш досвідчені спортсменки, тобто більш адаптовані до довготривалих специфічних фізичних навантажень. Тому можна стверджувати, що веслування загалом сприяє розвитку, вдосконаленню індивідуально-типологічних властивостей центральної нервової системи, що цілком узгоджується з відомими літературними даними про вплив фізичних навантажень і занять різними видами спорту на формування і стан цих властивостей [11, 12, 15, 16].

Серед індивідуально-психологічних якостей, як основи ефективності діяльності будь-якого спортсмена, зокрема веслувальника, чільне місце займають ті, котрі за своєю сутністю належать до генетично зумовлених властивостей (нейродинамічні, психомоторні, темпераментальні) [3, 4, 7, 8]. За результатами тесту Г. Айзенка весь контингент обстежуваних був розділений за типом темпераменту (холерик, сангвінік, флегматик, меланхолік), а також за рівнем емоційної стійкості (нейротизма):

1–10 балів – емоційно стійкі спортсменки, 11–12 балів – спортсменки з середньої емоційною стійкістю, 13–14 балів – емоційно нестійкі, 15–24 балів – з високою емоційною нестійкістю. За типом темпераменту всі обстежені спортсменки розподілилися таким чином: холерики – 41,7 %, сангвініки – 25,0 %, меланхоліки – 16,7 %, флегматики – 8,3 %, і проміжні типи: 8,3 % (сангвініки-флегматики). Відповідно до результатів за шкалою екстраверсії спортсменки розподілилися таким чином: 58,3 % екстравертів, 16,7 % амбівертів, 25,0 % інтровертів; за шкалою емоційної стійкості: спортсменки з високою емоційною стійкістю – 33,3 %, із середньою емоційною стійкістю – 8,3 %, 58,3 % спортсменок виявилось емоційно не стійких. За вимірюваними темпераментними характеристиками виділені групи спортсменок (каное/байдарка) за тестом Манна-Уїтні не відрізнялись (табл. 2). У групі спортсменок з вищим рівнем адаптації до довготривалих фізичних навантажень (веслування на байдарках) виявлено перевагу респонденток з низькою та середньою емоційною стійкістю, холеричним і сангвінічним типом темпераменту. Серед спортсменок-каноеїсток виявлено переважання емоційно нестійких респонденток з холеричним типом темпераменту.

Таблиця 2. Індивідуально-типологічні властивості темпераменту спортсменок за тестом Г. Айзенка ($n = 12$), Me [25 %, 75 %]

Показники	I група (каное), $n=5$	II група (байдарка), $n=7$
Показник шкали правдивості	5,00 [2,00; 6,00]	4,00 [3,00; 5,00]
Показник шкали "Екстраверсія"	11,00 [9,00; 15,00]	15,00 [13,00; 16,00]
Показник шкали "Емоційна стійкість"	15,00 [7,00; 17,00]	14,00 [9,00; 15,00]

Майже всі досліджувані властивості психофізіологічних функцій обстежених спортсменок були пов'язані з віком і спортивним стажем, окрім динамічності нервових процесів, яка визначалась за часом виходу на мінімальну експозицію в режимі зворотного зв'язку. Динамічність нервових процесів була взаємопов'язана з показником за шкалою правдивості ($r_s = -0,73$, $p < 0.01$) за тестом Г. Айзенка, що визначає рівень демонстративності поведінки і орієнтованості на соціальне схвалення: чим вищою виявився рівень демонстративності спортсменок, тим швидше вони досягали максимальної ефективності сенсомоторної діяльності в режимі зворотного зв'язку впродовж 5 хв.

Отримані дані підтверджують результати багатьох вітчизняних і зарубіжних дослідників про вікову динаміку властивостей нервових процесів і сенсомоторних функцій [8, 9, 12, 17]. Окрім того, відомо, що на формування та стан цих властивостей у різні вікові періоди можуть впливати фізичні навантаження, зокрема заняття спортом [11, 15, 16, 27].

Виявлені відмінності індивідуально-типологічних властивостей вищих відділів центральної нервової системи у спортсменок-веслувальниць з різним рівнем адаптації до довготривалих фізичних навантажень певного типу (каное/байдарка) можуть мати прогностичну цінність і використовуватися для оптимізації спортивного удосконалення в даному виді спорту.

Висновки. Більш високий психофізіологічний статус (за показниками функціональної рухливості нервових процесів, сили нервових процесів і ефективності сенсомоторної діяльності) продемонстрували спортсменки, які спеціалізувалися у веслуванні на байдарках, порівняно зі спортсменками-каноеїстками. У групі спортсменок з більшим спортивним стажем (веслування на байдарках) виявлено перевагу респонденток із холеричним і сангвінічним типом темпераменту, низькою та середньою емоційною стійкістю. Серед спортсменок-

каноеїсток виявлено переважання емоційно нестійких респонденток із холеричним типом темпераменту. Виявлені відмінності індивідуально-типологічних властивостей вищих відділів центральної нервової системи у спортсменок-веслувальниць з різним рівнем адаптації до довготривалих фізичних навантажень певного типу (каное/байдарка) можуть мати прогностичну цінність і використовуватися для оптимізації спортивного удосконалення в даному виді спорту.

Перспективи подальших досліджень у даному напрямі. Цікавим є подальше дослідження з проведенням порівняльного аналізу психологічних і психофізіологічних показників у спортсменів, що спеціалізуються в різних видах спорту та в процесі професійної діяльності зазнають впливу навантажень різних типів.

Список використаних джерел

- Атаман О.В. Патофізіологія : в 2 т. / О.В. Атаман. – Вінниця, 2012. – Т. 1.
- Бурлачук Л.Ф. Словарь-справочник по психодиагностике / Л.Ф. Бурлачук, С.М. Морозов. – СПб., 1999.
- Вейнберг Р.С. Психология спорта / Р.С. Вейнберг, Д. Голд. – К., 2014.
- Воронова В. І. Психология спорта / В. І. Воронова : навч. посіб. для студ. виш. навч. закл., – К., 2007.
- Зимкин Н.В. Физиология человека / Н.В. Зимкин. – М., 1975.
- Ильин Е.П. Дифференциальная психофизиология / Е.П. Ильин. – СПб., 2001.
- Кружева Т.В. Дослідження деяких темпераментальних характеристик студентів – майбутніх соціальних працівників / Т.В. Кружева // Актуальні проблеми психології : зб. наук. пр. Інституту психології імені Г.С. Костюка НАПН України, 2012. – Т. V, Вип. 12.
- Куценко Т.В. Стан психофізіологічних функцій у дітей молодшого шкільного віку : автореф. дис... канд. біол. наук : 03.00.13 / Т.В. Куценко. – К., 2000.
- Куценко Т.В. Стан властивостей психофізіологічних функцій у дітей старшого дошкільного та молодшого шкільного віку і вплив на них соціальної ізоляції / Т.В. Куценко, Г.М. Чайченко // Фізіологічний журнал, 1999. – Т. 45. – С. 100–106.
- Лозниця В.С. Психология і педагогіка: основні положення. Типи нервової системи і темпераменту / В.С. Лозниця. – К., 2003.
- Лысенко Е.Н., Шинкарук О.А. Влияние на проявление нейродинамических свойств спортсменов полового диморфизма и напряженной

физической работы / Е.Н. Лысенко, О.А. Шинкарук // Наука и спорт: современные тенденции, 2015. – Т. 6, № 1. – С. 11–18.

12. Макаренко М.В. Онтогенез психофізіологічних функцій людини / М.В. Макаренко, В.С. Лизогуб // Черкаси, 2011.

13. Макаренко М.В. Комп'ютерна система "Діагност-1" для визначення нейродинамічних властивостей вищої нервової діяльності людини / М.В. Макаренко, В.С. Лизогуб // Особливості формування та становлення психофізіологічних функцій в онтогенезі : мат. Всеукр. наук. симпозиуму. – Черкаси, 2003. – С. 60.

14. Макаренко М.В. Методичні вказівки до практикуму з диференціальної психофізіології та фізіології вищої нервової діяльності людини / М.В. Макаренко, В.С. Лизогуб, О.П. Безкопильний. – Київ-Черкаси, 2014.

15. Макаренко Н. Формирование свойств нейродинамических функций у спортсменов / Н. Макаренко, В. Лизогуб, А. Безкопильный // Наука в олимпийском спорте, 2005. – № 2. – С. 80–85.

16. Макаренко М.В. Нейродинамічні властивості спортсменів різної кваліфікації та спеціалізації / М.В. Макаренко, В.С. Лизогуб, О.П. Безкопильний // Актуальні проблеми фізичної культури і спорту, 2004. – № 4. – С. 105–109.

17. Психофізіологія : навч. посіб. / М.Ю. Макачук, Т.В. Куценко, В.І. Кравченко, С.А. Данилюк. – К., 2011.

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. / В.Н. Платонов. – К., 2015. – Кн. 1.

20. Романюк В.Л. Реактивність та психічне здоров'я особистості // Психологія: реальність і перспективи : зб. наук. пр. Рівненського державного гуманітарного університету / В.Л. Романюк, Ю.І. Пилипака. – Вип. 7. – Рівне, 2016.

21. Солодков А.С. Физиология человека. Общая. Спортивная. Возрастная : учебник / А.С. Солодков, Е.Б. Сологуб. – М., 2001.

22. Слюсарев А.О. Жукова С.В. Біологія / А.О. Слюсарев, С.В. Жукова ; переклад з рос. В.О. Мотузного. – К., 1992.

23. Индивидуально-психологические характеристики учащейся молодежи, занимающейся разными видами спорта / С.В. Тукаев, Е.Н. Долгова, Т.В. Васека та ін. // Спортивная медицина и физическая реабилитация, 2017. – № 1. – С. 64–71.

24. Влияние психоэмоционального напряжения на функциональное состояние нервно-мышечного аппарата и эффективность сенсомоторной деятельности высококвалифицированных спортсменов / С.В. Федорчук, Е.Н. Лысенко, Е.В. Колосова та ін. // Слобожанський науково-спортивний вісник, 2017. – Т. 60, № 4. – С. 109–116. – DOI: <http://dx.doi.org/10.15391/sns.v.2017-4.019>

25. Філімонов В.І. Клінічна фізіологія / В.І. Філімонов. – К., 2013.

26. Черноуцкая М.В. Диагностика внутренних болезней. Общая семиотика / М.В. Черноуцкая. – М., 1954.

27. Шинкарук О. Влияние полового диморфизма и физических нагрузок на проявление нейродинамических свойств у спортсменов высокого класса / О. Шинкарук, Е. Лысенко // Наука в Олимпийском спорте, 2004. – № 1. – С. 75–79.

References (Scopus)

1. Ataman O. Patofiziologiya: V 2-kh tomakh. [Pathophysiology: In 2 volumes]. T. 1, Vinnytsya, 2012. Ukrainian.

2. Burlachuk L., Morozov S. Psikhodiagnosticheskiye metody issledovaniya lichnosti [Psychodiagnostic methods of personality research]. Kyiv: Znaniye; 1982. Russian.

3. Veynberh R., Hould D. Psikhologiya sportu [Sports Psychology]. K.: Olimp. I-ra; 2014. Ukrainian.

4. Voronova V. Psikhologiya sportu: navch. posib. dlya stud. vyshch. navch. zakl. [Sport Psychology: teach. guidances. for students. HI. teach. bookmark.]. K.: Olimp. I-ra; 2007. Ukrainian.

5. Zimkin N. Fiziologiya cheloveka [Human physiology]. M., 1975. Russian.

6. Ilyin Ye. Dyfferentsyal'naya psikhofyziologiya [Differential psychophysiology]. SPb.: Pyter; 2001. Russian.

7. Kruzheva T. Doslidzhennya deyaknykh temperamental'nykh kharakterystyk studentiv – maybutnikh sotsial'nykh pratsivnykiv [Research of some temperamental characteristics of students – future social workers]. Aktual'ni problemy psikhologii: Zbirnyk naukovykh prats' Instytutu psikhologii imeni H.S. Kostyuka NAPN Ukrainy – Current problems of psychology: Collection of scientific works of the Institute of Psychology named after GS Kostyuk NAPN of Ukraine. K., 2012, T.V, V.12. Ukrainian.

8. Kutsenko T. Stan psikhofiziologichnykh funktsii u ditei molodshoho shkilnoho viku [The state of primary school children's psychophysiological functions]. Extended abstract of candidate's thesis. Kyiv, 2000. Ukrainian.

9. Kutsenko T., Chaychenko G. Stan vlastyvostry psikhofiziologichnykh funktsiy u ditei starshoho doshkil'nogo ta molodshoho shkil'nogo viku i vplyv na nykh sotsial'noyi izolyatsiyi [The state of the properties of psychophysiological functions in children of the senior preschool and junior school age and the influence on them of social isolation]. Fiziologichnyy zhurnal – Physiological journal. 1999, T.45: 100-106. Ukrainian.

10. Loznytsya V. Psikhologiya i pedahohika: osnovni polozhennya. Typy nervovoyi systemy i temperament [Psychology and pedagogy: the main provisions. Types of the nervous system and temperament]. K., 2003. Ukrainian.

11. Lysenko Ye., Shinkaruk O. Vliyaniye na proyavleniye neyrodinamicheskikh svoystv sportsmenov polovogo dimorfizma i napryazhennoy fizicheskoy raboty [Influence on the manifestation of neurodynamic properties of athletes of sexual dimorphism and strenuous physical work]. Nauka i sport: sovremennyye tendentsii – Science and Sport: Modern Trends. 2015, T.6, №1: 11-18. Russian.

12. Makarenko M., Lyzohub V. Ontohenez psikhofiziologichnykh funktsiy lyudyny [Ontogenesis of psychophysiological functions of a person]. Cherkasy, 2011. Ukrainian.

13. Makarenko M., Lyzohub V. Komp'yuterna sistema "Diahnost-1" dlya vyznachennya neyrodinamichnykh vlastyvostry vyshchoyi nervovoyi diyal'nosti lyudyny [Computer system "Diagnostic-1" for determination of neurodynamic properties of higher human nervous activity]. Osoblyvosti formuvannya ta stanovlennya psikhofiziologichnykh funktsiy v ontonezi: Mat. Vseukr. nauk. Sympoziumu – Features of formation and becoming of psychophysiological functions in ontogenesis: Mat. Ukr. sciences symposium. Cherkasy, 2003: 60. Ukrainian.

14. Makarenko M., Lyzohub V., Bezkoptyl'nyy O. Metodychni vказivky do praktykumu z dyferentsial'noyi psikhofiziologiyi ta fiziologiyi vyshchoyi nervovoyi diyal'nosti lyudyny [Methodical instructions to the practical works on differential psychophysiology and physiology of higher human nervous activity]. Kyiv-Cherkasy, 2014. Ukrainian.

15. Makarenko N., Lizogub V., Bezkoptyl'nyy A. Formirovaniye svoystv neyrodinamicheskikh funktsiy u sportsmenov [Formation of the properties of neurodynamic functions in athletes]. Nauka v olimpiyskom sporте – Science in the Olympic sport. 2005, №2: 80-85. Russian.

16. Makarenko M., Lyzohub V., Bezkoptyl'nyy O. Neyrodinamichni vlastyvostry sportsmeniv rizonoyi kvalifikatsiyi ta spetsializatsiyi [Neuron dynamic properties of athletes of different qualifications and specialization]. Aktual'ni problemy fizychnoyi kul'tury i sportu –Actual problems of physical culture and sports. 2004, № 4: 105-109. Ukrainian.

17. Makarchuk M., Kutsenko T., Kravchenko V., Danylov S. Psikhofiziologiya: navchal'nyy posibnyk [Psychophysiology: textbook]. K., 2011. Ukrainian.

18. Shynkaruk O., Lysenko O., Hunina L., Karlenko V., Zemtsova I., Oli-shevs'kyi S. et al. Medyko-biologichne zabezpechennya pidhotovky sportsmeniv zbirnykh komand Ukrayiny 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. Ukrainian.

19. Platonov V. Sistema podgotovki sportsmenov v olimpiyskom sporте. 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. Russian.

20. Romanyuk V., Pylypaka Yu. Reaktyvnist' ta psikhichne zdorov'ya osobystosti [Reactivity and mental health of personality]. Psikhologiya: real'nist' i perspektivy: Zbirnyk naukovykh prats' Rivnens'koho derzhavnoho humanitarnoho universytetu – Psychology: reality and prospects: Collection of scientific works of Rivne State Humanitarian University. V.7., Rivne, 2016. Ukrainian.

21. Solodkov A., Sologub Ye. Fiziologiya cheloveka. Obshchaya. Sportivnaya. Vozrastnaya: Uchebnyk [Human physiology. The total. Sports. Age: the Textbook]. M., 2001. Russian.

22. Slysaryev A., Zhukova S. Biologiya [Biology]. Pereklad z ros. V.O. Motuznoho [Translated from Russian VO Motuznyy]. K., 1992. Ukrainian.

23. Tuksaev S., Dolgova Ye., Vasheka T., Fedorchuk S., Lysenko Ye., Kolosova Ye. 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. Russian.

24. 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 naukovy-sportivnyy visnik – Slobozhanskyi herald of Science and Sport. 2017; 4(60): 109-116. Russian.

25. Filimonov V. Klinichna fiziologiya [Clinical physiology]. K., 2013. Ukrainian.

26. Chernourtskiy M. Diagnostika vnutrennikh bolezney. Obshchaya semiotika [Diagnosis of internal diseases. General semiotics]. M., 1954. Russian.

27. Shinkaruk O., Lysenko Ye. Vliyaniye polovogo dimorfizma i fizicheskikh nagruzok na proyavleniye neyrodinamicheskikh svoystv u sportsmenov vysokogo klassa [Influence of sexual dimorphism and physical loads on the manifestation of neurodynamic properties in high-class athletes]. Nauka v Olimpiyskom sporте – Science in the Olympic sport. 2004, №1: 75-79. Russian.

Надійшла до редакції 05.02.2018
Отримано виправлений варіант 06.03.2018
Підписано до друку 06.03.2018

Received in the editorial 05.02.2018
Received a revised version on 06.03.2018
Signed in the press on 06.03.2018

С. Федорчук, канд. биол. наук, О. Лисенко, д-р биол. наук,
Национальный университет физического воспитания и спорта Украины, Київ, Украина,
В. Романюк, канд. биол. наук
Ровненский государственный гуманитарный университет, Ровно, Украина

НЕЙРОДИНАМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ПСИХОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СПОРТСМЕНОВ ВЫСОКОЙ КВАЛИФИКАЦИИ С РАЗЛИЧНЫМ СТАЖЕМ СПОРТИВНОЙ ТРЕНИРОВКИ

Целью исследования было сравнение нейродинамических и индивидуально-типологических свойств темперамента у спортсменов высокого класса с разным стажем спортивной тренировки, специализировавшиеся в гребле на байдарках и каноэ. Для определения нейродинамических характеристик, психофизиологических свойств нервной системы использовали диагностический комплекс "Диагност-1" (М. Макаренко, В. Лизогуб) для определения индивидуально-типологических свойств темперамента – тест Г. Айзенка. Подавляющее большинство спортсменов-каноистов характеризовалась средней функциональной подвижностью нервных процессов и низкой силой нервной системы, пониженной эффективностью сенсомоторной деятельности, тогда как большинство спортсменов, специализирующихся в гребле на байдарках, – выше средней функциональной подвижностью нервных процессов, средней силой нервной системы и высокой / выше средней эффективностью сенсомоторной деятельности. В группе спортсменов с большим спортивным стажем (гребля на байдарках) выявлено преобладание респондентов с холерическим и сангвиническим типом темперамента, низкой и средней эмоциональной устойчивостью. Среди спортсменов-каноистов выявлено преобладание эмоционально неустойчивых респондентов с холерическим типом темперамента. Более высокий психофизиологический статус (по показателям функциональной подвижности и силы нервных процессов, а также эффективности сенсомоторной деятельности) продемонстрировали спортсменки с большим спортивным стажем (гребля на байдарках) по сравнению с спортсменками-каноистками, которые имели меньший стаж спортивной тренировки. Выявленные различия индивидуально-типологических свойств высших отделов центральной нервной системы у спортсменов с различным уровнем адаптации к долговременным физическим нагрузкам определенного типа (каноэ/байдарка) могут иметь прогностическую ценность и использоваться для оптимизации спортивного совершенствования в данном виде спорта.

Ключевые слова: спортсменки высокой квалификации, гребля на байдарках и каноэ, темперамент, нейродинамических свойства.

S. Fedorchuk, Ph. D., O. Lusenko, D. Sci.
National University of Physical Education and Sports of Ukraine, Kyiv, Ukraine,
V. Romanyuk, Ph. D.
Rivne State Humanitarian University, Rivne, Ukraine

NEURODYNAMIC PROPERTIES AND PSYCHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF HIGH QUALIFICATION SPORTSMEN WITH DIFFERENT SPORTS TRAININGS

The purpose of the study was to compare the neurodynamic and individual-typological properties of temperament in high-class athletes with a different experience of sports training specializing in kayaking and canoeing. Diagnostic complex Diagnostic-1 was used to determine neurodynamic characteristics, psychophysiological properties of the nervous system (MV Makarenko, VS Lyzohub); to determine the individual-typological properties of temperament – the test H.J. Eysenk. The overwhelming majority of athletes-kayakers were characterized by the average functional mobility of the nervous processes and the low strength of the nervous system, the reduced efficiency of sensorimotor activity, while the majority of athletes specializing in kayaking – above the average functional mobility of the nervous processes and the average strength of the nervous system and high / above average efficiency of sensorimotor activity. In the group of athletes with a great athletic experience (kayaking), the prevalence of respondents with choleric and sanguine type of temperament, low and average emotional resistance was revealed. Among the athletes-kanoists the predominance of emotionally unstable respondents with a choleric type of temperament was revealed. The higher psycho-physiological status (on the indicators of functional mobility and the strength of the nerve process and the efficiency of sensorimotor activity) was demonstrated by athletes with a large athletic experience (kayaking), as compared to athletes-kanoists who were less experienced in athletic training. The revealed differences in the individual-typological properties of the higher parts of the central nervous system in athletes with different levels of adaptation to long-term physical activity of a certain type (canoe / kayak) can have a predictive value and are used to optimize sports improvement in this sport.

Key words: athletes of high qualification, kayaking, canoeing, temperament, neurodynamic properties.

УДК 616-006.004.576.112

A. Nehelia, Ph. D. stud., V. Nikulina, Ph. D.,
N. Senchylo, assist. prof., Ie. Torgolo, Ph. D.,
L. Garmanchuk, D. Sci.

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

ADHESIVE, MIGRATING AND LACTATE DEHYDROGENASE ACTIVITY IN BREAST CANCER CELLS UNDER ACTIVATION TLR –LIGAND TEICHOIC ACID

Toll-like receptors are cell receptors, the ligands of which are mostly antigens of bacteria and viruses. Their activation triggers multiple cascades that cause the body's immune response. The atypical location of toll-like receptors is often observed in various types of tumor diseases. In view of this, various approaches to the combination of antitumor therapy with the activation of the toll-like receptors are considered. In particular, one of the most common is toll-like receptor type 4, which activator is teichoic acid. In a previous study, it was shown that teichoic acid and PO244 combined therapy increases the apoptotic level of LLC cells and reduces the number of cells in a proliferative pool of cell cycle. One of the most important indicators of tumor diseases is the ability of tumor cells to migrate, which characterizes the extent of their degeneration and affects the ability to vascularisation and invasion. This ability is directly dependent on the adhesive properties of tumor cells. Another feature of tumor cells is the change in biochemical properties, in particular, increased glucose consumption and excessive activation of glycolysis, followed by its fermentation to lactate. In the conditions of 3D and 2D growth, the effect of TLR ligand teichoic acid on migration, adhesive and lactate dehydrogenase activity of MCF-7 mammary gland cancer cells was investigated. A nearly two-fold increase in the population of MCF-7 attached cells was detected under the influence of teichoic acid. Also more than double increase in the rate of attachment of cells in unfed culture conditions was demonstrated, indicating an increase in the adhesion characteristics of MCF-7 tumor cells under the action of teichoic acid. Under the influence of teichoic acid the tumor cell migration was reduced 1.5 times, which may be a sign of a metastatic decreasing and inactivation of lactate dehydrogenase, indicating biochemical changes in the whole cell.

Keywords: teichoic acid, MCF-7 cells, adhesive properties, LDH-activity

Introduction

Ligands of Toll-like receptors (TLRs) are often used as adjuvants in order to enhance the immunogenicity of vaccines in the therapy of lung cancer [1–5]. Such ligands

are cell wall biopolymers of gram-positive microorganisms *Staphylococcus aureus* – teichoic acids (TA). They play a significant role as immunomodulators. Nowadays agents possessing in addition to the specific effect on cellular

and molecular targets of tumor growth and ischemia, and the ability to inhibit angiogenesis, are promising for therapeutic angiogenesis-dependent correction of pathological states of vascular-dependent outcome [5]. Influence of teichoic acid from *S. aureus* on metabolic activity of macrophages and cytotoxic activity of splenocytes of mice bearing Lewis lung carcinoma.

In previous results, a combination of TA and PO244 was found to result in 2-times increasing of LLC cells apoptotic level in comparison with primary LLC cells (without co-culture) and LLC cells under the condition of co-cultivation with macrophages from mice without therapy. TAs+PO244 therapy decreased the population of LLC cells in the proliferative pool (G2/M+S phase) to 40 %, whereas control numbers were 65 % in LLC cells without co-culture and 60 % LLC cells with macrophage co-culture from mice without therapy [3,5]. As the adhesive potential inversely correlates with cell ability to migration, these *in vitro* data presumed that migration and tumor infiltration could be activated when the tumor grows *in vivo*. We have shown it in combined therapeutic scheme application of TA and PO244 on LLC. Monotherapy by TA stimulates tumor infiltration by lymphocytes insignificantly, whereas TA combined with PO244 caused this parameter to increase 2.4 times ($p < 0.05$) [5].

The 3D growth model of tumor cells is considered more appropriate in studying the mechanisms of the formation of the primary metastatic node since it reproduces all the growth zones and metabolic manifestations in the tumors formation [6–10].

According to preliminary results, we have been found that Teichoic acid modulates the adhesive properties of MCF-7 tumor cells.

The purpose of this study was to test the effect of TA on the adhesive and metabolic characteristics of tumor cells. For this purpose, MCF-7 mammary gland cancer cells were used in a model of spheroid growth (3D culture).

Materials and methods

Cells line

The adhesive cell line MCF-7 of human breast adenocarcinoma, obtained from cancer cells bank (Sigma, USA) was used as an experimental model. These cells have an epithelial like morphology, a karyotype of $2n = 46$ with 0.6 percent polyploidy. Oncogenicity has been confirmed in nude mice. In MCF-7 cells, receptors to estrogens are present, estradiol is synthesized. For, long-term cultured under standard conditions (37 °C, 100 % humidity, 5 % CO₂) in DMEM medium with the addition of 10 % fetal bovine serum (FBS), 2 mmol L-glutamine, and 40 µg/ml gentamicin. For the generation of MCF-7 spheroids the carboxymethylcellulose (Sigma, USA) was used as described previously [7–9]. The medium components were not changed during the long-term culturing. The multicellular spheroids were generated, and their sizes were measured daily (after addition of studied compounds) by measuring their areas, in order to observe the growth dynamics under conditions of activation of TLR by teichoic acid derived from *Staphylococcus aureus* culture [7, 8].

Determination of adhesive properties of cells

To evaluate adhesive properties of MCF-7 cells under the influence of studied compounds the method of measuring adhesive abilities of macrophages was adapted. After incubation of cells with tested compounds, the culture medium was removed, and the layer of adherent cells was washed thrice with the normal saline solution (pH 7.4). The cells were fixed for 30 min with the addition of 100 µl 96 % ethanol to each well. Then ethanol was removed, and the plates were thoroughly dried. The staining solution (Crystal

Violet) was added to the fixed cells, 100 µl per well, and incubated for 15 min at 20 °C. After incubation, the staining solution was removed, and the cells were thrice washed with the normal saline solution. To the layer of stained cells per each well 100 µl of dimethyl sulfoxide was added and incubated for 15 min at 37 °C.

After full dissolution of the stain, the optic density (OD) of solution was determined in each well at 570 nm using the spectrophotometer (BioTek mQuant MQX200, USA). The results were represented as adhesion index (AI) units, calculated as follows:

$$AI = E_e/E_c \cdot 100 \%, [\%],$$

where E_e is the extinction of sample, measured in the presence of studied compounds, E_c is the extinction of sample in control wells.

The cells were incubated for 15, 30, 45, 60, and 120 minutes with TA to evaluate the rate of attachment of cells under the influence of TA. Following each incubation period, the quantity of attached cells was checked by measuring the intensity of colorimetric absorption after dissolution of the Crystal Violet, as described above [11].

Determination of tumor cell migration

For this purpose, the cells were planted at the same concentration on a 10 cm Petri dish and glass plates with a specific size placed in cups. Once the cells reached almost 100 % monolayer, glasses moved into separate cups and incubation was performed with TA. The observations were carried out for 4 days by defining the area of cell migration using Axio Vision software (Carl Zeiss, Germany).

Determination of lactate dehydrogenase activity

Determination of lactate dehydrogenase activity in the culture medium of MCF-7 cells was performed using the commercial diagnostic kit "Filicite-Diagnostics" (Ukraine) designed to determine the total activity of lactate dehydrogenase isoforms (LDH1, LDH2, LDH3, LDH4, LDH5). The method is based on the optimized standard method according to the LDG requirements and modified according to manufacture recommendations. The determination was carried out in accordance with the protocol of the manufacturer, for this purpose, 1 ml of reagent was added to 20 µl of the test medium and spectrophotometrically measured the optical density of the solution at 340–365 nm. Data were calculated in units of enzymatic activity µkat/l.

Statistical analysis of the results was carried out using the statistical software Microsoft Excel 2010. To assess the statistical significance of the detected changes Student t-test applied; results were declared statistically significant if $P < 0.05$.

Results and discussion

In many types of tumor cells, TLR hyperexpression has been detected [1–4, 12–14]. The role of TLR signaling in the norm is particularly relevant in cells with inherent migration activity. Also, TLR activation results in epithelial-mesenchymal transition and activation of matrix metalloproteinases. This pattern is implemented under conditions of acidosis associated with a violation of metabolic function with a pronounced glycolytic phenotype and the accumulation of lactate in the microenvironment of tumor cells. In previous experiments, we identified a modification of the adhesion potential of MCF-7 tumor cells in the case of activation of these cells by the teichoic acid. Therefore, on models of 3D growth of MCF-7 cells, we tested the effect of TA on the adhesive characteristics of these cells. As shown by the data (Fig. 1), TA activated the transition of cells from spheroid growth to the adhesive fraction.

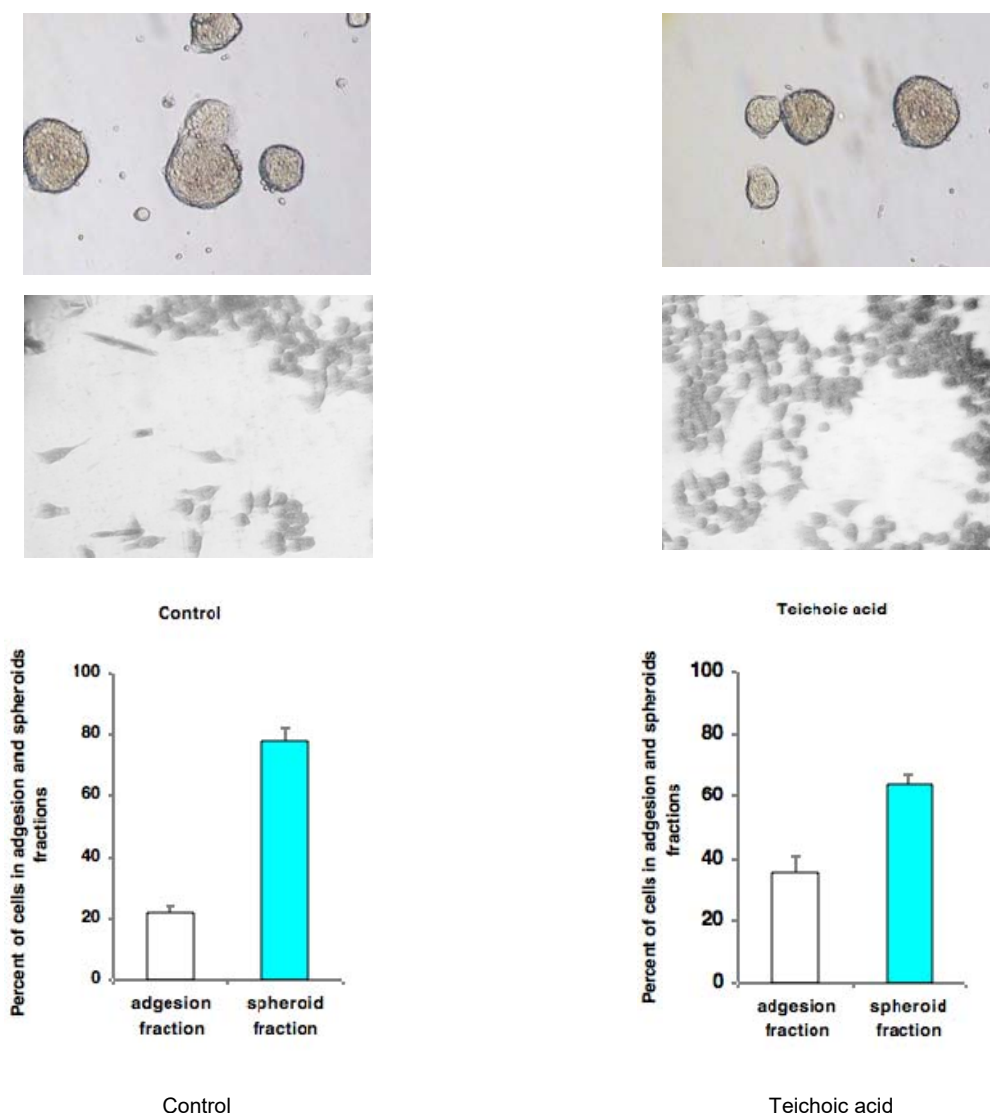


Fig. 1. Adhesive characteristics of MCF-7 (in 3D growth conditions) in presence of teichoic acid

In control, 20 % of cells in the adhesive fraction were detected, while for the incubation of cells with teichoic acid, almost 40 % of the cells were detected in the adhesive fraction.

This fact, on the one hand, can suppress the migration of tumor cells, and on the other, effects on the "sticking" of tumor cells to the endothelial cells and their penetration into the vessels and subsequent migration to metastatic zones. To determine the impact of TA on migration an

original method was applied – the migration of cells from the glass plates. For this purpose, cells were cultured in standard conditions prior to the formation of the monolayer and then moved under conditions of the influence of TA and in standard conditions (control). Under these conditions, they cultivated for 4 days and determined the area of migration of cells from the glasses. It has been shown that TA inhibits the migration of MCF-7 cells by 1.5 times compared to control (Fig. 2).

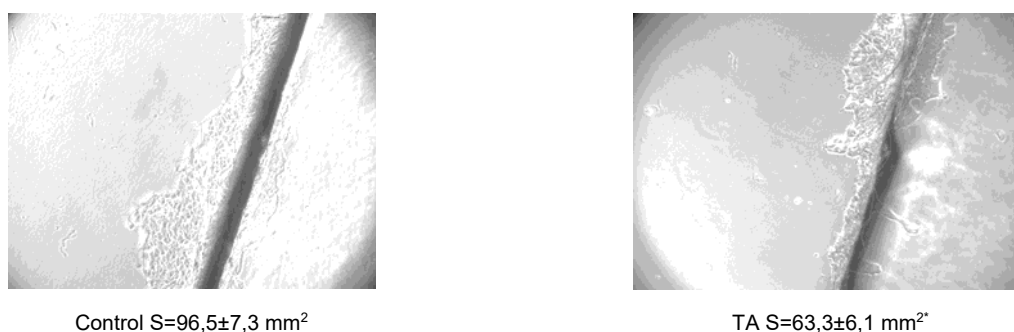


Fig. 2. The area of cell migration of the MCF-7 line under the influence of teichoic acid (4 days of incubation on full-cell monolayers).

$M \pm m$, * $p \leq 0,05$, compared to control

Consequently, the results of the migration test indicate that the MCF-7 substrate cell migration was reduced by 1.5 times ($p \leq 0.01$) under the action of TA, as compared to the control. Such a pattern of influence can indirectly testify to the inhibition of metastasis under the action of TA, which is directly related to inhibition of invasion in the vasculature.

It is known that the microenvironment of cells, particular, in acidosis, may affect various processes in tumor cells [15]. The tumor microenvironment has profound effects on cancer development, progression, and therapeutic response. The metabolism of cancer cells is

reprogrammed from that of normal cells. In the early twentieth century, Otto Warburg observed that cancer cells preferentially utilize glycolysis, instead of oxidative phosphorylation, for energy metabolism even in the presence of oxygen (now known as the "Warburg effect") [16]. Glycolytic metabolism of glucose results in lactic acid, which can acidify the tumor microenvironment after being expelled by cancer cells [17]. Therefore, the next step was to determine the lactate dehydrogenase activity in the medium of incubation of MCF-7 cells under the action of TA.

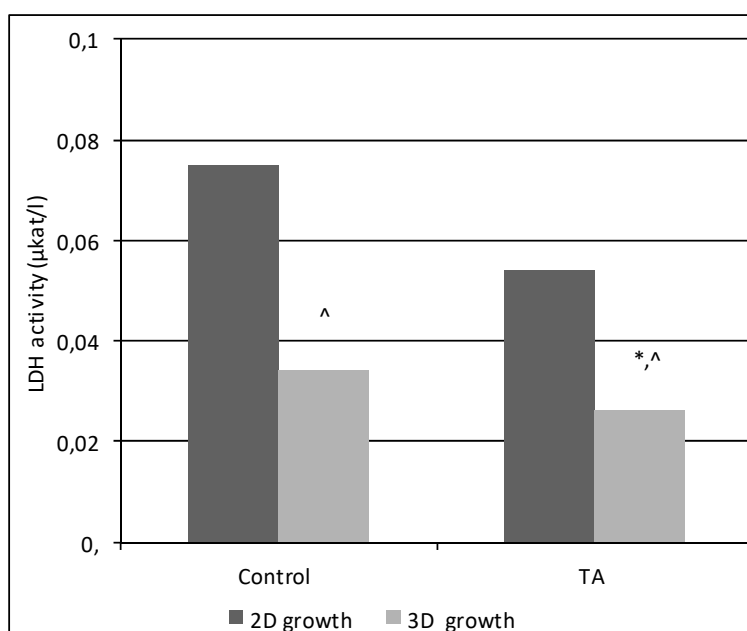


Fig. 3. LDH activity in cells cultured in a medium with addition and without addition of TA ($^{\wedge} p < 0.05$)

The activity of LDH in cells cultured in 3D was twice lower in control compared to cultivation in 2D growth conditions ($p < 0.05$, Fig. 3). The activity of LDH under the action of TA was lower in both 2D and 3D growth conditions.

Thus, 3D models have potential to bridge the gap between 2D cell culture and whole animal models by mimicking in vivo tumor features.

A significant effect of TA on the adhesion characteristics of tumor cells was revealed in the study of the rate of cells

attached to the substrate in unfed culture conditions for 2 hours. As shown in Fig. 4., under the incubation of MCF-7 cells with teichoic acid the attachment of cells increased substantially from the period of incubation for 30 minutes, which confirmed by the intensity of optical absorption after coloring the attached cells with Crystal Violet. This indicator remains 2–2.5 times higher than the corresponding control at all time points of incubation.

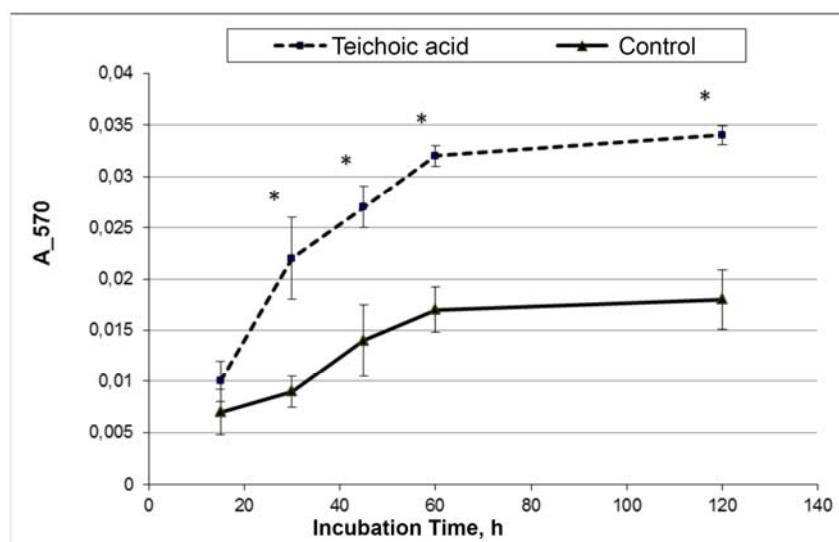


Fig. 4. The rate of attached MCF-7 cells in condition of unfed culture and under the influence of TA (1 ng/ml)

The results of experimental studies on the model of cultured mammary carcinoma MCF-7 cells in conditions of 2D and 3D growth indicate a significant effect of TA as a suppressant inhibitor of substrate-independent growth. This effect confirmed by an increase in the fraction of adhesive cells in half as compared to the control. Also, the TA modifying action appears in increasing of the attachment rate and the fraction of adhesive cells. Perhaps this effect also associated with inhibition of cell migration to the substrate as compared to the control. Also, a significant modifying effect of TA appears on the metabolism of lactate. Currently considered that metabolic reprogramming is an essential component of the progression of tumor growth. One of the keyframes in this process is the transition of cells to anaerobic glycolysis resulted from lactate dehydrogenase activation, lactate accumulation in the microenvironment of tumor cells and inhibition of the pyruvate formation and tissue respiration. On the other hand, accumulation of lactate suppresses proapoptotic signaling. That is also one of the components of progressive tumor growth.

Conclusions

Thus, the results indicate the modifying effect of the TLR TA ligand on the adhesion, migration and metabolic activity of the MCF-7 mammary tumor cells.

An increase in the population of attached cells was found to be 40 % for TA, compared to 20 % in control. The 1.5-fold decrease in cell migration and LDH activity inhibition under the action of TA revealed, especially in 3D growth conditions.

References

1. Barton G. Toll-like receptor signaling pathways / G. Barton, R. Medzhitov / Science, 2003. – Vol. 300. – P. 1524–1525.
2. TLR4 signaling pathway in mouse Lewis lung cancer cells promotes the expression of TGF- β 1 and IL-10 and tumor cells migration / C. Li, H. Li, K. Jiang et al. // Biomed Mater Eng., 2014. – Vol. 24(1). P. 869–875. doi: 10.3233/BME-130879.
3. Tiechoic acids from *Staphylococcus aureus* enhance cytotoxic/cytostatic influence of bimetallic complex on primary tumor culture / V. Nikulina, L. Garmanchuk, N. Senchylo, T. Nikolaienko // Journal of Thoracic Oncology? 2016/ – Vol. 11. Suppl. 4S. – P. S79–S91 DOI: 10.1016/S1556-0864(16)30192-7.
4. Influence of teichoic acid from *s. aureus* on metabolik activity of macrophages and cytotoxicactivity of splenocytes of vice bearing lewis lung carcinoma / Potebnya G., Skivka L., Pozur V. [et al] – 2008. Experimental oncology. Vol. 30. 212-223.
5. Combined influence of teichoic acids from *Staphylococcus aureus* and heterometallic Cu/Cd ethylenediamine complex on peritoneal macrophages and tumor cells / V. Nikulina, L. Garmanchuk, N. Senchylo et al. // Cytology and Genetics, 2014. – Vol. 48(6). – P. 392–397.
6. Peptidoglycan and lipoteichoic acid in gram-positive bacterial sepsis: receptors, signal transduction, biological effects, and synergism / J. Wang, M. Dahle, M. McDonald et al. // Shock, 2003. – Vol. 20. – P. 402–414.
7. In vitro 3D growth system – alternative to in vivo tumor growth model / L. Garmanchuk, L. Ostrovska, V. Nikulina et al. // Biopharmaceutical journal, 2014. – Vol. 2(6). – P. 4–6.
8. Muller-Klieser W. Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical application / W. Muller-Klieser // Am. J. Physiol., 1997. – Vol. 273. – P. 1109–1123.
9. Kelm J. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. Biotechnol Bioeng / J. Kelm, N. Timmins, C. Brown, 2003. – Vol. 83(2). – P. 173–180.
10. Toll like receptor 4 facilitates invasion and migration as a cancer stem cell marker in hepatocellular carcinoma / W. Liu, Y. Jing, G. Yu et al. // Cancer Lett., 2015 Mar 28; Vol. 358(2). – P. 136–143. doi: 10.1016/j.canlet.2014.12.019. Epub 2014 Dec 12.
11. Novel hybrid compound 4-[(E)-2-phenylethanesulfonamido]-N-hydroxybutanamide with antimetastatic and cytotoxic action: synthesis and anticancer screening / Y. Zborovskii, V. Orysyk, I. Golovynska et al. // Anti-cancer Agents Med. Chem., 2018 Mar 13. doi: 10.2174/1871520618666180313151503.
12. Toll-Like Receptor 4 Prompts Human Breast Cancer Cells Invasiveness via Lipopolysaccharide Stimulation and Is Overexpressed in Patients with Lymph Node Metastasis / H. Yang, B. Wang, T. Wang et al. // PLoS One., 2014 Oct 9. – Vol. 9(10). – P. e109980. doi: 10.1371/journal.pone.0109980.
13. A tissue microarray study of toll-like receptor 4, decoy receptor 3, and external signal regulated kinase 1/2 expressions in astrocytoma / C. Lin, C. Ting, W. Tsai et al. // Indian J. Pathol Microbiol., 2016. – Vol. 59. – P. 294–300. 10.4103/0377-4929.188122.
14. Ann N. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling / N. Ann, T. Kawai, S. Akira, 2008. – P. 1143:1–20. UDC 616-006.004.576.36.
15. Li V. Tumor Microenvironment and Metabolism / V. Li // Int. J. Mol. Sci., 2017 Dec. – Vol. 18(12). – P. 2729. Published online 2017 Dec 16. doi: 10.3390/ijms18122729.
16. Warburg O. On the origin of cancer cells / O. Warburg // Science, 1956 – Vol. 123. – P. 309–314. doi: 10.1126/science.123.3191.309
17. Xun H. Central role of lactate and proton in cancer cell resistance to glucose deprivation and its clinical translation / H. Xun, C. Ming, W. Hao // Signal Transduct Target Ther., 2017. – Vol. 2. – P. 16047. Published online 2017 Mar 10. doi: 10.1038/sigtrans.2016.

References (Scopus)

1. Barton G. Toll-like receptor signaling pathways/ Barton G., Medzhitov R. Science. – 2003. Vol. 300. P. 1524–1525.
2. Li C., Li H., Jiang K., Li J., Gai X. TLR4 signaling pathway in mouse Lewis lung cancer cells promotes the expression of TGF- β 1 and IL-10 and tumor cells migration/– 2014. Biomed Mater Eng. Vol. 24(1). P. 869-875. doi: 10.3233/BME-130879.
3. Nikulina V., Garmanchuk L., Senchylo N., Nikolaienko T. Tiechoic acids from *Staphylococcus aureus* enhance cytotoxic/cytostatic influence of bimetallic complex on primary tumor culture// Journal of Thoracic Oncology Vol. 11, Suppl. 4S (2016) S79–S91 DOI: 10.1016/S1556-0864(16)30192-7
4. Potebnya G., Skivka L., Pozur V. [et al] Influence of teichoic acid from *s. aureus* on metabolik activity of macrophages and cytotoxicactivity of splenocytes of vice bearing lewis lung carcinoma/– 2008. Experimental oncology. Vol. 30. 212-223.
5. Nikulina V., Garmanchuk L., Senchylo N. [et al.]. Combined influence of teichoic acids from *Staphylococcus aureus* and heterometallic Cu/Cd ethylenediamine complex on peritoneal macrophages and tumor cells/– 2014. Cytology and Genetics. Vol. 48(6). P. 392-397
6. Wang J., Dahle M., McDonald M. [et al.]. Peptidoglycan and lipoteichoic acid in gram-positive bacterial sepsis: receptors, signal transduction, biological effects, and synergism/ Shock.- 2003. – Vol. 20. P. 402–414.
7. Garmanchuk L., Ostrovska L., Nikulina V. [et al.] In vitro 3D growth system – alternative to in vivo tumor growth model // Biopharmaceutical journal– 2014. Vol. 2(6). P. 4-6.
8. Muller-Klieser W. Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical application – 1997. Am.J.Physiol. Vol. 273.P. 1109-1123.
9. Kelm J., Timmins N., Brown C. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. Biotechnol Bioeng. – 2003. Vol. 83(2). P. 173-180
10. Liu W., Jing Y., Yu GF., Han ZP., Yu D., Fan QM., Ye F., Li R., Gao L., Zhao Q., Wu MC., Wei L. Toll like receptor 4 facilitates invasion and migration as a cancer stem cell marker in hepatocellular carcinoma. Cancer Lett. 2015 Mar 28;358(2):136-143. doi: 10.1016/j.canlet.2014.12.019. Epub 2014 Dec 12.
11. Zborovskii Y., Orysyk V., Golovynska I. et all. Novel hybrid compound 4-[(E)-2-phenylethanesulfonamido]-N-hydroxybutanamide with anti-metastatic and cytotoxic action: synthesis and anticancer screening. Anti-cancer Agents Med Chem. 2018 Mar 13. doi: 10.2174/1871520618666180313151503.
12. Yang H., Wang B., Wang T., Xu L., He C., Wen H., Yan J., Su H., Zhu X. Toll-Like Receptor 4 Prompts Human Breast Cancer Cells Invasiveness via Lipopolysaccharide Stimulation and Is Over expressed in Patients with Lymph Node Metastasis// PLoS One. 2014 Oct 9;9(10):e109980. doi: 10.1371/journal.pone.0109980
13. Lin C., Ting C., Tsai W. et al. A tissue microarray study of toll-like receptor 4, decoy receptor 3, and external signal regulated kinase 1/2 expressions in astrocytoma. Indian J Pathol Microbiol 2016;59:294-300. 10.4103/0377-4929.188122
14. Kawai T., Ann N., Akira S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling/– 2008. P. 1143:1–20. UDC 616-006.004.576.36
15. Li V. Yang Tumor Microenvironment and Metabolism Int J Mol Sci. 2017 Dec; 18(12): 2729 Published online 2017 Dec 16. doi: 10.3390/ijms18122729
16. Warburg O. On the origin of cancer cells. Science. 1956;123:309–314. doi: 10.1126/science.123.3191.309
17. Xun Hu., Ming, Hao Wu. Central role of lactate and proton in cancer cell resistance to glucose deprivation and its clinical translation// Signal Transduct Target Ther. 2017; 2: 16047. Published online 2017 Mar 10. doi: 10.1038/sigtrans.2016.

Надійшла до редакції 12.03.2018

Отримано виправлений варіант 16.04.2018

Підписано до друку 16.04.2018

Received in the editorial 12.03.2018

Received a revised version on 16.04.2018

Signed in the press on 16.04.2018

А. Негеля, асп., В. Нікуліна, канд. біол. наук,
Н. Сенчило, доц., Є. Торгалло, канд. біол. наук,
Л. Гарманчук, д-р біол. наук
ННЦ "Інститут біології та медицини"
Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

АДГЕЗІЯ, МІГРАЦІЯ ТА ЛАКТАТДЕГІДРОГЕНАЗНА АКТИВНІСТЬ КЛІТИН РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ ЗА УМОВ АКТИВАЦІЇ TLR-ЛІГАНДОМ ТЕЙХОЄВОЮ КИСЛОТОЮ

Толл-лайк рецептори – це рецептори клітин, лігандами яких здебільшого є антигени бактерій і вірусів. Їхня активація запускає множинні каскади, що спричиняють імунну реакцію організму. Атипове розташування толл-лайк рецепторів часто спостерігається при різних типах пухлинних захворювань. З огляду на це, розглянуто різноманітні підходи до подання протипухлинної терапії з активацією толл-лайк рецепторів. Зокрема, одним із найпоширеніших є толл-лайк рецептор 4 типу, активатором якого є тейхоєва кислота. У попередньому дослідженні було показано, що комбінована терапія ТА та РО244 підвищує апоптичний рівень клітин LLC та знижує кількість клітин проліферативного пулу клітинного циклу. Одним із найважливіших показників пухлинних захворювань є здатність клітин пухлини до міграції, що характеризує ступінь їх переродження і впливає на здатність до васкуляризації та інвазивності. Ця здатність напряму залежить від адгезивних властивостей пухлинних клітин. Ще однією особливістю пухлинних клітин є зміна біохімічних властивостей, зокрема підвищене споживання глюкози та надмірна активація гліколізу з подальшим зброджуванням її до лактату. Досліджувався ефект TLR-ліганду тейхоєвої кислоти на міграцію, адгезію та лактатдегідрогеназну активність ракових клітин MCF-7 молочної залози за умов 3D та 2D культивування. Було виявлено майже двократне зростання популяції прикріплених клітин MCF-7 під впливом тейхоєвої кислоти. Також було продемонстровано більше ніж двократне зростання швидкості прикріплення клітин за умов довготривалого культивування без заміни середовища, що свідчить про підсилення адгезивних характеристик пухлинних клітин MCF-7 під дією тейхоєвої кислоти. Під впливом тейхоєвої кислоти було виявлено зниження площі міграції пухлинних клітин у 1.5 раза, що може бути проявом зниження здатності до метастазування, та зменшення активності лактатдегідрогенази, що вказує на біохімічні зміни клітин в цілому.

Ключові слова: тейхоєва кислота, клітини MCF-7, адгезивна властивість, LDH-активність

А. Негеля, асп., В. Никулина, канд. биол. наук, Н. Сенчило, доцент.,
Е. Торгалло, канд. биол. наук, Л. Гарманчук, д-р биол. наук
УНЦ "Институт биологии та медицины"
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина.

АДГЕЗИЯ, МИГРАЦИЯ И ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В УСЛОВИЯХ АКТИВАЦИИ TLR-ЛИГАНДОМ ТЕЙХОЕВОЙ КИСЛОТЫ

Толл-лайк рецепторы – это рецепторы клеток, лигандами которых в основном являются антигены бактерий и вирусов. Их активация запускает множественные каскады, которые вызывают иммунную реакцию организма. Атипичное расположение толл-лайк рецепторов часто наблюдается при различных типах опухолевых заболеваний. Учитывая это, рассматриваются различные подходы к сочетанию противоопухолевой терапии с активацией толл-лайк рецепторов. В частности, одним из самых распространенных является толл-лайк рецептор 4 типа, активатором которого является тейхоевая кислота. В предыдущем исследовании было показано, что комбинированная терапия ТА и РО244 повышает апоптический уровень клеток LLC и снижает количество клеток пролиферативного пула клеточного цикла. Одним из важнейших показателей опухолевых заболеваний является способность клеток опухоли к миграции, характеризующий степень их перерождения и влияет на способность к васкуляризации и инвазивности. Эта способность напрямую зависит от адгезивных свойств опухолевых клеток. Еще одной особенностью опухолевых клеток является изменение биохимических свойств, в частности повышенное потребление глюкозы и чрезмерная активация гликолиза с последующим сбраживанием ее к лактату. Исследовался эффект TLR-лиганда тейхоевой кислоты на миграцию, адгезию и лактатдегидрогеназную активность раковых клеток MCF-7 молочной железы в условиях 3D и 2D культивирования. Было выявлено почти двукратный рост популяции прикреплённых клеток MCF-7 под влиянием тейхоевой кислоты. Также было продемонстрировано более чем двукратный рост скорости прикреплённых клеток в условиях *upfed culture*, что свидетельствует об усилении адгезивных характеристик опухолевых клеток MCF-7 под действием тейхоевой кислоты. Под влиянием тейхоевой кислоты было выявлено снижение площади миграции опухолевых клеток в 1.5 раза, что может быть проявлением снижения способности к метастазированию, и уменьшение активности лактатдегидрогеназы, что указывает на биохимические изменения клеток в целом.

Ключевые слова: тейхоевая кислота, клетки MCF-7, адгезивная способность, LDH-активность

УДК 577.21:612.34:616.33-008.821.14

А. Драницина, канд. біол. наук, О. Блохіна, асп., О. Короткий, канд. біол. наук,
К. Дворщенко, д-р біол. наук, Л. Остапченко, д-р біол. наук,
ННЦ "Інститут біології та медицини"
Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ЕКСПРЕСІЯ ГЕНА PTGS2 У КЛІТИНАХ ХРЯЩОВОЇ ТКАНИНИ КОЛІННОГО СУГЛОБА ЩУРІВ ЗА УМОВ ОСТЕОАРТРОЗУ ТА ПРИ ВВЕДЕННІ БІОЛОГІЧНО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН

Остеоартроз – дегенеративно-дистрофічне захворювання суглобів, спричинене різними факторами. На сьогодні немає ефективного лікування, яке б забезпечувало повне одужання від артрозу. Хондропротектори застосовуються в медицині протягом тривалого часу, але сировиною для них є суміш молекул хондроїтинсульфату з різною дозуюю та варіаціями в положенні сульфатних груп, яка має різні рівні очищення, що спричинює часом різноманітні небажані ефекти. Метою роботи було проаналізувати інтенсивність вільно-радикальних процесів та експресію гена – медіатора запальної відповіді – *Ptgs2* у хрящовій тканині щурів з індукованим моноіодоацетатом натрію артрозом та при введенні біологічно-активних речовин: хондроїтинсульфату, меланіну (поліфенольна сполука з антиоксидантними та протизапальними властивостями) та їх комбінації. Роботу було виконано на білих нелінійних щурах. Використані методи: визначення концентрації органічних гідропероксидів, ЗТ-ПЛР у реальному часі, статистичні методи. Молекулярно-біохімічний аналіз хрящової тканини щурів з індукованим моноіодоацетатом натрію артрозом виявив підвищення рівня експресії гена *Ptgs2* у 8,1 раза ($p \leq 0,001$), посилення вільно-радикальних процесів (збільшення вмісту органічних гідропероксидів у 2 раза ($p \leq 0,001$)) порівняно з контрольною групою тварин, що вказує на порушення редокс-балансу клітин, розвиток окисного стресу та активацію запальних та деструктивних процесів у тканині. При використанні препарату на основі хондроїтинсульфату, меланіну та комбінації цих біологічно-активних речовин за тих самих умов рівень експресії цього гена та вміст органічних гідропероксидів наближались до контрольних значень, що вказує на протизапальні й антиоксидантні властивості зазначених препаратів, та про доцільність спільного застосування хондроїтинсульфату та меланіну за умов остеоартрозу щурів, що, у свою чергу, сприяє більш швидкому відновленню структури хрящової тканини та патерну експресії певних генів, гальмуванню дегградації, вільно-радикальних процесів і перекисного окислення ліпідів та пригнічує запалення.

Ключові слова: хрящ, остеоартроз, щури, хондроїтинсульфат, *Ptgs2*, запалення.

Вступ. Оцінка характеру експресії генів дозволяє розширити уявлення стосовно механізмів, що виника-

ють у клітинах організму за тих чи інших патологічних станів. Адже реалізація змін генної експресії в клітинах

унаслідок пошкоджуючого впливу вимагає певного часу і є наслідком тривалої дії стимулятора [1–3].

Остеоартроз (від англ. *osteoarthritis*) – це хронічне дегенеративно-дистрофічне захворювання суглобів, спричинене різними факторами [3–4]. Ця хвороба характеризується запаленням синовіальної оболонки, ерозією хряща та резорбцією субхондральної кістки. Дегенерація хряща починається з біомеханічних і біохімічних патологічних змін: травми, м'язової слабкості, ожиріння, генетичної схильності, вживання естрогенів, активації вільнорадикальних процесів тощо [4–5]. Такі фактори можуть призвести до надлишку синтезу прозапальних цитокінів, наприклад, інтерлейкіну-1-бета (IL-1 β) та фактора некрозу пухлини (TNF α , ФНП), що, у свою чергу, стимулює експресію численних хемокинів [3], а також одного з потужних прозапальних генів – *Ptgs2*, який кодує фермент циклооксигеназу-2 (COX-2) і його продукт – простагландин E₂ (PGE₂) [3, 6]. Метаболіти й ферменти каскаду арахідонової кислоти, у тому числі COX-2, як відомо, є важливими медіаторами запальної реакції [2, 7]. Показано швидку зміну рівня експресії *Ptgs2* і вмісту прозапальних цитокінів у синовіоцитах та хондроцитах людини в ранньому періоді розвитку остеоартриту [8].

На сьогодні немає ефективного лікування, яке б забезпечувало повне одужання від артрозу. Дія більшості препаратів направлена лише на полегшення симптомів. Тому сьогодні велика увага приділяється пошуку речовин, які б відновлювали рівновагу процесів синтезу й деградації з мінімальними побічними ефектами [12–14]. Нестероїдні протизапальні препарати, імуносупресивні засоби тощо послаблюють активність PGE₂, але в них відсутній елемент антиоксидантної терапії [15]. Відомо, що на початку захворювання в хондроцитах активуються вільнорадикальні процеси, збільшується утворення активних форм кисню (АФК), значно посилюються процеси окиснення, що призводить до розвитку окисного стресу – ОС (зокрема, перекисне окиснення ліпідів – ПОЛ), які порушують метаболізм клітин [16], ушкоджують ферменти і структурні білки хрящової тканини, що призводить до загибелі хондроцитів і синовіоцитів [15, 17]. Основними структурними білками хрящової тканини, які модифікуються в окисних реакціях є протеоглікани. Відомо, що застосування препаратів на основі хондроїтину, які містять у складі структурні компоненти протеогліканів, сприяє відновленню структури тканини, гальмуванню процесів деградації й перекисного окислення ліпідів та пригнічує запалення. Хондропротектори застосовуються в медицині протягом тривалого часу, але сировиною для них є суміш молекул хондроїтинсульфату з різною довжиною і варіаціями в положенні сульфатних груп, яка має різні рівні очищення, що спричинює різноманітні ефекти, часом зовсім небажані [12–14].

Меланіни – пігменти шкіри, волосся, райдужки, чорної субстанції мозку тощо. Відомо, що ці поліфенольні сполуки виявляють репаративну, антиоксидантну, протизапальну, ранозагоючу, імуномодулюючу та протипухлинну властивості [18, 19]. У попередніх дослідженнях нами було показано, що меланін, продуцентом якого є антарктичні чорні дріжджеподібні гриби *Nadsoniella nigra*, штам Х1-М, висіяні із зразків вертикальних скель острова Галіндез (Українська антарктична станція "Академік Вернадський"), володіє вираженою цитопротекторною дією та сприяє швидкому загоєнню ран різної етіології [5, 6, 20].

З огляду на вищезазначене метою роботи було проаналізувати інтенсивність вільнорадикальних процесів та експресію гена – медіатора запальної відповіді – *Ptgs2* в хрящовій тканині щурів з індукованим моноіодоацетатом

натрію артрозом та при введенні біологічно-активних речовин: хондроїтинсульфату, меланіну та їх комбінації.

Матеріали і методи. Роботу було виконано на білих нелінійних щурах обох статей масою 180–240 г, що утримувались на стандартному раціоні віварію. При роботі з тваринами дотримувались загальних етичних норм проведення експериментів на тваринах відповідно до "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для наукових експериментів або в інших наукових цілях". Позитивний висновок біоетичної комісії отримано на засіданні біоетичної комісії ННЦ "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка від 29 листопада 2017 р. Кожна група включала по 12 тварин кожної статі.

Експеримент проводили за схемою: як контроль (перша група) використовували щурів, яким в перший день в обидва коліна крізь колінну зв'язку кололи по 50 мкл фізрозчину; тварини другої групи слугували як негативний контроль дії препарату, їм вводили фізрозчин так само, як і контрольним тваринам, і додатково з 8 дня експерименту застосовували внутрішньом'язево 1 мл препарату "Драстоп" ("Артрадол" тощо; активна речовина: хондроїтинсульфат натрію – 100 мг) 1 раз на добу протягом 14 діб; третя група – щури, слугували як негативний контроль дії меланіну, їм вводили фізрозчин так само, як і контрольним тваринам, і додатково з 8 дня експерименту вводили перорально розчинений у воді меланін (продуцентом якого є антарктичні чорні дріжджеподібні гриби *Nadsoniella nigra*, штам Х1-М; 0,3 мг/кг) – 1 раз на добу протягом 14 діб; четверта група – тварини, яким у перший день вводили в праве коліно 3 мг моноіодоацетату натрію (monosodium iodoacetate – MIA), розчиненого в 50 мкл фізрозчину, у ліве коліно – 50 мкл фізрозчину крізь колінну зв'язку; у тварин п'ятої групи остеоартроз моделювали так само, як і в четвертій групі щурів, і вводили препарат "Драстоп" аналогічно другій групі тварин; у щурів шостої групи остеоартроз моделювали так само, як і в четвертій групі, і вводили меланін аналогічно третій групі тварин; у тварин сьомої групи остеоартроз моделювали так само, як і в четвертій групі щурів, і вводили препарат "Драстоп" та меланін аналогічно другій та третій групі щурів. При розрахунку дози препарату для тварин використовували коефіцієнти перерахунку доз (мг/кг) із організму тварини на організм людини [21]. Забіїв щурів проводили на 29 день після початку експерименту. Одразу видаляли гіалінові хрящі колінних суглобів і зберігали при – 20 °С до початку досліджень.

Визначення концентрації органічних гідропероксидів. Визначення вмісту гідропероксидів у біологічному матеріалі базується на здатності H₂O₂ та органічних гідропероксидів при взаємодії із сорбітолом перетворюватись на пероксильний радикал, який, у свою чергу, конвертує Fe²⁺ у Fe³⁺ за кислих значень рН. У розчині сульфатної кислоти іони Fe³⁺ утворюють забарвлений комплекс із барвником ксиленоловим помаранчевим, який має пік поглинання в діапазоні λ = 540–580 нм [22, 23]. Вміст білка вимірювали за методом Лоурі [24].

Кількісна ЗТ-ПЛР у реальному часі. РНК отримували за методом Chomczynski [25]; Синтез кДНК та кількісну полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі (Real-time quantitative RT-PCR, qRT-PCR, кПЛР) проводили за допомогою комерційного набору "Thermo Scientific Verso SYBR Green 1-Step qRT-PCR ROX Mix" ("Thermo Scientific", Литва), використовуючи по 0,4 мкмоль/л кожного праймера, проводили за таких, рекомендованих фірмою-виробником, температурних умов: синтез кДНК 50 °С – 30 хв; ініціююча денатурація 95 °С – 15 хв; далі 40 циклів: денатурація ДНК 95 °С –

15 с; гібридизація праймерів 50°C – 35 с; добування ланцюга 72 °C – 30 с.; елонгація ампліфікатів 72 °C – 5 хв.

У реакціях було використано такі послідовності праймерів (підбрано з використанням Primer-BLAST): для *Ptgs2* – прямий – TGCTGTTCCAAACCATGTCA та зворотний – TGTCAGAAACTCAGGCGTAGT; для *Actb* (ген β-актину, що використовується як внутрішній контроль реакції завдяки конститутивній експресії) – прямий – TGGGACGATATGGAGAAGAT та зворотний – ATTGCCGATAGTGATGACCT. Відтворюваність результатів ампліфікації було перевірено в паралельних експериментах шляхом повторення кПЛР на зразках РНК усіх тварин, із кожним праймером не менше трьох разів. Після кожного циклу ампліфікації зчитувалась флуоресценція барвника SYBR Green I, а по закінченні реакції будувалась крива плавлення для контролю утворення димерів праймерів та специфічності реакції. Відносну кількість мРНК обраховували за порівняльним C_T методом "ΔΔC_T Method", ефективність ПЛР реакцій була однаковою ($E_x = (10^{-1/\text{slope}}) - 1$, $\text{slope} < 0,1$). Відносний рівень експресії зазначених генів нормалізували до мРНК *Actb* [26].

Статистична обробка результатів досліджень. Математичну та статистичну обробку результатів досліджень проводили на комп'ютері з використанням програмного пакета "GraphPad Prism 5.04" ("GraphPad Software Inc.", США). Їх перевіряли на нормальне розподілення за допомогою тесту Шапіро-Уїлка. Подальше обчислення здійснювали за допомогою односпрямованого дисперсійного аналізу (one-way ANOVA) із пост-тестом Тукея. Отримані результати наведені у вигляді середнього арифметичного ± середньоквадратичне відхилення (дисперсія) – SD. Результати вважали значущими при $p \leq 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення. У результаті проведених нами експериментальних дослі-

джень було показано, що вміст органічних гідропероксидів у хрящовій тканині тварин з експериментальним артрозом був вищим у 2 рази ($p \leq 0,001$) порівняно з контролем. Рівні експресії цього гена в першій, другій та третій групах щурів достовірно не відрізнялися. У щурів, при одночасному введенні з MIA препарату "Драстоп" вміст зазначеного показника був у 1,4 раза нижчим ($p \leq 0,001$), ніж у тварин четвертої групи. У групі тварин, яким одночасно вводили MIA та меланін вміст органічних гідропероксидів був у 1,6 раза нижчим ($p \leq 0,001$), ніж у тварин четвертої групи. У щурів, яким одночасно вводили як MIA, так і "Драстоп" та меланін, вміст зазначеного показника був в 1,8 раза нижчим ($p \leq 0,001$), ніж у тварин четвертої групи.

Відомо, що остеоартроз супроводжується інтенсифікацією ПОЛ у різних тканинах організму [2, 4, 5]. Також нами було виявлено істотне підвищення концентрації первинних, вторинних і кінцевих продуктів ПОЛ у хрящевій тканині щурів при експериментальному остеоартрозі і зниження цих показників при одночасному введенні з MIA препарату "Драстоп" [27]. Таким чином, на першому етапі дослідження було показано активування вільно-радикальних процесів у тварин при колінному остеоартрозі, так само як і швидкіше наближення вмісту органічних гідропероксидів до контрольних значень саме при спільній дії хондропротектору та меланіну за тих самих умов.

У результаті подальших експериментальних досліджень було показано, що рівень експресії гена *Ptgs2* у групі тварин з патологією був вищим у 8,1 раза ($p \leq 0,001$) порівняно з контрольними тваринами (рис. 1). Рівні експресії цього гена в першій, другій та третій групах щурів достовірно не відрізнялися.

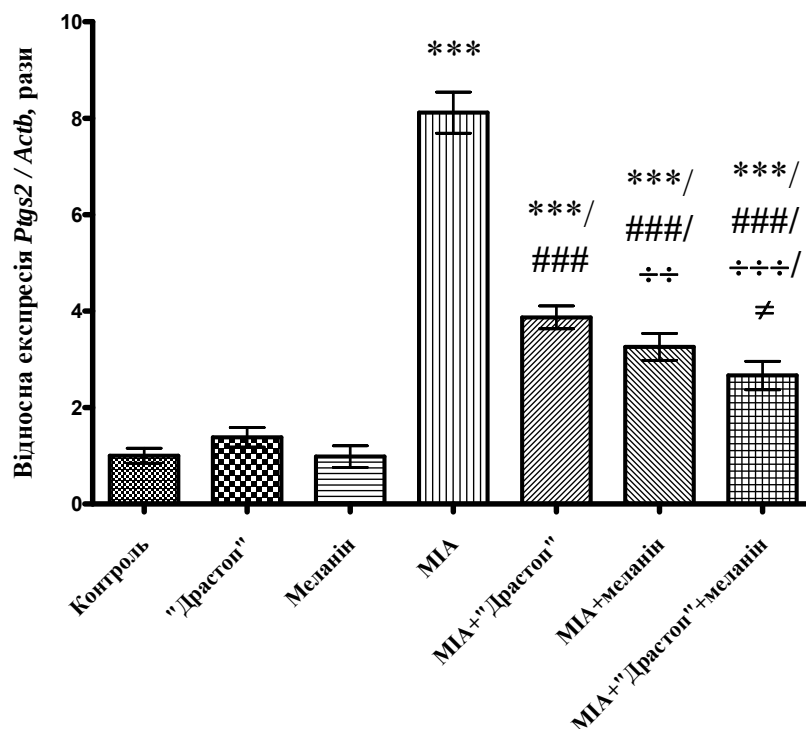


Рис. 1. Рівень експресії мРНК гена *Ptgs2* в клітинах хрящової тканини колінного суглоба щурів за умов остеоартрозу та при введенні біологічно-активних речовин.

1 – контроль; 2 – "Драстоп"; 3 – меланін; 4 – MIA; 5 – MIA + "Драстоп"; 6 – MIA + меланін; 7 – MIA + "Драстоп" + меланін; *** – $p \leq 0,001$ відносно контрольних тварин; ### – $p \leq 0,001$ відносно тварин, яким вводили лише MIA; +++ – $p \leq 0,001$, ++ – $p \leq 0,01$ відносно тварин, яким вводили MIA + "Драстоп"; ≠ – $p \leq 0,05$ відносно тварин, яким вводили MIA + меланін

Водночас при одночасному введенні з MIA препарату "Драстоп" рівень відповідної мРНК був у 2,1 раза нижчим ($p \leq 0,001$), ніж у тварин третьої групи, проте залишився підвищеним в 3,9 раза ($p \leq 0,001$) порівняно з контролем. У групі тварин, яким одночасно вводили MIA та меланін рівень експресії *Ptgs2* був у 2,5 раза нижчим ($p \leq 0,001$), ніж у тварин четвертої групи, але лишився підвищеним у 3,3 раза ($p \leq 0,001$) порівняно з контрольними тваринами. У щурів, яким одночасно вводили MIA, "Драстоп" і меланін, рівень зазначеного показника був в 3 рази нижчим ($p \leq 0,001$), ніж у тварин четвертої групи, однак залишився підвищеним у 2,7 раза ($p \leq 0,001$) порівняно з контрольними значеннями. Рівні експресії гена *Ptgs2* у 5–7 групах тварин значуще відрізнялися між собою ($p \leq 0,001$, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,05$).

Отже, встановлені нами зміни експресії гена *Ptgs2* у хрящах колінного суглобу щурів за умов остеоартрозу свідчать про розвиток патологічних процесів у хрящовій тканині, зокрема дегенерації та запалення. Водночас при застосуванні препарату на основі хондроїтинсульфату, меланіну та комбінації цих біологічно-активних речовин за тих самих умов рівень експресії зазначеного гена наближався до контролю, особливо при спільній дії препаратів.

Дані літератури свідчать, що в суглобовій порожнині пошкоджений і некротичний хрящ, а також кісткові фрагменти піддаються фагоцитозу лейкоцитами при вивільненні медіаторів запалення: АФК (супероксидний аніон ($O_2^{\bullet-}$), гідроксильний радикал ($\bullet OH$), перекис водню (H_2O_2)) тощо та лізосомальних ферментів, що клінічно виявляються запаленням суглоба та розвитком імунологічних реакцій на продукти розпаду [4, 5, 28]. У хондроцитах АФК регулюють внутрішньоклітинні молекули сигналізації, такі як рецепторні тирозинкінази, MAP-кінази (ERK1/2, JNK, p38), ліпідні шляхи (фосфоліпази, PKC і PI3-кіназа/Akt сигнальний шлях), фосфатази та фактори транскрипції (ядерний фактор-каппа В (NF- κB), p53 та AP-1), що беруть участь у сигнальних шляхах, які регулюють синтез та деградацію хрящової матриці. АФК можуть сприяти посиленню активності певної регуляторної сітки шляхом зворотної інактивації специфічних фосфатаз. Збільшення рівня АФК, у свою чергу, може активувати катаболічну сигналізацію, спричиняти ОС і пригнічувати анаболічні сигнальні шляхи за рахунок інгібування IGF-1 – залежного синтезу протеогліканів [28, 29].

Показано, що посилення транскрипції генів, відповідальних за синтез COX-2, синтази оксиду азоту (NO синтази), великої кількості хемокинів (CXCL1, CXCL2, CCL2 (C-C motif ligand 2, хемокин ліганд 2) тощо), IL-6 та інших генів, залучених у каскад запальних реакцій, може регулюватися IL-1 β , надлишок синтезу якого, у свою чергу, зумовлений різними чинниками, у тому числі ОС (виявлене нами зростання вмісту органічних гідропероксидів), наприклад, при дегенерації хрящової тканини та розвитку запалення [3].

При цьому відбувалося вивільнення прозапальних цитокінів у хондроцитах, зокрема IL-2, IL-8, ФНП, фактора активації тромбоцитів (PAF) тощо на тлі зниження протизапального IL-10 [3, 28, 29]. Вищезазначені цитокіни індукують синтез молекул клітинної адгезії (МКА) на плазматичній мембрані нейтрофілів і ендотеліоцитів, що призводить до міграції нейтрофілів із мікроциркуляторного русла в хондроцити [1–3]. Активація нейтрофілів обумовлює подальше збільшення вироблення прозапальних цитокінів і простагландинів, зростання синтезу МКА, підвищення проникності судин і генерації АФК у хондроцитах. Вивільнення цитокінів і зростання синтезу МКА сприяють подальшій міграції нейтрофілів, рекрутуванню В-клітин та активованих Т-клітин, що зумовлює цикл запалення, наслідком чого стає посилення

генерація АФК, розвиток ОС, зміна метаболізму хондроцитів і збільшення експресії ряду генів, залучених у розвиток запалення, та тих, що кодують матриксні металопротеїнази, (MMP)-1, -8, -13 [1–3, 30]. Також при цьому пригнічувалась експресія матриксних генів, наприклад, COL2A1, який кодує колаген II типу. Було зроблено припущення, що вплив IL-1 β на експресію вище зазначених генів може відбуватися за допомогою наступних факторів транскрипції: міоцит-енхансер, що зв'язує фактор-3 (MEF-3), CCAAT/енхансер-зв'язуючий білок (C/EBP) та NF- κB [3].

Відомо, що хондроїтинсульфат є основним компонентом протеогліканів, складовою хрящової матриці. Це сульфатований глікозаміноглікан, який складається з довгих нерозгалужених ланцюгів, що повторюють залишки N-ацетилгалактозаміну та глюкуронової кислоти. Більшість ацетилгалактозаміну мають N-сульфатовані залишки в 4-му та 6-му положеннях. Молекули хондроїтинсульфату беруть участь у процесах транспорту води, амінокислот і ліпідів у безсудинних зонах хряща [13–15, 31]. На деяких тваринних моделях хронічного остеоартиту було показано, що при терапії з використанням хондроїтинсульфату знижувалась експресія та синтез COX-2 і CCL2, пригнічувалась інфільтрація імунними клітинами синовіальної оболонки і зменшувався ступінь проліферації в синовіальній мембрані [15]. Також деякі дослідження *in vivo* показали, що при введенні хондроїтинсульфату в синовіальну тканину знижувалась концентрація IL-1 β [32] та інших медіаторів запалення (IL-6, NO синтаза, простагландин E2), крім того, пригнічувалась індукована експресія матриксних металопротеїназ (MMP)-3, -9, -13 у хондроцитах [33]. Хондропротектори захищають клітини, інгібуючи як окислення білків і ліпідів, так і синтез вільних радикалів, перешкоджаючи апоптозу хондроцитів [17]. Стосовно можливих молекулярних механізмів впливу хондроїтинсульфату на патерн експресії певних генів було виявлено, що він пригнічує активацію та ядерну транслокацію фактора NF κB у хондроцитах і синовіоцитах. NF κB , зв'язуючись із промотором відповідного гена, активує транскрипцію прозапальних цитокінів, NO синтази, COX-2, фосфоліпази A2, матриксних металопротеїназ, що, у свою чергу, поглиблює руйнівні процеси в деформованих остеоартритом суглобах. Хондроїтинсульфат пригнічує експресію RANKL і активує синтез остеопротегерину, регулюючи таким чином ремоделювання субхондральної кістки [34, 35].

Як було зазначено вище, меланіни захищають організм від ультрафіолетового та рентгенівського опромінення, володіють цитопротекторною, стресопротекторною, антиоксидантною та протизапальною дією [18–20, 36]. Продуктом меланіну, використаному в нашому дослідженні, є дріжджеподібні гриби, які живуть в екстремальних умовах Антарктичного півострову та використовують меланін для захисту від шкідливого ультрафіолетового випромінювання, перетворюючи енергію на безпечну кількість тепла. Завдяки цій властивості меланін поглинає до 99,9 % ультрафіолету, попереджає утворення вільних радикалів на мінімальному рівні і може бути більш потужним радіопротектором, антиоксидантом тощо порівняно з іншими меланінами [18, 36]. Стосовно можливих механізмів впливу меланіну як поліфенольної сполуки на експресію проаналізованого гена за умов остеоартрозу, перш за все, слід зазначити його виражену цитопротекторну дію: він знижує активність процесів перекисного окиснення ліпідів, збільшує активність ферментів антиоксидантної системи, запобігаючи пошкодженню ДНК; впливає на продукцію цито-

кинів: TNF- α , IL-6, VEGF тощо за рахунок впливу на експресію ядерних рецепторів PPAR [37]; посилює експресію eNOS та виділення протизапальних цитокінів для зниження інтенсивності запалення [2, 18–20, 36].

Таким чином, отримані нами результати можуть свідчити про доцільність спільного застосування хондроїтинсульфату та меланіну за умов остеоартрозу щурів, що, у свою чергу, сприяє більш швидкому відновленню структури хрящової тканини та патерну експресії певних генів, гальмуванню деградації, вільнорадикальних процесів і перекисного окислення ліпідів та пригнічує запалення.

Висновки. Показано зростання рівня експресії гена *Ptgs2* у клітинах хрящової тканини колінного суглоба щурів за умов експериментального остеоартрозу на тлі активування вільнорадикальних процесів (зростання вмісту органічних гідропероксидів). При використанні препарату на основі хондроїтинсульфату, меланіну та комбінації цих біологічно-активних речовин за тих самих умов рівень експресії цього гена та вміст органічних гідропероксидів наближались до контрольних значень, що вказує на протизапальні й антиоксидантні властивості зазначених препаратів, та їх більш ефективну дію при спільному застосуванні.

Список використаних джерел

1. *The impact of oxidative stress on Par2, Ptgs2 genes expression in rat duodenal epithelial cells under conditions of prolonged gastric hypochlorhydria and with administration of multiprobiotic* / A. Dranitsina, K. Dvorshchenko, D. Grebinyk et al. // Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2016. – Vol. 6, N 12. – P. 162–169. Available from: <http://www.researchgate.net/publication/>
2. *Tgfb1, Ptgs2 genes expression during dynamics of wound healing and with the treatment of melanin* / A. Dranitsina, O. Taburets, K. Dvorshchenko et al. // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 2017. – Vol. 8, N 1. – P. 2014–2023. Available from: <http://www.rjpbcs.com>
3. *Exuberant expression of chemokine genes by adult human articular chondrocytes in response to IL-1 β* / L. Sandell, X. Xing, C. Franz et al. // Osteoarthritis and Cartilage, 2008. – Vol. 16. – P. 1560–1571. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
4. *Avocado soybean unsaponifiables (ASU) suppress TNF- α , IL-1 β , COX-2, iNOS gene expression, and prostaglandin E 2 and nitric oxide production in articular chondrocytes and monocyte/macrophages* / R. Au, T. Al-Talib, A. Au et al. // Osteoarthritis and Cartilage, 2007. – Vol. 15, N 11. – P. 1249–1255. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
5. *Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors* / D. Felson, R. Lawrence, A. Dieppe et al. // Ann Intern Med., 2000. – Vol. 133, N 8. – P. 635–646. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
6. *Goldring S. The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis* / S. Goldring, M. Goldring // Clin Orthop., 2004. N 427. – P. S27–S36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
7. *Wu K. Cyclooxygenase 2 induction: molecular mechanism and pathophysiological roles* / K. Wu // J Lab Clin Med., 1996. Vol. 128. – P. 242–245. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
8. *Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis* / M. Benito, D. Veale, O. FitzGerald et al. // Annals of the rheumatic diseases, 2005. – Vol. 64, N 9. – P. 1263–1267. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
9. *Constitutive upregulation of the transforming growth factor- β pathway in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts* / P. Dirk, A. Beyer, D. Koczan et al. // Arthritis Research & Therapy, 2007. – Vol. 9. – P. 1–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
10. *Transforming growth factor beta 1 induces CXCL16 and leukemia inhibitory factor expression in osteoclasts to modulate migration of osteoblast progenitors* / K. Ota, P. Quint, M. Weivoda et al. // Bone, 2013. – Vol. 57, N 1. – P. 1–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
11. *Shi-Wen X. Regulation and function of connective tissue growth factor/CCN2 in tissue repair, scarring and fibrosis* / X. Shi-Wen, A. Leask, D. Abraham // Cytokine Growth factor Rev., 2008. Vol. 19. – P. 133–144. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
12. *Barnes E. Treatment of osteoarthritis* / E. Barnes, N. Edwards // South. Med. J., 2005. – Vol. 98, N 2. – P. 205–209. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
13. *Volpi N. Quality of different chondroitin sulfate preparations in relation to their therapeutic activity* / N. Volpi // Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2009. – Vol. 61, N 10. – P. 1271–1280. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
14. *Lauder R. Chondroitin sulfate: a complex molecule with potential impacts on a wide range of biological systems* / R. Lauder // Complementary Therapies in Medicine, 2009. – Vol. 17, N 1. – P. 56–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
15. *Largo R. Chondroitin sulfate improves synovitis in rabbits with chronic antigen induced arthritis* / R. Largo, J. Roman-Blas, J. Moreno-Rubio // Osteoarthritis Cartilage. – 2010. – Vol. 18, N 1. – P. 17–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
16. *Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation* / R. Zhang, M. Brennan, Z. Shen et al. // J. Biol. Chem., 2002. – Vol. 277. – P. 46116–46122. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
17. *Alternative therapy of earth elements increases the chondroprotective effects of chondroitin sulfate in mice* / M. Caraglia, S. Beninati, G. Giuberti et al. // Experimental & Molecular Medicine, 2005. – Vol. 37. – P. 476–481. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
18. *Agar N. Melanogenesis: a photoprotective response to DNA damage?* / N. Agar, A. Young // Mutation research, 2005. – Vol. 571. – P. 121–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
19. *Herbal melanin modulates tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin 6 (IL-6) and vascular endothelial growth factor (VEGF) production* / A. El-Obeid, S. Al-Harbi, N. Al-Jomah, A. Hassib // Phytomedicine, 2006. – Vol. 13. – P. 324–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
20. *Effect of melanin on the condition of gastric mucosa and reaction of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under acute stress* / D. Golyshkin, T. Falaleeva, K. Neporada et al. // Physiological journal, 2015. – Vol. 61, N 2. – P. 65–72. Available from: <http://biph.kiev.ua>
21. *Detection of aggrecanase- and MMP-generated catabolic neopeptides in the rat iodoacetate model of cartilage degeneration* / M. Janusz, C. Little, L. King et al. // Osteoarthritis Cartilage, 2004. – Vol. 12, N 9. – P. 720–728. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
22. *Jiang Z. Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation* / Z. Jiang, A. Woollard, S. Wolff // FEBS Lett., 1990. – Vol. 268, N 1. – P. 69–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
23. *Nourooz-Zadeh J. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation – Xylenol Orange assay* / J. Nourooz-Zadeh, J. Tajaddini-Sarmadi, S. Wolff // Anal. Biochem., 1994. – Vol. 220. – P. 403–409. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
24. *Protein measurement with the Folin phenol reagent* / O. Lowry, N. Rosebrough, A. Farr et al. // J Biol Chem., 1951. – Vol. 193, N 1. – P. 265–275. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
25. *Chomczynski P. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction* / P. Chomczynski, N. Sacchi // Anal. Biochem., 1987. – Vol. 162, N 1. – P. 156–159. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
26. *Livak K. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and method* / K. Livak, T. Schmittgen // Methods, 2001. – Vol. 25. – P. 402–408. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
27. *Prooxidant – antioxidant status and Ptgs2, Nos2 genes expression in rat cartilage with osteoarthritis and after the treatment of chondroitin sulfate* / Y. Tikhova, K. Dvorshchenko, A. Dranitsina et al. // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 2017. – Vol. 8, N 4. – P. 994–1001. Available from: <http://www.rjpbcs.com>
28. *Kamata H. Redox regulation of cellular signalling* / H. Kamata, H. Hirata // Cell Signal, 1999. – Vol. 11. – P. 1–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
29. *IGF-I stimulation of proteoglycan synthesis by chondrocytes requires activation of the PI 3-kinase pathway but not ERK MAPK* / B. Starkman, J. Cravero, M. Delcarlo et al. // Biochem J., 2005. – Vol. 389. – P. 723–729. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
30. *Haringman J. Chemokine and chemokine receptor expression in paired peripheral blood mononuclear cells and synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and reactive arthritis* / T. Smeets, P. Reinders-Blankert, P. Tak // Ann Rheum Dis., 2006. – Vol. 65. – P. 294–300. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
31. *Biochemical and pharmacological aspects of oral treatment with chondroitin sulfate* / A. Conte, N. Volpi, L. Palmieri et al. // Arzneimittel Forschung, 1995. – Vol. 45. – P. 918–925. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
32. *Pelletier J. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets* / J. Pelletier, J. Martel-Pelletier, S. Abramson // Arthritis & Rheumatology, 2001. – Vol. 44, N 6. – P. 1237–1247. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
33. *Glucosamine and chondroitin sulfate regulate gene expression and synthesis of nitric oxide and prostaglandin E(2) in articular cartilage explants* / P. Chan, J. Caron, G. Rosa et al. // Osteoarthritis Cartilage, 2005. – Vol. 13, N 5. – P. 387–394. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
34. *Chondroitin sulfate inhibits the nuclear translocation of nuclear factor-kappa B in interleukin-1 β -stimulated chondrocytes* / C. Jomphe, M. Gabriac, T. Hale et al. // Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 2008. – Vol. 102. – P. 59–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
35. *The differential expression of osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts is an indicator of the metabolic state of these disease cells* / K. Tat, J. Pelletier, D. Lajeunesse et al. // Clinical and experimental rheumatology, 2008. – Vol. 26, N 2. – P. 295–304. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
36. *The Effect of "Melanin-Gel" on the wound healing* / O. Taburets, O. Morgaienko, T. Kondratiuk et al. // Research journal of pharmaceutical, biological and chemical sciences, 2016. – Vol. 7, N 3. – P. 2031–2038. Available from: <http://www.rjpbcs.com>
37. *Chrysanthemum morifolium extract attenuates high-fat milk-induced fatty liver through peroxisome proliferator-activated receptor α -mediated mechanism in mice* / Y. Cui, X. Wang, J. Xue et al. // Nutr Res., 2014. – Vol. 34. – P. 268–275. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

References (Scopus)

1. Dranitsina A., Dvorshchenko K., Grebinyk D., Ostapchenko L. The impact of oxidative stress on *Par2*, *Ptgs2* genes expression in rat duodenal epithelial cells under conditions of prolonged gastric hypochlorhydria and with administration of multiprobiotic. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2016;6(12):162-9.
2. Dranitsina A., Taburets O., Dvorshchenko K., Grebinyk D., Beregova T., Ostapchenko L. *Tgfb1*, *Ptgs2* genes expression during dynamics of wound healing and with the treatment of melanin. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2017;8(1): 2014-23.
3. Sandell L., Xing X., Franz C., Davies S., Chang Li-Wei., Patra D. Exuberant expression of chemokine genes by adult human articular chondrocytes in response to IL-1b. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008;16(12):1560-71. PMC2605974.
4. Au R., Al-Talib T., Au AY., Phan P., Frondoza C. Avocado soybean unsaponifiables (ASU) suppress TNF- α , IL-1 β , COX-2, iNOS gene expression, and prostaglandin E 2 and nitric oxide production in articular chondrocytes and monocyte/macrophages. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007;15(11):1249-55. PMID: 17845860.
5. Felson D., Lawrence R., Dieppe P., Hirsch R., Helmick C., Jordan J. Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Ann Intern Med*. 2000;133(8):635-46. PMID: 11033593.
6. Goldring S., Goldring M., The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res*. 2004;(427 Suppl):S27-36. PMID: 15480070.
7. Wu K. Cyclooxygenase 2 induction: molecular mechanism and pathophysiologic roles. *Am J Pathol*. 2004; 165(3): 753-61. PMC1618587.
8. Benito M., Veale D., FitzGerald O., van den Berg W., Bresnihan B. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2005;64(9):1263-7.
9. Dirk P., Beyer A., Koczan D., Wilhelm T., Thiesen Hans-Jürgen., Kinne R. Constitutive upregulation of the transforming growth factor- β pathway in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther*. 2007; 9(3):R59. PMC2206335.
10. Ota K., Quint P., Weivoda M., Ruan M., Pederson L., Westendorf J., Khosla S., Oursler M. Transforming growth factor beta 1 induces CXCL16 and leukemia inhibitory factor expression in osteoclasts to modulate migration of osteoblast progenitors. *Bone*. 2013 Nov;57(1):68-75. PMID: 23891907.
11. Shi-Wen X., Leask A., Abraham D. Regulation and function of connective tissue growth factor/CCN2 in tissue repair, scarring and fibrosis. *Cytokine Growth Factor Rev*. Cytokine Growth Factor Rev. 2008 Apr;19(2):133-44. PMID: 18358427.
12. Barnes E., Edwards N. Treatment of osteoarthritis. *South Med J*. 2005;98(2):205-9.
13. Volpi N. Quality of different chondroitin sulfate preparations in relation to their therapeutic activity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology. J Pharm Pharmacol*. 2009;61(10):1271-80. PMID: 19814858.
14. Lauder R. Chondroitin sulfate: a complex molecule with potential impacts on a wide range of biological systems. *Complement Ther Med*. 2009;17(1):56-62. PMID: 19114230.
15. Largo R., Roman-Blas J., Moreno-Rubio J. Chondroitin sulfate improves synovitis in rabbits with chronic antigen induced arthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18(1):17-23. Reference Number: 18.a55e6cc1.1513693884.57da72d7.
16. Zhang R., Brennan M., Shen Z., MacPherson J., Schmitt D., Molenda C., Hazen S. Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18 Suppl 1:S17-23. PMID: 20399901.
17. Caraglia M., Beninati S., Giuberti G., D'Alessandro A., Lentini A., Abbruzzese A. Alternative therapy of earth elements increases the chondroprotective effects of chondroitin sulfate in mice. *Exp Mol Med*. 2005;37(5):476-81. PMID: 16264272.
18. Agar N., Young A. Melanogenesis: a photoprotective response to DNA damage? *Mutat Res*. 2005;571(1-2):121-32. PMID: 15748643.
19. El-Obeid A., Al-Harbi S., Al-Jomah N., Hassib A. Herbal melanin modulates tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin 6 (IL-6) and vascular endothelial growth factor (VEGF) production. *Phytomedicine*. 2006;13:324-33. PMID: 16635740.
20. Golyskhin D., Falaleeva T., Neporada K., Beregova T. Effect of melanin on the condition of gastric mucosa and reaction of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under acute stress. *Physiological journal* 2015;61(2):65-72.
21. Janusz M., Little C., King L., Hookfin E., Brown K., Heitmeyer S., Caterson B., Poole A., Taiwo Y. Detection of aggrecanase- and MMP-generated catabolic neoepitopes in the rat iodoacetate model of cartilage degeneration. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004;12(9):720-8. PMID: 15325638.
22. Jiang Z., Woollard A., Wolff S. Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. *FEBS Lett*. 1990;268(1):69-71. PMID: 2384174.
23. Nourooz-Zadeh J., Tajaddini-Sarmadi J., Wolff S. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation – Xylenol Orange assay. *Anal Biochem*. 1994;220(2):403-9. PMID: 7978285.
24. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75. PMID: 14907713.
25. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162(1):156-9. PMID: 2440339.
26. Livak K., Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and method. *Methods*. 2001;25(4):402-8. PMID: 11846609.
27. Tikhova Y., Dvorshchenko K., Dranitsina A., Grebinyk D., Korotkyi O., Ostapchenko L. Prooxidant – antioxidant status and *Ptgs2*, *Nos2* genes expression in rat cartilage with osteoarthritis and after the treatment of chondroitin sulfate. *RJPBCS*. 2017;8(4):994-1001.
28. Kamata H., Hirata H. Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal*. 1999;11(1):1-14. PMID: 10206339.
29. Starkman B., Cravero J., Delcarlo M., Loeser RF. IGF-I stimulation of proteoglycan synthesis by chondrocytes requires activation of the PI 3-kinase pathway but not ERK MAPK. *Biochem J*. 2005;389(Pt 3):723-9. PMID: 15801908.
30. Haringman J., Smeets T., Reinders-Blankert P., Tak P. Chemokine and chemokine receptor expression in paired peripheral blood mononuclear cells and synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and reactive arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2006; 65(3): 294-300. PMC1798063.
31. Conte A., Volpi N., Palmieri L., Bahous I., Ronca G. Biochemical and pharmacological aspects of oral treatment with chondroitin sulfate. *Arzneimittelforschung*. 1995;45(8):918-25. PMID: 7575762.
32. Pelletier J., Martel-Pelletier J., Abramson S. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum*. 2001;44(6):1237-47. PMID: 11407681.
33. Chan P., Caron J., Rosa G., Orth M. Glucosamine and chondroitin sulfate regulate gene expression and synthesis of nitric oxide and prostaglandin E(2) in articular cartilage explants. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005;13(5):387-94. PMID: 15882562.
34. Jomphe C., Gabriac M., Hale T., Héroux L., Trudeau L., Deblois D., Montell E., Vergés J., du Souich P. Chondroitin sulfate inhibits the nuclear translocation of nuclear factor- κ B in interleukin-1 β -stimulated chondrocytes. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2008;102(1):59-65. PMID: 17983423.
35. Tat Kwan S., Pelletier J., Lajeunesse D., Fahmi H., Lavigne M., Martel-Pelletier J. The differential expression of osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts is an indicator of the metabolic state of these disease cells. *Clin Exp Rheumatol*. 2008;26(2):295-304. PMID: 18565252.
36. Taburets O., Morgaienko O., Kondratiuk T., Beregova T., Ostapchenko L. The Effect of "Melanin-Gel" on the Wound Healing. *RJPBCS*. 2016;7(3):2031-8.
37. Cui Y., Wang X., Xue J., Liu J., Xie M. Chrysanthemum morifolium extract attenuates high-fat milk-induced fatty liver through peroxisome proliferator-activated receptor α -mediated mechanism in mice. *Nutr Res*. 2014;34(3):268-75. PMID: 24655494.

Надійшла до редколегії 05.03.2018

Отримано виправлений варіант 09.04.2018

Підписано до друку 09.04.2018

Received in the editorial 05.03.2018

Received a revised version on 09.04.2018

Signed in the press on 09.04.2018

А. Драницина, канд. биол. наук, О. Блохина, асп., А. Короткий, канд. биол. наук, Е. Дворщенко, д-р биол. наук, Л. Остапченко, д-р биол. наук, УНЦ "Институт биологии та медицины", Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ЕКСПРЕССИЯ ГЕНА *PTGS2* В КЛЕТКАХ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ КОЛЕННОГО СУСТАВА КРЫС ПРИ ОСТЕОАРТРОЗЕ И ПРИ ВВЕДЕНИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Остеоартроз – дегенеративно-дистрофическое заболевание суставов, опосредованное действием различных факторов. На сегодня нет эффективного лечения, которое бы обеспечивало полное выздоровление от артроза. Хондропротекторы применяются в медицине в течение длительного времени, но сырьем для них является смесь молекул хондроитин сульфата с разной длиной и вариациями в положении сульфатных групп, которая имеет различные уровни очистки, вызывает порой различные побочные эффекты. Целью работы было проанализировать интенсивность свободно-радикальных процессов и экспрессию гена – медиатора воспалительного ответа – *Ptgs2* в хрящевой ткани крыс с индуцированным моноидоацетатом натрия артрозом и при введении биологически активных веществ: хондроитин сульфата, меланина (полифенольное соединение с антиоксидантными и противовоспалительными свойствами) и их ком-

бинации. Работа была выполнена на белых нелинейных крысах. Использованные методы: определение концентрации органических гидропероксидов, ОТ-ПЦР в реальном времени, статистические методы. Молекулярно-биохимический анализ хрящевой ткани крыс с индуцированным моноидооацетатом натрия артрозом обнаружил повышение уровня экспрессии гена *Ptgs2* в 8,1 раза ($p \leq 0,001$), усиление свободно-радикальных процессов (увеличение содержания органических гидропероксидов в 2 раза ($p \leq 0,001$)) по сравнению с контрольной группой животных, что указывает на нарушение редокс-баланса клеток, развитие окислительного стресса и активацию воспалительных и деструктивных процессов в ткани. При использовании препарата на основе хондроитин сульфата, меланина и комбинации этих биологически активных веществ при тех же условиях уровень экспрессии этого гена и содержание органических гидропероксидов приближались к контрольным значениям, что указывает на противовоспалительные и антиоксидантные свойства этих препаратов, и о целесообразности совместного применения хондроитин сульфата и меланина при остеоартрозе крыс, что, в свою очередь, способствует более быстрому восстановлению структуры хрящевой ткани и паттерна экспрессии определенных генов, торможению дегенерации, свободно-радикальных процессов и перекисного окисления липидов, и подавляет воспаление.

Ключевые слова: хрящ, остеоартроз, крысы, хондроитин сульфат, *Ptgs2*, воспаление.

A.Dranitsina, Ph. D., O. Blohina, Ph. D., stud., O. Korotkiy, Ph. D.,

K. Dvorshchenko, D. Sci., L. Ostapchenko, D. Sci.

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

EXPRESSION OF *PTGS2* GENE IN RAT KNEE CARTILAGE CELLS UNDER CONDITIONS OF OSTEOARTHRITIS AND WITH ADMINISTRATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

Osteoarthritis – degenerative-dystrophic cartilage disease, caused by various factors. To date, there is no effective treatment that would provide a full recovery from arthrosis. Chondroprotectors have been used in medicine for a long time, but the raw material for them is a mixture of chondroitin sulfate molecules of varying lengths and variations in the position of sulfate groups, which has different levels of purification, which sometimes causes various undesirable effects. The purpose of the work was to analyze the intensity of free radical processes and the expression of the inflammatory response mediator gene – *Ptgs2* in cartilage tissue of rat-induced sodium monoiodoacetate arthrosis and the administration of biologically active substances: chondroitin sulfate, melanin (polyphenolic compound with antioxidant and anti-inflammatory properties), and their combination. The work was performed on white nonlinear rats. Used methods: determination of concentration of organic hydroperoxides, RT-PCR in real time, statistical methods. The molecular-biochemical analysis of cartilaginous tissue of rat-induced sodium monoiodoacetate by arthrosis showed a 8.1-fold increase in the expression of the *Ptgs2* gene ($p \leq 0.001$), an increase in free radical processes (2-fold increase of organic hydroperoxides content ($p \leq 0.001$)) in comparison with a control group of animals, indicating a redox cell imbalance, the development of oxidative stress and the activation of inflammatory and destructive processes in the tissue. When using chondroitin sulfate, melanin, and combinations of these biologically active substances under the same conditions, the level of expression of this gene and the content of organic hydroperoxides approached the control values indicating the anti-inflammatory and antioxidant properties of these drugs and the appropriateness of the joint use of chondroitin sulfate and melanin under conditions of osteoarthritis in rats, which, in turn, promotes a faster restoration of the structure of the cartilage tissue and the pattern of expression of certain genes, inhibited degradation of free-radical processes and lipid peroxidation and inhibits inflammation.

Key words: cartilage, osteoarthritis, rats, chondroitin sulfate, *Ptgs2*, inflammation.

УДК 612.741 + 612.816

О. Колосова, здобувач, Т. Халявка, канд. хім. наук,
Національний університет фізичного виховання та спорту України, Київ, Україна,

СКОРОТЛИВІ ТА РЕЛАКСАЦІЙНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ М'ЯЗІВ У ВИСОКОКВАЛІФІКОВАНИХ СПОРТСМЕНІВ-ФРІСТАЙЛІСТІВ

Одним з напрямів підвищення спеціальної фізичної працездатності спортсменів з уникненням спортивного травматизму може бути розробка принципів спеціального міорелаксаційного тренування. Швидкість міорелаксації, тобто розслаблення скелетних м'язів, є не менш важливим показником функціонування нервово-м'язового апарату і функціональних можливостей організму, ніж скоротливі характеристики м'язів. Метою нашої роботи було дослідження скоротливої та релаксаційної здатності м'язів у групі висококваліфікованих спортсменів, які займаються фрістайлом, за допомогою методу поверхневої електроміографії. Досліджували скоротливі та релаксаційні властивості м'язів нижньої кінцівки – переднього великогомілкового м'язу (*m. tibialis anterior*, TA) та латеральної голівки литкового м'язу (*m. gastrocnemius lateralis*, GL) при виконанні їх максимального довільного скорочення в ізометричному режимі. Визначали величини максимального довільного скорочення (МДС), швидкості довільного скорочення (ШДС) та швидкості довільного розслаблення (ШДР) *m. tibialis anterior* при спробі тильного згинання стопи і *m. gastrocnemius lateralis* при спробі її підшовного згинання. Виявили певні статистично значущі відмінності вищевказаних показників, а саме: величини ШДР ТА з лівого боку тіла та ШДР GL з обох боків тіла були меншими, ніж відповідні величини ШДС ($p < 0,05$). Крім цього, ШДС GL з лівого боку було статистично значуще ($p < 0,05$) більше, ніж з правого. Такі результати можуть свідчити про переважання збуджувальних процесів над гальмівними в нервовій і м'язовій системах даної групи осіб, а також про специфічну адаптацію нервово-м'язового апарату тестованих спортсменів, пов'язану з особливостями міжм'язової координації при виконанні рухів у фрістайлі. Існує необхідність розробки і впровадження у тренувальний процес спеціальних релаксаційних вправ, спрямованих на підвищення ефективності спортивної підготовки та збереження здоров'я спортсменів.

Ключові слова: швидкість довільного скорочення м'язів, швидкість довільного розслаблення м'язів, максимальне довільне скорочення м'язів.

Вступ. Адаптація до фізичних перевантажень в екстремальних умовах спортивної діяльності належить до найбільш актуальних проблем сучасної спортивної фізіології і медицини. Шляхи підвищення спеціальної фізичної працездатності спортсменів ґрунтуються головним чином на збільшенні об'єму та інтенсивності тренувальних і змагальних навантажень. Проте зі збільшенням навантажень спостерігається зростання спортивного травматизму. Очевидна необхідність пошуку принципово нових шляхів для одночасного вирішення проблеми досягнення найвищих рівнів спеціальної фізичної працездатності і проблеми збереження здоров'я спортсменів. Одним із напрямів може бути розробка принци-

пів спеціального міорелаксаційного тренування, спрямованого на підвищення ефективності процесу підготовки спортсменів на усіх етапах розвитку спортивних навичок [2]. Швидкість міорелаксації, тобто розслаблення скелетних м'язів, є не менш важливим показником функціонування нервово-м'язового апарату і функціональних можливостей організму, ніж скоротливі характеристики м'язів [4]. Активізація гальмівних систем під впливом спеціальних вправ призводить до зниження рівня збудження в центральній нервовій системі (ЦНС) і швидкій ліквідації негативних наслідків підвищеної збудливості. Знижуються психоемоційна напруженість і гіпертонус скелетних м'язів, і в результаті покращу-

ються регуляція, координація, біомеханічна структура рухів, зростають їх економічність і ефективність, зростає швидкість, витривалість, технічна майстерність, покращується спеціальна фізична працездатність і спортивні результати [2–4].

Для вивчення механізмів регуляції і координації довільних рухів, контролю за скоротливими і релаксацийними характеристиками скелетних м'язів, функціональним станом ЦНС і нервово-м'язового апарату перспективним може бути дослідження з використанням методу поверхневої електроміографії (ЕМГ) [1, 6, 7]. Позитивною якістю методу є його неінвазивність, простота дослідження, можливість сумарної оцінки одночасно декількох м'язів (агоністів і антагоністів) у процесі руху або ізометричного скорочення. Дану методику широко використовують у різних системах аналізу руху, для оцінки тремору, в динаміці відновлювального лікування при травматичних ураженнях кінцівок [5, 8–11]. Особливої уваги заслуговують дослідження з використанням поверхневої ЕМГ, зокрема з визначенням швидкості довільного розслаблення м'язів (ШДР), що доводять унікальні властивості гальмівних і міорелаксацийних процесів. ШДР розглядається як показник термінової та довготривалої адаптації, як параметр координації рухів, мінімізації енергозатрат і швидкості відновлювальних процесів. Виявлено статистично значущий позитивний взаємозв'язок ШДР з гальмівними і негативний – зі збуджувальними процесами у ЦНС [3, 4].

Метою нашої роботи було дослідження скоротливої та релаксацийної здатності м'язів нижньої кінцівки висококваліфікованих спортсменів, які займаються фрістайлом, за допомогою методу поверхневої електроміографії.

Матеріали і методи

В електроміографічних (ЕМГ) дослідженнях взяли участь 10 спортсменів високої кваліфікації (майстри спорту та майстри спорту міжнародного класу), які спеціалізуються у фрістайлі, віком 18–27 років. Обстежувані не мали неврологічних захворювань в анамнезі і ознак неврологічної патології на момент обстеження. Всі учасники були ознайомлені з процедурою тестів і надали письмову згоду. Всі обстежувані особи мали праві переважачі верхню та нижні кінцівки. Використовували методику поверхневої ЕМГ [1, 6, 7]. Визначали величини максимального довільного скорочення (МДС), швидкості довільного скорочення (ШДС) та швидкості довільного розслаблення (ШДР) м'язів нижньої кінцівки – переднього великогомілкового м'язу (*m. tibialis anterior*, TA) при спробі тильного згинання стопи та латеральної голівки литкового м'язу (*m. gastrocnemius lateralis*, GL) при спробі її підшовного згинання.

Реєстрацію електроміографічних сигналів проводили за допомогою нейродіагностичного комплексу Nicolet Viking Select (США-Німеччина). Протягом тесту спортсмен перебував у положенні сидячи, поставивши по черзі праву та ліву ступні в нейтральному положенні на

жорстко закріплену педаль. У вихідному положенні досліджувані м'язи перебували в розслабленому стані. Тест складався із трьох етапів: перший – максимально швидке довільне напруження м'язів (перехід із стану спокою у стан максимального довільного скорочення), другий – утримання максимального напруження протягом 5 с та третій – максимально швидке довільне розслаблення м'язів (перехід із стану максимального довільного скорочення у стан спокою). Кожний етап починався по команді експериментатора. Обстежуваним надавали інструкції напружувати та розслаблювати м'язи максимально швидко, а також напружувати м'язи з максимальною силою на другому етапі тесту. Проводили три тестові спроби з перервою 5 хв, для аналізу обирали найвищі показники амплітуди МДС, ШДС та ШДР. Реєстрацію ЕМГ-сигналів проводили в частотному діапазоні 10 Гц – 5 кГц. Після цього ЕМГ-сигнали піддавали повному (двопівперіодному) випрямленню, а потім згладжуванню з константою часу 100 мс. ШДС розраховували як відношення Ампл до ЧасС, де Ампл – різниця амплітуд електроміограми (ЕМГ) у стані спокою перед тестом та максимальної амплітуди динамічного компоненту ЕМГ на початку виконання МДС, а ЧасС – час зростання амплітуди ЕМГ від мінімуму до максимуму на початку тесту. ШДР (мВ/с) розраховували як відношення Ампл до ЧасР, де Ампл – різниця максимальної амплітуди динамічного компоненту ЕМГ у кінці виконання МДС та амплітуди електроміограми у стані спокою після розслаблення м'яза, а ЧасР – час зниження амплітуди ЕМГ від максимуму до мінімуму у кінці тесту.

Результати та їх обговорення

Аналіз отриманих результатів показав, що амплітуди максимального довільного скорочення *m. tibialis anterior* та *m. gastrocnemius lateralis* в середньому по групі не мають значущих відмінностей для різних м'язів та для різних боків тіла (рис. 1).

Виявлено також, що величини швидкості довільного скорочення – показника скоротливих (т. зв. вибухових) якостей, і швидкості довільного розслаблення – показника міорелаксацийних можливостей м'язів нижньої кінцівки в середньому по групі мають статистично значущі відмінності. Наприклад, величини ШДР *m. tibialis anterior* з лівого боку тіла та *m. gastrocnemius lateralis* з обох боків тіла менші, ніж ШДС (рис. 2). Такі результати можуть свідчити про переважання збуджувальних процесів над гальмівними у нервовій та м'язовій системах даної групи тестованих. Крім цього, ШДС *m. gastrocnemius lateralis* з лівого боку статистично значуще ($p < 0,05$) більше, ніж з правого. Враховуючи тенденцію до збільшення величин МДС м'язів лівого боку тіла (рис. 1), можна вважати такі дані ознакою специфічної адаптації нервово-м'язового апарату тестованих спортсменів, пов'язану з особливостями міжм'язової координації при виконанні рухів у фрістайлі.

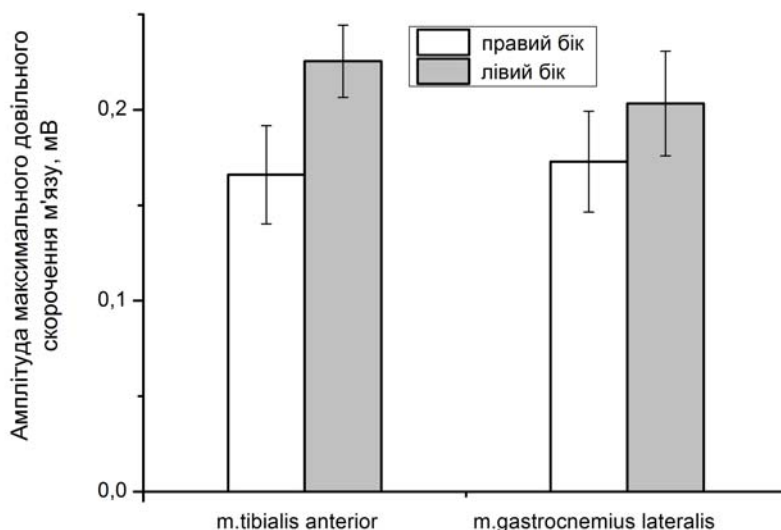


Рис. 1. Порівняння величин максимального довільного скорочення м'язів литки у спортсменів, що займаються фрістайлом

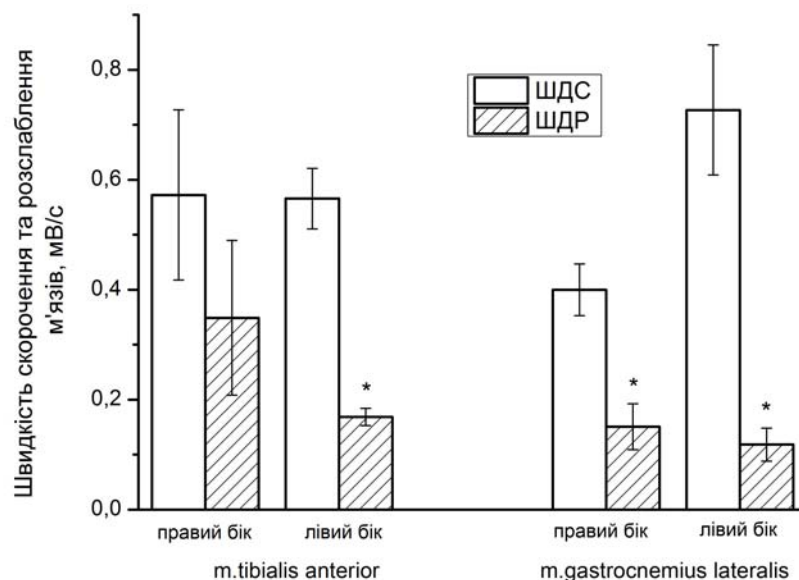


Рис. 2. Порівняння скоротливих (ШДС) та релаксаційних (ШДР) характеристик м'язів нижньої кінцівки у спортсменів, що займаються фрістайлом. (Примітка: * $p < 0,05$ при порівнянні відповідних значень ШДС та ШДР)

Слід зазначити, що отримані дані узгоджуються з результатами досліджень інших авторів [3], за якими величини швидкості довільного розслаблення чотириголового м'яза стегна обох нижніх кінцівок виявилися нижчими порівняно з величинами швидкості їх довільного скорочення. До того ж, дослідження зв'язку між рівнем спортивних досягнень та величинами МДС, ШДС та ШДР виявило, що швидкість розслаблення м'язів була єдиною якістю, яка статистично значуще впливає на прогрес спортивних результатів на етапі вищої спортивної майстерності [3, 4].

Таким чином, за допомогою ЕМГ-дослідження нервово-м'язового апарату можна визначити скоротливі й релаксаційні якості м'язів, що дозволяє оцінити баланс збуджувальних і гальмівних процесів у нервовій та м'язовій системах людини.

Висновки

1. Виявлено, що у групі висококваліфікованих спортсменів-фрістайлістів величини швидкості довільного розслаблення переднього великогомілкового м'язу (*m. tibialis anterior*) та латеральної голівки литкового м'язу (*m. gastrocnemius lateralis*) нижньої кінцівки стати-

стично значуще менші, ніж величини швидкості їх довільного скорочення.

2. Переважання збуджувальних процесів над гальмівними у нервовій та м'язовій системах спортсменів-фрістайлістів свідчить про необхідність розробки та впровадження у тренувальний процес спеціальних релаксаційних вправ, спрямованих на підвищення ефективності спортивної підготовки та збереження здоров'я спортсменів.

Передбачається проведення подальшого дослідження скоротливих та релаксаційних якостей м'язів у спортсменів різного рівня адаптації до тривалого фізичного навантаження, різної кваліфікації та різних видів спорту.

Список використаних джерел

1. Бадалян Л.О. Клиническая электромиография / Л.О. Бадалян, И.А. Скворцов. – М.: Медицина, 1986. – 368 с.
2. Высочин Ю.В. Активная миорелаксация и саморегуляция в спорте: монография / Ю.В. Высочин, В.В. Лукоянов. – СПб.: ГАФК им. П.Ф. Лесгафта, 1997. – 85 с.
3. Влияние сократительных и релаксационных характеристик мышц на рост квалификации спортсменов / Ю.В. Высочин, Ю.П. Денисенко, В.А. Чуев и др. // Теория и практика физ. культуры, 2003, № 6, С. 25–27.

4. Миорелаксация в механизмах специальной физической работоспособности спортсменов / Ю.П. Денисенко, Ю.В. Высочин, Л.Г. Яценко, Ю.В. Гордеев // Педагогико-психологические и медико-биологические проблемы физической культуры и спорта, 2014, № 1(30). – С. 25–32.
5. Зенков Л.П. Функциональная диагностика нервных болезней: Руководство для врачей. 3-е изд., перераб. и доп. / Л.П. Зенков. – М.: МЕДпресс-информ, 2004. – 488 с.
6. Команцев В.Н. Методические основы клинической электромиографии. Руководство для врачей / В.Н. Команцев. – СПб., 2006. – 349 с.
7. Николаев С.Г. Практикум по клинической электромиографии / С.Г. Николаев // Ивановская государственная медицинская академия, 2003. – 265 с.
8. Muscle Activity in Upper-Body Single-Joint Resistance Exercises with Elastic Resistance Bands vs. Free Weights / R. Bergquist, V. Iversen, P. Mork, M.S. Fimland / J Hum Kinet., 2018. – Vol. 23, № 61 – P. 5–13.
9. Clarys J. Electromyography in sports and occupational settings: an update of its limits and possibilities / J. Clarys // Ergonomics, 2000. – Vol. 43. – P. 1750–1762.
10. Surface electromyography applications in the sport / N. Massó, F. Rey, D. Romero et al. // Apunts Med. Esport., 2010. – Vol. 45, № 165. – P. 121–130.
11. Schemmann H. Musculoskeletal Assessments Used in Quantitatively Based Studies About Posture and Movement in High String Players: A Systematic Review / H. Schemmann, N. Rensing, C. Zalpour // Med. Probl. Perform. Art., 2018. – Vol. 33, № 1. – P. 56–71.

References (Scopus)

1. Badalian L., Skvortsov I. [Clinical electromyography]. M: Meditsina; 1986. 368 p. Russian.
2. Vysochin Y., Lukoyanov V. [Active myorelaxation and self-regulation in sport: Monograph]. SPb: GAFK im. P.F. Lesgafta; 1997. 85 p. Russian.

Е. Колосова, соискатель., Т. Халявка, канд. хим. наук,
Национальный университет физического воспитания и спорта Украины, Киев, Украина

СОКРАТИТЕЛЬНЫЕ И РЕЛАКСАЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЫШЦ У ВЫСОКОКВАЛИФИЦИРОВАННЫХ СПОРТСМЕНОВ-ФРИСТАЙЛИСТОВ

Одним из направлений повышения специальной физической работоспособности спортсменов без роста спортивного травматизма может быть разработка принципов специальной миорелаксационной тренировки. Скорость миорелаксации, то есть расслабления скелетных мышц, является не менее важным показателем функционирования нервно-мышечного аппарата и функциональных возможностей организма, чем сократительные характеристики мышц. Целью нашей работы было исследование сократительных и релаксационных способностей мышц в группе высококвалифицированных спортсменов, которые занимаются фристайлом, с помощью метода поверхностной электромиографии. Исследовали сократительные и релаксационные свойства мышц нижней конечности – *m. tibialis anterior* (TA) и *m. gastrocnemius lateralis* (GL) при выполнении их максимального произвольного сокращения в изометрическом режиме. Определяли величины максимального произвольного сокращения (МДС), скорости произвольного сокращения (СПС) и скорости произвольного расслабления (СПР) *m. tibialis anterior* при попытке тыльного сгибания стопы и *m. gastrocnemius lateralis* при попытке ее подошвенного сгибания. Выявили определенные статистически значимые отличия вышеуказанных показателей. Так, величины СПР TA с левой стороны тела и СПР GL с обеих сторон тела меньше, чем соответствующие величины СПС ($p < 0,05$). Кроме этого, СПС GL с левой стороны статистически значимо ($p < 0,05$) больше, чем с правой. Такие результаты могут свидетельствовать о преобладании возбуждающих процессов над тормозными в нервной и мышечной системах данной группы тестируемых, а также о специфической адаптации нервно-мышечного аппарата спортсменов, связанную с особенностями межмышечной координации при выполнении движений во фристайле. Существует необходимость разработки и внедрения в тренировочный процесс специальных релаксационных упражнений, направленных на повышение эффективности спортивной подготовки и сохранения здоровья спортсменов.

Ключевые слова: скорость произвольного сокращения мышц, скорость произвольного расслабления мышц, максимальное произвольное сокращение мышц.

O. Kolosova, asp., Khalyavka, Ph. D.,
National University of Physical Education and Sport in Ukraine, Kyiv, Ukraine

MUSCLE CONTRACTILE AND RELAXATION INDICES IN QUALIFIED FREESTYLE ATHLETES

Adaptation to physical stress in the extreme conditions of sports activity is one of the most actual problems of sports physiology and medicine. Development of the principles of special muscle relaxation exercises can be one of the ways to improve the special physical capability of athletes without increasing number of sports injuries. Muscle relaxation velocity is as important indice of neuromuscular system functioning and capacities of the human organism as muscle contraction one. The objective of the study was to assess contractile and relaxation muscle properties in qualified athletes, specializing in freestyle. Ten athletes, 18-27 years of age, took part in this EMG-study. The method of superficial electromyography was used. Muscle contractile and relaxation characteristics of leg muscles – *m. tibialis anterior* and *m. gastrocnemius lateralis* during isometric maximal voluntary contraction were investigated. The magnitudes of muscle voluntary contraction (MVC), voluntary contraction velocity (VCV), voluntary relaxation velocity (VRV) in *m. tibialis anterior* (TA) and *m. gastrocnemius lateralis* (GL) were assessed during dorsiflexion and plantar flexion, respectively. Some specific significant differences of above mentioned indices were determined. It was found that VRV of the TA left side and VRV of GL both sides were significantly ($p < 0,05$) less than corresponding VCV. This might be due to predominance of excitatory processes over inhibitory ones in the neuromuscular system of this tested group. Besides this, VCV of the GL left side was significantly higher than of the right one ($p < 0,05$). This might be the evidence of specific adaptive reactions of neuromuscular system to physical activity, associated with the peculiarities of muscle coordination during freestyle athletes movements. Apparently, there is a necessity of developing special relaxation exercises and introducing them in the training process to improve the effectiveness of athletic training while keeping athletes health.

Key words: muscle voluntary contraction velocity, muscle voluntary relaxation velocity, maximal voluntary contraction.

3. Vysochin Y., Denisenko Y., Chuev V. et al. [Influence of contractile and relaxation muscles characteristics on the athletes qualification progress]. Teorija i praktika fiz. kultury. 2003;6:25-27. Russian.

4. Denisenko Y., Vysochin Y., Yatsenko L., Gordeev Y. [Myorelaxation in mechanisms of specific physical performance of athletes]. Pedagogiko-psikhologicheskiye i mediko-biologicheskiye problemy fizicheskoy kultury i sporta. 2014;1(30):C. 25-32. Russian.

5. Zenkov L. [Functional Diagnosis of Nervous Diseases: A Guide for Physicians. 3rd ed., Revised. and added]. M: MEDpress-inform; 2004. 488 p. Russian.

6. Komantsev V. [Methodical bases of clinical electromyography]. Saint Petersburg; 2006. 349 p. Russian.

7. Nikolaev S. [Practicum on clinical electromyography]. Ivanovskaya gosudarstvennaya meditsinskaya akademiya; 2003. 265 p. Russian.

8. Bergquist R., Iversen V., Mork P. et al. Muscle Activity in Upper-Body Single-Joint Resistance Exercises with Elastic Resistance Bands vs. Free Weights. J Hum Kinet. 2018;23(61):5-13.

9. Clarys J. Electromyography in sports and occupational settings: an update of its limits and possibilities. Ergonomics. 2000;43:1750-1762.

10. Massó N., Rey F., Romero D. et al. Surface electromyography applications in the sport. Apunts Med. Esport. 2010;45(165):121-130.

11. Schemmann H., Rensing N., Zalpour C. Musculoskeletal Assessments Used in Quantitatively Based Studies About Posture and Movement in High String Players: A Systematic Review. Med Probl Perform Art. 2018;33(1):56-71.

Надійшла до редколегії 05.03.2018

Отримано виправлений варіант 09.04.2018

Підписано до друку 09.04.2018

Received in the editorial 05.03.2018

Received a revised version on 09.04.2018

Signed in the press on 09.04.2018

УДК 612.82/83; 612.821

М. Черних, студ., І. Зима, д-р біол. наук,
ННЦ "Інститут біології та медицини",
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ВПЛИВ ПОТОЧНОГО КОНТЕКСТУ, СТВОРЕНОГО СПРИЙНЯТТЯМ ЕМОЦІЙНО ЗАБАРВЛЕНИХ ВИРАЗІВ ОБЛИЧ, НА ТАРГЕТНЕ ПРЕД'ЯВЛЕННЯ НЕЙТРАЛЬНИХ ЗОРОВИХ ОБРАЗІВ

Вивчення впливу поточного контексту, створеного сприйняттям емоційно забарвлених виразів облич, на таргетне пред'явлення нейтральних зорових образів. В експерименті взяли участь 30 студентів-добровольців, яким було продемонстровано 2 серії зображень і зареєстровано потенціали, пов'язані з подією. Епоха аналізу до стимулу становила 150 мс., після стимулу – 800 мс. Рідкісні стимули (нейтральні за валентністю) демонструвалися за довільним патерном, в якому ймовірність появи рідкісного стимулу становила 30 %, тривалість стимулу – 500 мс. Обробка отриманих даних була проведена за допомогою програмного пакета Eeglab. Ділянками із статистично достовірними відмінностями амплітудних характеристик вважали такі, для яких $p < 0.05$ (з імплементацією критерію FDR). Досліджувалися зміни амплітудних характеристик таких компонентів кривої ППП, як N200, компоненту P300 (та його субкомпонентів P3a та P3b), хвиль пізнього позитивного потенціалу (LPP) та пізньої задньої негативності (LPN). Порівняльний аналіз середньо- і довголатентних компонентів ППП виявив більш суттєвий вплив контексту, створеного негативними емоційними стимулами. Виходячи з аналізу отриманих результатів, а також даних літератури, можна зробити висновок, що позитивний емоційний контекст спричинює виникнення більших труднощів для розрізнення відмінностей між цільовими та контекстуальними стимулами та для відновлення образу стимулу в пам'яті, тобто сприйняття нейтральних облич в такому контексті відбувається радше холістично, за сценарієм bottom-up. Водночас є можливість припускати, що нейтральні обличчя в негативному контексті обробляються за участі механізму top-down. Більше того, в цьому випадку посилюється зв'язок між характеристиками стимулу, увагою та пам'яттю, збільшується ефективність обробки вхідної інформації та створення ментальних образів.

Ключові слова: емоції, ЕЕГ, ППП, обличчя.

Вступ. Розпізнавання, сприйняття та когнітивна обробка людських облич є первинним і одним із вирішальних факторів в процесі формування стратегії соціальної поведінки вищих приматів та людини, оскільки обличчя є складним мультимимісним стимулом.

Дотепер не існує єдиної точки зору щодо того, чи є здатність до розрізнення облич представників свого виду вродженою особливістю, чи вона виникає в процесі онтогенезу через постійну експозицію до подразника, проте встановлено, що особливості когнітивної обробки облич залежать від попереднього набутого досвіду [1]. Отримані дані виступають на підтвердження гіпотези про те, що мозок має внутрішню модель навколишнього світу, яка функціонує за принципом Байєсовського фільтру для вхідної сенсорної інформації, викликаючи відповідь, засновану на актуальному досвіді [2]. Для того, щоб оптимально передбачити і взаємодіяти з вхідними сенсорними сигналами, мозок актуалізує категорії з попереднього досвіду, які мають спільні риси з новою інформацією.

Концепції когнітивних процесів, які лежать в основі впізнавання облич, загалом зазнали значного впливу семінальної теорії Брюса та Янга [3]. Згідно з цією моделлю розпізнавання обличчя відбувається після того, як проходить первинна стадія візуального розпізнавання, через поступовий доступ до візуально-структурних та візуально-семантичних кодів в довготривалій пам'яті. Структурні коди, які містять в собі дані про фізичний вигляд всіх відомих індивіду облич з інформацією про форму рис обличчя, а також їхню просторову конфігурацію, зберігається в одиницях розпізнавання облич (FRUs). Ці одиниці пам'яті вважають специфічними саме для сфери облич як субстрату для обробки. Вербально-семантичні коди співвідносять біографічну інформацію (контекст, в якому людина зазвичай бачить це обличчя) зберігається у вузлах ідентифікації (PINs), які, в свою чергу, пов'язані з вербальними кодами для відповідних імен. Послідовна інтерактивна активація компонентів концепції Брюса та Янга у робочих симулятивних моделях дозволила відтворити такі емпіричні явища, як семантичне праймування, повторне праймуван-

ня, кросс-модальне сприйняття та розрізнення облич під час впізнавання.

Первинне припущення в моделі Брюса та Янга говорить про те, що FRUs, PINs та іменні коди активуються строго послідовно. Просто повна модель включає в себе декілька паралельних шляхів, які виникають після первинної візуальної ідентифікації, кожний з яких відповідає обробці інших типів інформації про обличчя. Новіші психологічні та нейропсихологічні дослідження вносили модифікації або спростовували модель, але концепція Брюса та Янга тим не менш лягала в основу більшості досліджень з використанням методики ППП в останні десятиліття. Зауважимо, що всі концепції зазначають, що велика кількість різних типів кодів пам'яті (рисунковий, структуральний, емоційний, соціальний, семантичний, епізодичний, вербальний тощо) пов'язані з кожним знайомим обличчям.

Здатність розпізнавати обличчя – головна навичка, яка обумовлює нашу соціальну поведінку. На сьогодні багато уваги приділяється дослідженню емоційних виразів, проте питання дослідження впливу контексту на розпізнавання та оцінку виразу обличчя досліджене недостатньо. Ряд сучасних робіт свідчить про те, що кодування та впізнавання облич з емоційно забарвленим виразом модулюються негативними контекстуальними виразами [4]. Обличчя із щасливим та загрозливим виразом викликають збільшення амплітуди піку N170 та пізнього позитивного піку (LPP) порівняно з емоційно нейтральним виразом [5].

Відомо, що сприйняття обличчя запускає такі два основні процеси, як категоризація та впізнавання. В цьому дослідженні ми фокусувалися переважно на процесі розрізнення (індивідуації), пов'язаному з впізнаванням, та структурному кодуванні представленого обличчя. Також існують дані, що обробка негативних (страшних, сумних, огидних) облич спричинює появу компонентів потенціалів, пов'язаних з подією (ППП), відмінних останніх, які виникають при демонстрації позитивних облич.

Крім того, існують припущення, що обробка позитивних облич відбувається за сценарієм bottom-up, що пов'язують зі швидкою візуальною ідентифікацією вхід-

ної сенсорної інформації, яка не потребує спрямованої та детальної обробки. На противагу цьому, сприйняття негативних облич запускають когнітивні процеси за сценарієм *top-down*, що відповідає співвіднесенню нового стимулу з існуючою внутрішньою гіпотезою та очікуваннями, активації спрямованої уваги та формуванню мотивацій (досягнення або уникнення) [6].

Метою даного дослідження було вивчення впливу позитивного та негативного емоційного контексту, створеного експозицією відповідних зображень облич, на сприйняття цільових зорових стимулів – облич з емоційно нейтральним виразом. Для цього ми фокусувалися на змінах таких компонентів кривої ППП, як N200, P300 (та його субкомпонентів P3a та P3b), хвиль пізнього позитивного потенціалу (LPP) та пізньої задньої негативності (LPN).

Методи та матеріали. У дослідженні на добровільних засадах взяли участь 30 здорових обстежуваних віком від 18 до 24 років, з яких 18 жіночої статі та 12 чоловічої.

Процедура демонстрації зображень і запис викликаної активності кори головного мозку проводилися за допомогою програмно-апаратного комплексу "Нейроком" (ХАІ Медика, м. Харків, Україна) за спеціально створеним шаблоном. Накладання електродів на скальп проводилося відповідно до міжнародної системи "10–20 %".

В дизайн експерименту входили дві серії зображень тривалістю 10 хв, кожній передував запис електроенцефалограми в стані спокою із закритими очима (3 хв) і відкритими очима (3 хв). Під час демонстрації серій зображень було записано зорові когнітивні викликані потенціали (P300). Як стимули було обрано зображення з Міжнародної системи афективних зображень (International Affective Pictures System) [7].

В програмі стимуляції як часті стимули було обрано фотографії позитивно (середні значення емоційної валентності: Mean=6.94 (SD=1.42) до Mean=8.03 (SD=1.13)) і негативно (середні значення емоційної валентності Mean=4.22 (SD=1.64) до Mean=5.84 (SD=1.62)) емоційно забарвлених облич. Рідкісними стимулами було визначено зображення облич, емоційна валентність яких варіювалась в межах Mean=4.22 (SD=1.64) до Mean= 5.84 (SD=1.62).

Епоха аналізу до стимулу становила 150 мс., після стимулу – 800 мс. Рідкісні стимули (нейтральні за валентністю) демонструвалися за довільним патерном, в якому ймовірність появи рідкісного стимулу становила 30 %, тривалість стимулу – 500 мс., період слідування – 3 с.± 30 %. Задана кількість рідкісних стимулів для однієї серії – 100.

Обробка отриманих даних була проведена за допомогою програмного пакета Eeglab. Ділянками із статистично достовірними відмінностями амплітудних характеристик вважали такі, для яких $p < 0.05$ (з імплементацією критерію FDR).

Результати та їх обговорення. Кіркові ділянки, яким була приділена особлива увага в процесі аналізу отриманих даних (рис. 1–3), було визначено згідно з даними про їхню роль у процесах обробки візуального стимульного матеріалу. Відомо, що тім'яні ділянки головного мозку відповідають вторинними і третинним кортикальним асоціативним полям зорового аналізатора. Лобні ділянки відповідають за вилучення змісту картини, його оцінку, формування розумових образів та

їхню актуалізацію. Скроневі зони вважаються ділянками кіркового представлення лімбічної системи, тому активність в них пов'язують з процесами формування пам'яті, сприйняттям та відтворенням емоцій.

N200 (180–250 мс) – специфічний компонент ВП, який виникає в процесі сприйняття облич [8]. Він виникає в процесі довільної когнітивної обробки стимулів, коли суб'єкт селективно звертає увагу на девіації рідкісного стимула (у формі або значенні) від частого стимулу. Субкомпонент N2b, пов'язаний з труднощами розрізнення достовірних відмінностей для цільового стимулу, було зареєстровано у центральних лобних ділянках кори (F3, F4) (рис. 1, А, Б). Його амплітуда була загалом більша для нейтральних стимулів у позитивному контексті ($\Delta 2.8 \mu V$ у правій півкулі і $\Delta 2.1 \mu V$ у лівій півкулі).

Вважають [9], що, на відміну від негативної неузгодженості, N2b-субкомпонент виникає при девіаціях рідкісного стимулу у орфографії, фонології або семантиці наряду з візуальними або слуховими відмінностями. В експериментах з одбол-парадигмою, коли суб'єкт має активно відповідати на девіантні стимули, виникнення компоненту N2b характеризувалося меншими амплітудами під час пред'явлення стандартних стимулів при пропущених девіантних. Це може свідчити про те, що характеристики амплітуди N2b залежить не від розпізнавання девіантного цільового стимулу як такого, а від достовірності диференціації цілі. У завданнях з розрізненням візуальних стимулів, амплітуда N2b прямо корелювала з труднощами розрізнення.

Статистично достовірних відмінностей для компоненту P300 (280–350 мс) в наших обстеженнях відмічено не було, хоча треба зазначити, що у фронтальних та темпоральних відведеннях (рис. 1 А, Б; рис. 2 А, Б) спостерігалось виникнення специфічного субкомпоненту P3b-, а саме його пов'язують з послідовною активацією ресурсів пам'яті, уваги та оцінки характеристик стимулу [10]. Вважається, що його генератори локалізовані у скроневій ділянці та гіпокампі [11].

Найбільш охарактеризованим компонентом хвилі ППП є саме P3b або "класичний P300", який, на відміну від P3a, характеризується меншими латентностями та фронтально локалізованою топографією. Одна з можливих інтерпретацій P300 стверджує, що цей пік відображає розпізнавання в широкому розумінні та процеси оновлення пам'яті, у той час як субкомпонент P3b вважають відображенням реакції на збіг/розбіжність із існуючим слідом в робочій пам'яті, який зберігається свідомо, а P3a- субкомпонентом пасивного порівняння [12].

У сучасній літературі накопичені докази, що характеризують P300 як частину пізнавальної процедури, яка підтримує формулювання внутрішньої моделі навколишнього середовища, в якій слід оцінювати стимул: наприклад, гіпотеза оновлення контексту. Ця концепція підкріплюється прямим зв'язком між латентністю P300 та часом реакції суб'єкта в експериментах. Oliver-Rodriguez та його колеги, відштовхуючись від експериментів, в яких як стимульний матеріал використовувались людські обличчя, припускають, що P300 маркує початок процесів оновлення контексту [13]. Крім того, теорія закриття контексту, яка виникла як альтернатива теорії модернізації контексту, відображає думку, що P300 відображає активацію сліду в пам'яті після виявлення цільового подразника [14].

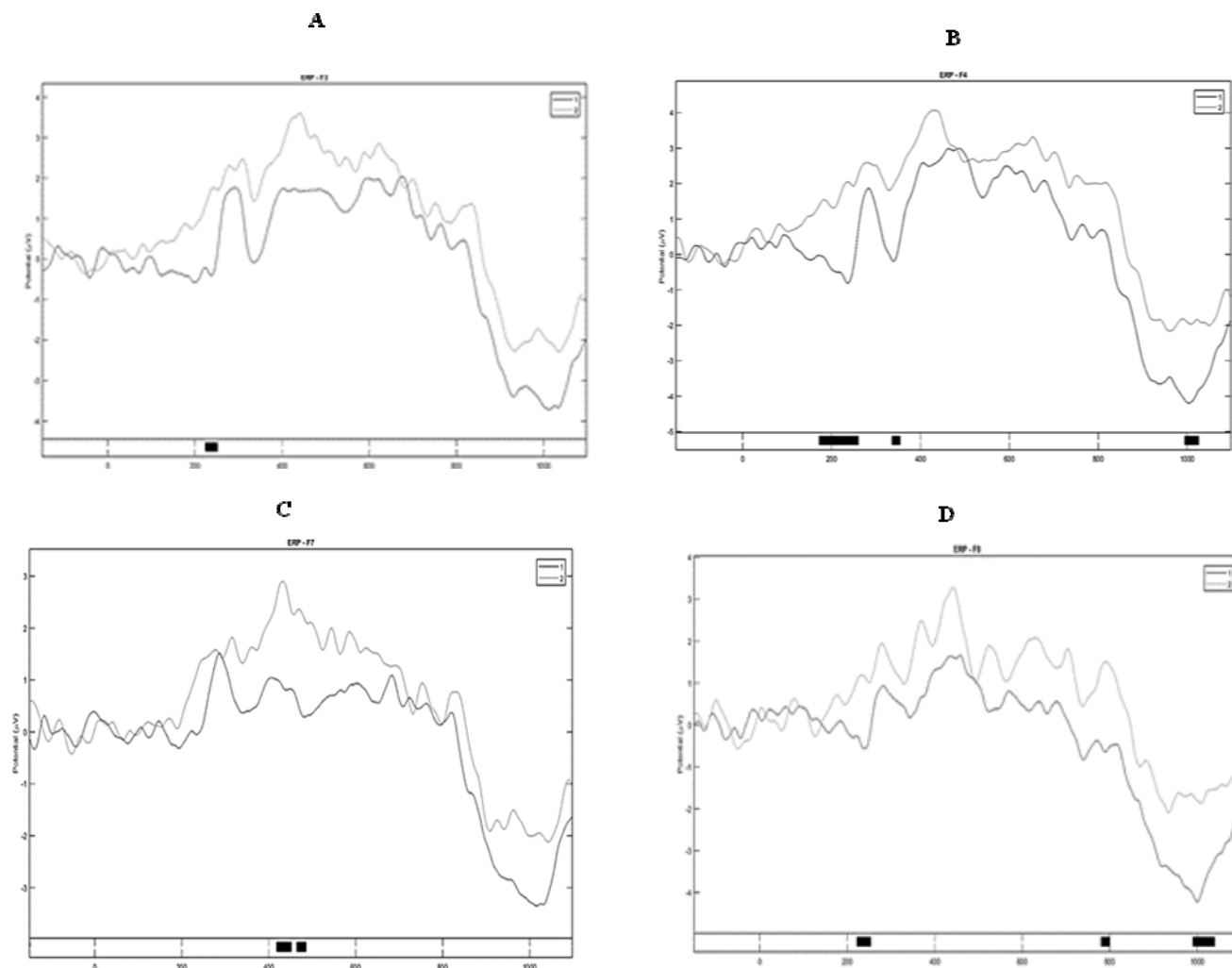


Рис. 1. Усереднені криві потенціалів, пов'язаних з подією, зареєстрованих у передніх (А, В) і задніх (С,Д) фронтальних відведеннях. Латентності, для яких зареєстровано достовірно відмінні амплітуди компонентів ППП, відмічені на осі X ($p < 0.05$).
1. Відповідь на нейтральні обличчя в позитивному контексті;
2. Відповідь на нейтральні обличчя в негативному контексті

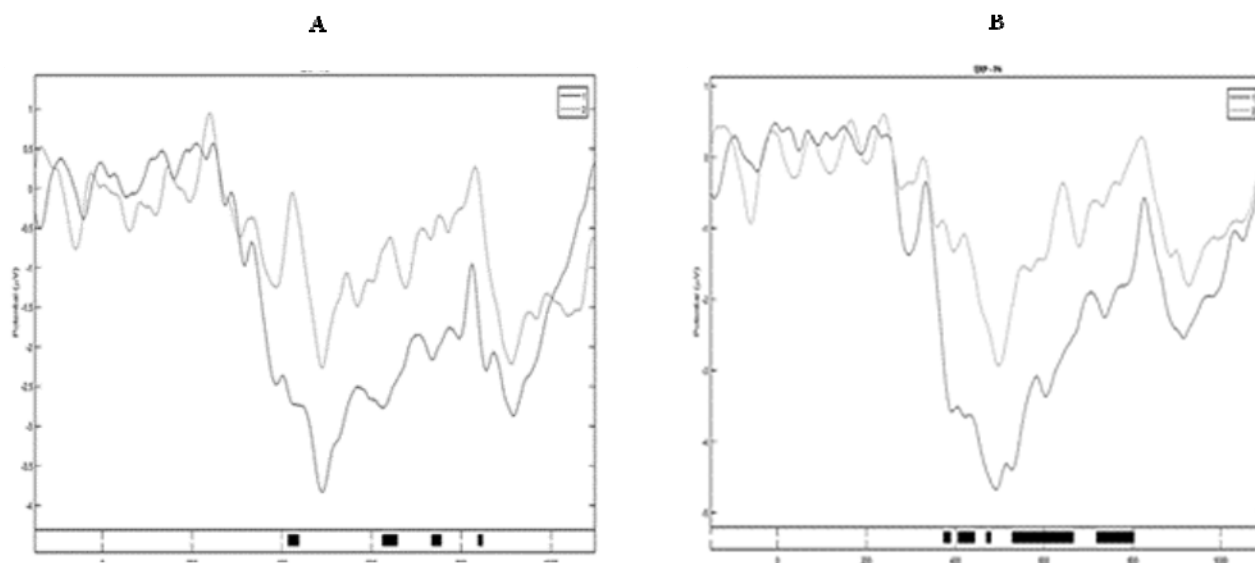


Рис. 2. Усереднені криві потенціалів, пов'язаних з подією, зареєстрованих у передньому лівому (А) і передньому правому (В) парієтальних відведеннях. Латентності, для яких зареєстровано достовірно відмінні амплітуди компонентів ППП, відмічені на осі X ($p < 0.05$).
1. Відповідь на нейтральні обличчя в позитивному контексті;
2. Відповідь на нейтральні обличчя в негативному контексті

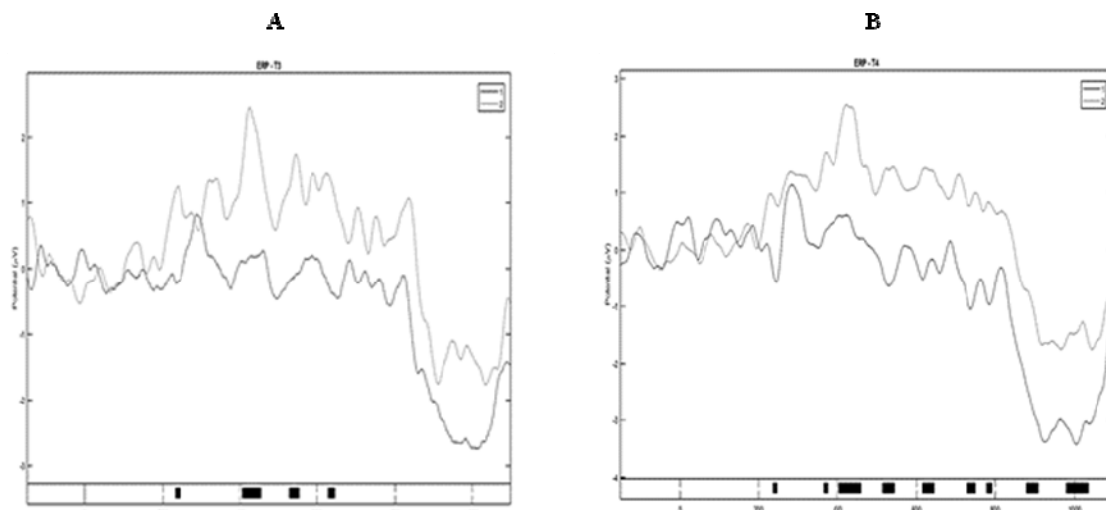


Рис. 3. Усереднені криві потенціалів, пов'язаних з подією, зареєстрованих у передньому лівому (А) і передньому правому (В) темпоральних відведеннях.
Латентності, для яких зареєстровано достовірно відмінні амплітуди компонентів ППП, відмічені на осі X ($p < 0.05$).
1. Відповідь на нейтральні обличчя в позитивному контексті;
2. Відповідь на нейтральні обличчя в негативному контексті

Зауважимо, що латентності компонентів ППП розподіляють на дві різні категорії: пасивні та активні, в залежності від парадигми експерименту. Пасивні латентності, на відміну від активних, спостерігаються, коли демонстрація рідкісного стимулу в одбол-парадигмі не потребує відповіді суб'єкта. Попередніми роботами доведено, що активні та пасивні латентності для P300 є порівнянними, що дозволяє припустити, що використання експериментів з візуальним спостереженням в діагностичних цілях може бути корисним навіть для тих, хто не має здатності до рухової реакції на стимул [15].

Пізній позитивний потенціал (400–600 мс) – хвиля кривої ППП, яка сильно модулюється емоційними стимулами [16]. Збільшення амплітуди ($\Delta 2 \mu V$ у передніх скроневих ділянках (рис. 3, А, В) і $\Delta 0.9 \mu V$ задніх лівих лобних ділянках (рис. 1, В)) для нейтральних стимулів у негативному емоційному контексті може свідчити про активацію процесів обробки вхідної інформації за сценарієм top-down. З цим припущенням не розходиться виникнення пізньої негативної хвилі (SWN) з приблизно такою ж латентністю (400–600 мс) у тім'яних зонах (рис. 2, А, Б). Пізню позитивну хвилю пов'язують з підсиленням ефективності процесів обробки, побудови ментальних образів, а також викликанням в пам'яті існуючих шаблонів для подібних стимулів і парадигм [17]. Механізм top-down обробки сенсорної інформації характеризується спрямованою увагою, викликану співвіднесенням нового стимулу із попередньо сформованою гіпотезою і очікуваннями. На противагу сценарію bottom-up, якому притаманна швидка візуальна ідентифікація, top-down сценарій характеризується активацією когнітивних процесів, пов'язаних із визначенням цілей та мотивацій.

Роботою Moradi [18] продемонстровано, що амплітуда та латентність LPP-компоненту збільшується під час top-down обробки вхідної інформації. Дані результати узгоджуються з попередніми дослідженнями, що свідчать про місце даних компонентів під час більш ретельної обробки складніших та неоднозначніших стимулів [19, 20]. Проте варто зазначити, що в своїй роботі Moradi акцентував увагу також на компоненті P100 – специфічним компонентом для процесів сприйняття облич, який

генерується в ділянках екстрастріарної зорової кори і є специфічним для сприйняття емоційних виразів облич в нейтральному контексті [21, 22].

Проте, хоча емоційні подразники зазвичай обробляються більш ефективно, вони часто погіршують сприйняття одночасно представлених нейтральних стимулів, коли вони перебувають у просторовій конкуренції [23]. Крім того, Bosanegra і Zeelenberg [24] переглядають факти, що за певних обставин подання емоційних подразників може послабити сприйняття наступного нейтрального стимулу, якщо два подразники представлені без значного часового розрізнення. Таким чином, захоплення уваги емоційними подразниками може супроводжуватися глобальним гальмуванням інших репрезентацій в корі, а LPP може відображати це глобальне гальмування. Ця глобальна гіпотеза гальмування LPP узгоджується з роботою Birmbauer та його колег, які стверджують, на основі біофізичних аргументів, що повільні кіркові позитивні хвилі, такі як ЛПП, мають відображати знижену кортикальну збудливість [25].

Амплітуда пізньої задньої негативності (800–1000 мс) загалом була більшою для цільових нейтральних стимулів у позитивному контексті (достовірні відмінності були зареєстровані у правому скроневому відведенні ($\Delta 2 \mu V$, рис. 3, А). Латентність її виникнення збігалася з великою негативною хвилею в лобних відведеннях (достовірні відмінності були зареєстровані для правих лобних ($\Delta 2 \mu V$ в передніх (рис. 2, Б) і $\Delta 3 \mu V$ в задніх (рис. 2, Г)). Ці дані дають змогу припустити, що позитивний контекст зумовлює труднощі у поновленні в пам'яті цільових нейтральних стимулів, семантичними процесами. В роботі Hengron [26] показано, що пізня задня негативність (LPN) була пов'язана з моніторингом дій, завданням "невизначеності" та контекстним пошуком, а характеристики її амплітуди залежали від того, наскільки вільно суб'єкт може відтворити в пам'яті образ стимулу. В завданнях з пред'явленням стимульного матеріалу у вигляді слів, спостерігали меншу амплітуду LPN (600–1200 мс), коли пригадування стимулу було простішим для суб'єкта, і градуальне наростання, коли відтворення образу стимулу в пам'яті утруднювалося. Варто зазначити також, що попередньо набутих даних

стосовно компонентів ППП з такою великою латентністю в експериментах з використанням обличч як стимульного матеріалу, знайдено не було, що дозволяє теоретизувати про значення цих компонентів в процесах когнітивної обробки людських обличч.

Загалом варто зазначити, що отримані дані можна трактувати з точки зору двофакторної теорії емоцій [27]. Двофакторна теорія емоцій постулює, що існують дві незалежні характеристики емоціогенного стимулу: знак (умовно плюс або мінус) і збудження (рівень активації або гальмування, які виникають під час генерації емоції). Таким чином, існують дві системи аналізу вхідної інформації: одна відповідає за емоційну активацію незалежно від валентності та локалізується в задніх парієтальних ділянках великих півкуль (переважно правої півкулі), а робота іншої модулюється емоційним знаком і пов'язується з лобними зонами. Іншими словами в задніх тім'яних зонах визначається емоційний ерауэл, в той час як гедонічні складові пов'язані з активацією радше передніх, ніж задніх ділянок.

Таким чином, виходячи з аналізу отриманих результатів, а також даних літератури, можна зробити висновок, що позитивний емоційний контекст спричинює виникнення більших труднощів для розрізнення відмінностей між цільовими та контекстуальними стимулами та для відновлення образу стимулу в пам'яті. Тобто сприйняття нейтральних обличч в такому контексті відбувається радше холістично, за сценарієм bottom-up. Водночас є можливість припустити, що нейтральні обличчя в негативному контексті обробляються за участі механізму top-down. Більше того, в цьому випадку посилюється зв'язок між характеристиками стимулу, увагою та пам'яттю, збільшується ефективність обробки вхідної інформації та створення ментальних образів.

Висновки. Емоційно забарвлені обличчя є комплексним субстратом, який потребує активації чисельних процесів під час обробки вхідної сенсорної інформації головним мозком. Валентність стимулів, які створюють емоційний контекст для цільових нейтральних стимулів, здійснює активний вплив на процеси сприйняття, що виражається у модуляції рівня уваги та процесів формування пам'ятних слідів. Порівняльний аналіз середньо- і довголатентних компонентів ППП виявив більш суттєвий вплив контексту, створеного негативними емоційними стимулами, а саме: негативний контекст сприяє активує процес обробки вхідної сенсорної інформації за сценарієм top-down, що включає в себе посилення активації механізмів запам'ятовування, селективної уваги, у той час як ті самі нейтральні стимули в позитивному контексті сприймаються більш холістично.

Список використаних джерел

1. Rossion B. ERP evidence for the speed of face categorization in the human brain: Disentangling the contribution of low-level visual cues from face perception / B. Rossion, S. Caharel // *Vision Research*, 2011. – № 51. – P. 1297–1311.
2. Hoemann K. Mixed emotions in the predictive brain / K. Hoemann, M. Gendron, L. Barrett // *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 2017. – № 15. – P. 51–57.
3. Bruce V. Understanding face recognition / V. Bruce, A. Young // *British Journal of Psychology*, 1986. – № 77. – P. 305–327.
4. Lin H. Contextual effects of surprised expressions on the encoding and recognition of emotional target faces: An event-related potential (ERP) study / H. Lin, C. Schulz, T. Straube // *Biological Psychology*, 2017. – № 129. – P. 273–281.
5. Bottom-up and top-down processes in emotion generation: Common and distinct neural mechanisms / K. Ochsner, R. Ray, B. Hughes et al. // *Psychological Science*, 2009. – № 20. – P. 1322–1331.
6. Brain Signals of Face Processing as Revealed by Event-Related Potentials / E. Olivares, J. Iglesias, C. Saavedra et al. // *Behavioural Neurology*, 2015. – № 20. – P. 78–89.

7. Lang P. International Affective Picture System (IAPS): Technical Manual and Affective Ratings / P. Lang, M. Bradley, B. Cuthbert. – Gainesville, FL: The Center for Research in Psychophysiology, University of Florida, 1999.
8. Color selection and location selection in ERPs: Differences, similarities and "neural specificity." / J. Lange, A. Wijers, L. Mulder, G. Mulder // *Biological Psychology*, 1998. – № 48. – P. 153–182.
9. Steiner G. Sequential Processing and the Matching-Stimulus Interval Effect in ERP Components: An Exploration of the Mechanism Using Multiple Regression / G. Steiner, R. Barry, C. Gonsalvez // *Frontiers in Human Neuroscience*, 2016.
10. Katayama J. Stimulus context determines P3a and P3b / J. Katayama, J. Polich // *Psychophysiology*, 1998.
11. The effect of jogging on P300 event related potentials. Electromyography and clinical neurophysiology / J. Nakamura, K. Nishimoto, M. Akamatu et al. // *Electromyography and clinical neurophysiology*, 1999.
12. Näätänen R. Mismatch negativity / R. Näätänen, 1983.
13. Oliver-Rodriguez J. Gender difference in late positive components evoked by human faces / J. Oliver-Rodriguez, Z. Guan, V. Johnston // *Psychophysiology*, 1999. – № 36. – P. 176–185.
14. Verleger R. Event-related potentials and cognition: A critique of the context updating hypothesis and an alternative interpretation of P3 / R. Verleger // *Behavioral and Brain Sciences*, 1988. – № 11. – P. 343–427.
15. Herbert A. A passive event-related potential? / A. Herbert, G. Gordon, D. Mulloch // *Psychophysiology*, 1998. – № 19. – P. 11–21.
16. Emotional perception: Correlation of functional MRI and event-related potentials / D. Sabatinelli, P. Lang, A. Keil, M. Bradley // *Cerebral Cortex*, 2007. – № 17. – P. 1085–1091.
17. Toward a functional categorization of slow waves / D. Ruchkin, R. Johnson, D. Mahaffey, S. Sutton // *Psychophysiology*, 1988. – № 25. – P. 339–353.
18. Event-Related Potentials of Bottom-Up and Top-Down Processing of Emotional Faces / A. Moradi, S. Mehrinejad, M. Ghadiri, F. Rezaei // *Basic and Clinical Neuroscience Journal*, 2017. – № 21. – P. 656–661.
19. Van Strien J. The late positive potential and explicit versus implicit processing of facial valence / J. Van Strien, L. De Sonnevill, I. Franken // *NeuroReport*, 2010. – № 21. – P. 656–661.
20. DaSilva E. On dissociating the neural time course of the processing of positive emotions / E. DaSilva, K. Crager, A. Puce // *Neuropsychologia*, 2016. – № 83. – P. 123–137.
21. Batty M. Early processing of the six basic facial emotional expressions / M. Batty, M. Taylor // *Cognitive Brain Research*, 2003. – № 17. – P. 613–620.
22. Rapid extraction of emotional expression: Evidence from evoked potential fields during brief presentation of face stimuli / E. Eger, A. Jedynak, T. Iwaki, W. Skrandies // *Neuropsychologia*, 2003. – № 41. – P. 808–817.
23. Electrophysiological correlates of rapid spatial orienting towards fearful faces / G. Pourtois, D. Grandjean, D. Sander, P. Vuilleumier // *Cerebral Cortex*, 2004. – № 14. – P. 619–633.
24. Bocanegra B. Dissociating Emotion-Induced Blindness and Hypervision / B. Bocanegra, R. Zeelenberg // *Emotion*, 2009. – № 9. – P. 865–873.
25. Slow potentials of the cerebral cortex and behavior / N. Birnbauer, T. Elbert, G. Canavan, B. Rockstroh // *Physiological reviews*, 1990.
26. Herron J. Decomposition of the ERP late posterior negativity: Effects of retrieval and response fluency / J. Herron // *Psychophysiology*, 2007. – № 44. – P. 233–244.
27. Emotional arousal and activation of the visual cortex: An fMRI analysis / P. Lang, M. Bradley, J. Fitzsimmons et al. // *Psychophysiology*, 1998. – № 35. – P. 199–210.

References (Scopus)

1. Rossion, B., Caharel, S. (2011). ERP evidence for the speed of face categorization in the human brain: Disentangling the contribution of low-level visual cues from face perception. *Vision Research*, 51(12), 1297–1311. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2011.04.003>
2. Hoemann, K., Gendron, M., Barrett, L. (2017). Mixed emotions in the predictive brain. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 15, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2017.05.013>
3. Bruce, V., Young, A. (1986). Understanding face recognition. *British Journal of Psychology*, 77, 305–327.
4. Lin, H., Schulz, C., Straube, T. (2017). Contextual effects of surprised expressions on the encoding and recognition of emotional target faces: An event-related potential (ERP) study. *Biological Psychology*, 129, 273–281. <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2017.09.011>
5. Ochsner, K., Ray, R., Hughes, B., McRae, K., Cooper, J., Weber, J., Gross, J. (2009). Bottom-up and top-down processes in emotion generation: Common and distinct neural mechanisms. *Psychological Science*, 20(11), 1322–1331. <https://doi.org/10.1111/j.1467-9280.2009.02459.x>
6. Olivares, E., Iglesias, J., Saavedra, C. et al. (2015). Brain Signals of Face Processing as Revealed by Event-Related Potentials. *Behavioural Neurology*, <https://doi.org/10.1155/2015/514361>
7. Lang, P., Bradley, M., Cuthbert, B. (1999). International Affective Picture System (IAPS): Technical Manual and Affective Ratings. Gainesville, FL: The Center for Research in Psychophysiology, University of Florida.

8. Lange, J., Wijers A., Mulder L., Mulder G. (1998). Color selection and location selection in ERPs: Differences, similarities and "neural specificity." *Biological Psychology*, 48(2), 153–182. [https://doi.org/10.1016/S0301-0511\(98\)00011-8](https://doi.org/10.1016/S0301-0511(98)00011-8)
9. Steiner G., Barry R., Gonsalvez C. (2016). Sequential Processing and the Matching-Stimulus Interval Effect in ERP Components: An Exploration of the Mechanism Using Multiple Regression. *Frontiers in Human Neuroscience* (Vol. 10). <https://doi.org/10.3389/fnhum.2016.00339>
10. Katayama J., Polich J. (1998). Stimulus context determines P3a and P3b. *Psychophysiology* (Vol. 35). <https://doi.org/10.1017/S0048577298961479>
11. Nakamura Y., Nishimoto K., Akamatu M., Takahashi M., Maruyama A. (1999). The effect of jogging on P300 event related potentials. *Electromyography and clinical neurophysiology* (Vol. 39).
12. Näätänen R. Mismatch negativity. 1983. <http://www.psych.helsinki.fi/cbru/mnm.html>
13. Oliver-Rodriguez J., Guan Z., Johnston, V. (1999). Gender difference in late positive components evoked by human faces. *Psychophysiology*, 36, 176–185.
14. Verleger R. Event-related potentials and cognition: A critique of the context updating hypothesis and an alternative interpretation of P3. *Behavioral and Brain Sciences*. 1988;11:343–427.
15. Herbert, A., Gordon G., Mulloch, D. (1998). A passive event-related potential? *Psychophysiology* 19(5), 11–21.
16. Sabatinelli D., Lang P., Keil A., Bradley M. (2007). Emotional perception: Correlation of functional MRI and event-related potentials. *Cerebral Cortex*, 17(5), 1085–1091. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhl017>
17. Ruchkin D., Johnson R., Mahaffey D., Sutton S. (1988). Toward a functional categorization of slow waves. *Psychophysiology*, 25(3), 339–353.
18. Moradi A., Mehrinejad S., Ghadiri M., Rezaei F. (2017). Event-Related Potentials of Bottom-Up and Top-Down Processing of Emotional Faces. *Basic and Clinical Neuroscience Journal*, 8(1), 27–36. <https://doi.org/10.15412/J.BCN.03080104>
19. Van Strien J., De Sonnevile L., Franken I. (2010). The late positive potential and explicit versus implicit processing of facial valence. *NeuroReport*, 21(9), 656–661. <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e32833ab89e>
20. Silva E., Crager K., Puce A. (2016). On dissociating the neural time course of the processing of positive emotions. *Neuropsychologia*, 83, 123–137. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2015.12.001>
21. Batty M., Taylor M. (2003). Early processing of the six basic facial emotional expressions. *Cognitive Brain Research*, 17(3), 613–620. [https://doi.org/10.1016/S0926-6410\(03\)00174-5](https://doi.org/10.1016/S0926-6410(03)00174-5)
22. Eger E., Jedynak A., Iwaki T., Skrandies W. (2003). Rapid extraction of emotional expression: Evidence from evoked potential fields during brief presentation of face stimuli. *Neuropsychologia*, 41(7), 808–817. [https://doi.org/10.1016/S0028-3932\(02\)00287-7](https://doi.org/10.1016/S0028-3932(02)00287-7)
23. Pourtois G., Grandjean D., Sander D., Vuilleumier P. (2004). Electrophysiological correlates of rapid spatial orienting towards fearful faces. *Cerebral Cortex*, 14(6), 619–633. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhh023>
24. Bocanegra B., Zeelenberg R. (2009). Dissociating Emotion-Induced Blindness and Hypervision. *Emotion*, 9(6), 865–873. <https://doi.org/10.1037/a0017749>
25. Birbaumer N., Elbert T., Canavan A., Rockstroh B. (1990). Slow potentials of the cerebral cortex and behavior. *Physiological reviews* (Vol. 70). <https://doi.org/10.1152/physrev.1990.70.1.1>
26. Herron J. (2007). Decomposition of the ERP late posterior negativity: Effects of retrieval and response fluency. *Psychophysiology*, 44(2), 233–244. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8986.2006.00489.x>
27. Lang P., Bradley M., Fitzsimmons J., Cuthbert B., Scott J., Moulder B., Nangia V. (1998). Emotional arousal and activation of the visual cortex: An fMRI analysis. *Psychophysiology*, 35, 199–210.

Надійшла до редколегії 10.04.2018

Отримано виправлений варіант 11.05.2018

Підписано до друку 11.05.2018

Received in the editorial 10.04.2018

Received a revised version on 11.05.2018

Signed in the press on 11.05.2018

М. Черных студ., И. Зима, д-р биол. наук,
УНЦ "Институт биологии и медицины",
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ВЛИЯНИЕ ТЕКУЩЕГО КОНТЕКСТА, СОЗДАННОГО ВОСПРИЯТИЕМ ЭМОЦИОНАЛЬНО ОКРАШЕННЫХ ВЫРАЖЕНИЙ ЛИЦ, НА ЦЕЛЕНАПРАВЛЕННОЕ ПРЕДЪЯВЛЕНИЕ НЕЙТРАЛЬНЫХ ЗРИТЕЛЬНЫХ ОБРАЗОВ

Изучение влияния текущего контекста, созданного восприятием эмоционально окрашенных выражений лиц, на целенаправленное предъявление нейтральных зрительных образов. В эксперименте приняли участие 30 студентов-добровольцев, которым было продемонстрировано 2 серии изображений и зарегистрировано потенциалы, связанные с событием. Эпоха анализа до стимула составляла 150 мс. После стимула – 800 мс. Редкие стимулы (нейтральные по валентности) демонстрировались по произвольному паттерну, в котором вероятность появления редкого стимула составляла 30 %, продолжительность стимула – 500 мс. Обработка полученных данных была проведена с помощью программного пакета Eeglab. Участками со статистически достоверными различиями амплитудных характеристик считались такие, для которых $p < 0.05$ (с выполнением критерия FDR). Исследовались изменения амплитудных характеристик таких компонентов кривой ПСС, как N200, компонента P300 (и его субкомпонента P3a и P3b), волн позднего позитивного потенциала (LPP) и поздней задней негативности (LPN). Сравнительный анализ средне- и длиннотенных компонентов ППП обнаружил более существенное влияние контекста, созданного негативными эмоциональными стимулами. Исходя из анализа полученных результатов, а также данных литературы, можно сделать вывод, что положительный эмоциональный контекст вызывает возникновение больших трудностей для обнаружения различий между целевыми и контекстуальными стимулами и для восстановления образа стимула в памяти. Следовательно, восприятие нейтральных лиц в таком контексте происходит скорее холистически, по сценарию bottom-up. В то же время есть возможность предполагать, что нейтральные лица в негативном контексте обрабатываются с участием механизма top-down. Более того, в этом случае усиливается связь между характеристиками стимула, вниманием и памятью, увеличивается эффективность обработки входящей информации и создания ментальных образов.

Ключевые слова: эмоции, ЭЭГ, ППП, лицо.

М. Chernykh stud., I. Zyma D. Sci.
ESC "Institute of Biology and Medicine",
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

INFLUENCE OF THE CURRENT CONTEXT CREATED BY THE PERCEPTION OF EMOTIONAL FACIAL EXPRESSIONS ON THE TARGET PRESENTATION OF NEUTRAL VISUAL IMAGES

Study the influence of the current context, created by the perception of emotional facial expressions, on targeted presentation of neutral visual images. 30 volunteer students participated in the experiment. Two series of images were demonstrated and event-related potentials were registered. The epoch of analysis before the stimulus was 150 ms, after the stimulus – 800 ms. Rare stimuli (neutral in valence) were demonstrated in an arbitrary pattern, in which the probability of a rare stimulus was set at 30 %, the duration of the stimulus was 500 ms. The processing of the data was carried out using the Eeglab software package. Sites with statistically significant differences in amplitude characteristics were those for which $p < 0.05$ (with the FDR criterion). The changes in the amplitude characteristics of such components of the ERP curve as N200, component P300 (and its subcomponent P3a and P3b), waves of late positive potential (LPP) and late back negativity (LPN) were studied. A comparative analysis of the medium- and long-latent components of the ERP curve revealed a more significant effect of the context created by negative emotional stimuli. Based on an analysis of the results obtained, as well as literature data, it can be concluded that a positive emotional context causes greater difficulties in detecting differences between target and contextual stimuli and in restoring the stimulus image in memory. That is, the perception of neutral faces in this context is more holistic, according to the bottom-up scenario. At the same time, it is possible to assume that neutral facial expressions in the negative context are processed according to the top-down mechanism. Moreover, in this case, the relationship between the characteristics of the stimulus, attention and memory is strengthened, the efficiency of incoming information processing and mental images creation is increased.

Key words: emotions, EEG, ERP, face.

Наукове видання



ВІСНИК

КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

**ПРОБЛЕМИ РЕГУЛЯЦІЇ
ФІЗІОЛОГІЧНИХ ФУНКЦІЙ**

Випуск 1(24)

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.



Формат 60x84^{1/8}. Ум. друк. арк. 6,1. Наклад 300. Зам. № **218-8590**.
Гарнітура Arial. Папір офсетний. Друк офсетний. Вид. № Б4.
Підписано до друку **24.06.18**

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