

Подано експериментальні дані про особливості будови, розвитку і функціонування рослинних і тваринних організмів, одержаних науковцями НДІ фізіології та біологічного факультету. 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.

The experimental dates development and function of the plant and animal organisms of research institute and biological faulty. 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. Торгалю, канд. біол. наук (відп. секр.); Т.В. Берегова, д-р біол. наук, проф.; С.В. Демидов, д-р біол. наук, проф.; М.Е. Держинський, д-р біол. наук, проф.; І.Ю. Костіков, д-р біол. наук, доц.; В.С. Мартинюк, д-р біол. наук, проф.; М.С. Мірошніченко, д-р біол. наук, проф.; М.М. Мусієнко, д-р біол. наук, проф., чл.-кор. УААН; М.Ю. Макаручук, д-р біол. наук, проф.; В.К. Позур, д-р біол. наук, проф.; В.П. Поліщук, д-р біол. наук, проф.; В.К. Рибальченко, д-р біол. наук, проф.; В.В. Серебряков, д-р біол. наук, проф.
Адреса редколегії	03187, Київ-33, просп. акад. Глушкова, 2, корп. 12, біологічний факультет; ☎ (38044) 522 17 95
Затверджено	Вченою радою біологічного факультету 16.02.10 (протокол № 7)
Атестовано	Вищою атестаційною комісією України. Постанова Президії ВАК України № 1-05/7 від 09.06.99
Зареєстровано	Міністерством юстиції України. Свідоцтво про державну реєстрацію друкованого засобу масової інформації Серія KB № 16053-4525 ПР від 09.11. 2009
Засновник та видавець	Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет" Свідоцтво внесено до Державного реєстру ДК № 1103 від 31.10.02
Адреса видавця	01601, Київ-601, 6-р Т.Шевченка, 14, кімн. 43 ☎ (38044) 239 31 72, 239 32 22; факс 239 31 28

Дворщенко К., Вакал С., Береговий С. Перекисне окиснення у органах травного тракту за умов стресової виразки шлунка	4
Торгало Є., Гайда Л., Степанов Ю. Вплив кверцетину та ліпофлаону на активність глутатіонпероксидази за умов експериментального геморагічного інсульту	5
Лукашов Д. Параметри виведення важких металів з організму молюсків <i>Lumnaea stagnalis</i> (L.) як показники забруднення водних екосистем	6
Фалалєєва Т., Берегова Т. Аналіз участі центральних та периферичних іонотропних глутаматних рецепторів АМПА- та кайнатного- підтипів у реалізації базальної шлункової секреції кислоти у щурів	10
Крижановський С., Тукаєв С., Зима І. ЕЕГ-характеристики мнестичної діяльності у людей з різною частотою серцевих скорочень	12
Філімонова Н., Макачук М., Сидько О. Електрична активність кори головного мозку людини при тестуванні оперативної пам'яті	15
Галенова Т., Конопельнюк В., Цудзевич Б. Активність ферментів антиоксидантного захисту у різних тканинах щурів за умов експериментального цукрового діабету 2 типу	18
Прибитько І., Берегова Т., Харченко К. Вплив перерізки пілоричної гілки переднього стовбура блукаючих нервів на евакуацію з шлунка їжі вуглеводного складу та визначення швидкості пропульсії хімусу по дванадцятипалій кишці у собак	20
Цирюк О., Кухарський В., Непорада К. Зміни глікопротеїдних та протеогліканних компонентів шлункового слизу у щурів за умов тривалої гіпоацидності	23
Толстонова Г. Експресія транскрипційного фактору EGR-1 в товстій кишці щурів при експериментальному виразковому коліті	25
Чернінський А., Піскорська Н., Зима І. Асиметрія активації головного мозку людини при гедонічному сприйнятті одорантів	28
Пахольченко В., Тукаленко Е., Данилов С., Макачук М. Рівень тривожності у тварин з різним досвідом соціальних взаємодій	30
Коваленко О., Говоруха Т., Бондаренко О., Макачук М. Здатність до навчання та перекисне окислення ліпідів у щурів з різною схильністю до алкоголізму	32
Грудіна Н., Бацманова Л., Стороженко В. Преадаптація як елемент еволюції та фактор формування неспецифічної стійкості рослин	35
Сенін С., Дворщенко К., Берегова Т., Остапченко Л., Вплив мультипробіотику "Симбітер® ацидофільний" на структурний стан ліпідів печінки щурів за умов тривалої шлункової гіпохлоргідрії	37
Грищук В., Жерноскова Д., Березницький Г. Порівняльна характеристика способів очистки протеїну С	39
Злацький І., Гандзюра В. Вплив іонів міді на ембріональний розвиток <i>DANIORERIO</i> (Hamilton, 1822)	43
Антонюк Т., Оканенко О., Таран Н. Динаміка гліколіпідів вегетативних органів представників роду <i>RHODODENDRON L.</i> при акліматії до температурних умов лісостепу України	46
Андрійчук Т., Ракша Н., Драган Л., Лугова С. Залучення ферментів родини каспаз у радіаційно-індукований апоптоз лімфоцитів щурів	48
Скачкова О., Швець Ю., Храновська Н. Особливості міграції дендритних клітин у мишей лінії CBA	52
Гринюк І. Вплив H_2O_2 ТА Ca^{2+} на набухання мітохондрій тимоцитів	54
Гнатюк В., Мусієнко М., Гаврилюк В. Особливості радіонуклідного забруднення в рекреаційній зоні НПП "Подільські Товтри"	56

CONTENTS

Dvorshchenko C., Vakal S., Beregovuy S. Lipid peroxidation in organs of a digestive tract at stress stomach ulcer.....	4
Torhalo E., Gayda L., Stepanov Y. Impact quercetin and lipoflavon effect on the activity under conditions of experimental glutathione peroxidase hemorrhagic stroke	5
Lukashov D. Parameters of the metal depuration from organisms molluscs <i>LYMNAEA STAGNALIS</i> (L.) as factors of the water ecosystems contamination	6
Falaleeva T., Beregova T. Analysis of the participation of central and peripheral monotropony glutamate AMPA receptor-and-subtypes in kayinatnoho of basal gastric acid secretion in rats	10
Kryzhanovskiy S., Tukaev S., Zyma I. EEG-characteristics of mnemonic brain activity among people with different heart rate	12
Filimonova N., Makarchuk M., Sid'ko O. Electric activity of the cerebral cortex of the human at the working-memory tests	15
Galenova T., Konopelnyuk V., Tsudzevych B. Antioxidant enzyme activity in different tissues of rats of experimental type 2 diabetes mellitus	18
Prybyt'ko I., Beregova T., Kharchenko M. Influence pererizky pyloric branch of anterior trunk stray nerves on gastric evacuation of meals of carbohydrate composition and determining the propulsion himusu in the duodenum in dogs	20
Tsyryuk A., Kucharskiy B., Neporada K. Changes hlikoproteyidnyh proteohlikannyh components and gastric mucus in rats long hipoatsydnosti	23
Tolstanova G. Expression of transcription factor EGR-1 in the colon of rats with experimental ulcerative colitis	25
Cherninsky A., Piskorska N., Zyma I. The asymmetry of human brain activation during the perception of hedonic odors	28
Paholchenko V., Tukalenko Eu., Danilov S., Makarchuk M. Anxiety level in rats with different experience of social interactions	30
Kovalenko O., Govorukha T., Bondarenko A., Makarchuk M. Learning ability and lipid peroxidation of rats with different degree of alcoholic motivation	32
Grudina N., Batsmanova L., Storozhenko V., Preadaptation as evolution element and forming factor of non-specific plant resistance	35
Senin S., Dvorshchenko K., Beregova T., Ostapchenko I. Influence of multiprobiotic "Symbiter® acidophilic" on structural state of rat hepatic lipids under the conditions of long-term gastric hypochlorhydria	37
Gryshchuk V., Zhernosekov D., Bereznitskiy G. Comparison characteristics of the protein C purification methods.....	39
Zlatskiy I., Gandzyura V. Effect of cooper ions on embryogenesis development Danio Rerio (Hamilton, 1822)	43
Antonyuk T., Okanenko T., Taran N. Glycolipids dynamics of RHODODENDRON L. specie vegetative organs while acclimation to temperature conditions of Ukraine forest-steppe	46
Andreychuk T., Raksha N., Dragan L., Meadow S. Involvement of caspase family enzymes in radiation-induced apoptosis in rat lymphocytes	48
Skachkova O., Shvets Yu., Khranovska N. DC migration paculiarities in CBA mice	52
Grynyuk I. Influence of H ₂ O ₂ AND Ca ²⁺ on thymocytes mitochondrial swelling.....	54
Gnatyuk V., Musienko M., Gavriyuk V. Features of radionuklidnogo contamination are in the rekreaciyniy area of NPP "Podil'ski Tovtri"	56

ПЕРЕКИСНЕ ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ У ОРГАНАХ ТРАВНОГО ТРАКТУ ЩУРІВ ЗА УМОВ СТРЕСОВОЇ ВИРАЗКИ ШЛУНКА

Показано, що за умов стресової виразки зростає інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів у слизовій оболонці шлунка, печінці та підшлунковій залозі щурів. Найбільше накопичення продуктів пероксидації ліпідів за умов дії стресу спостерігається у слизовій оболонці шлунка.

It is shown, that at a stress ulcer intensity of lipid peroxidation processes in gastric mucosa, liver and pancreas is increased. At action of a stress the maximal accumulation of lipid peroxidation products is observed in stomach mucosa.

Вступ. Тригерами утворення ерозивно-виразкових ушкоджень слизової оболонки шлунка є стреси. Порушення структури та функції епітеліоцитів знижує резистентність слизової оболонки гастродуоденальної зони і призводить до виникнення хворобливих станів, що супроводжуються залученням у патологічний процес інших органів травної системи, зокрема печінки та підшлункової залози [3, 6].

Важливим пусковим механізмом структурно-функціональних змін клітин за умов розвитку патологічного процесу є порушення балансу між продукцією активних форм кисню (АФК) та антиоксидантною системою. Дія активних кисневих метаболітів пов'язана з активацією процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) у мембранах клітин [7]. Тому метою нашої роботи було визначити основні показники вільнорадикального окиснення ліпідів у слизовій оболонці шлунка, печінці та підшлунковій залозі щурів за умов дії стресового фактору.

Об'єкт та методи досліджень. У дослідях використовували щурів лінії Вістар обох статей вагою 180 – 230 г., яких утримували на стандартному раціоні віварію. Для створення стресової виразки шлунка у тварин використовували модель іммобілізаційного водоімерсі-

онного холодового стресу [8]. Після іммобілізації щурів у спеціальних патронах, тварин розміщували в резервуарах з водою, температура якої складала 23°C. Через 3 години щурів виймали з патронів та декапітували. Вміст дієнових кон'югатів визначали в гептан-ізопропанольному екстракті спектрофотометричним методом [1], шиффових основ – флюориметричним методом [2]. Вміст ТБК-активних сполук визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [5]. Статистичну обробку результатів дослідження проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики [4]. Вірогідність різниці між контрольними та дослідними вимірами оцінювали за t-критерієм Ст'юдента.

Результати та їх обговорення. Для оцінки пероксидації ліпідів у досліджуваних органах при експериментальній виразці шлунка нами було визначено вміст первинних продуктів ПОЛ – дієнових кон'югатів, проміжних продуктів ПОЛ – ТБК-активних сполук та кінцевих продуктів ПОЛ – шиффових основ.

Встановлено, що при впливі стресового фактору вміст дієнових кон'югатів зростає: у слизовій оболонці шлунка – у 1,6 рази, у печінці – у 1,4 рази та у підшлунковій залозі – у 1,5 рази відносно контролю (табл. 1).

Таблиця 1. Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів у органах щурів за умов стресової виразки шлунка, ($M \pm m$, $n=10$).

Тип органу		Слизова оболонка шлунка	Печінка	Підшлункова залоза
Досліджуваний показник				
Дієнові кон'югати, нМоль х мг білка ⁻¹	контроль	323,38 ± 12,12	248,73 ± 21,87	360,28 ± 31,59
	стрес	511,54 ± 15,15	348,19 ± 33,95	539,78 ± 5,21
ТБК-активні сполуки, нМоль х мг білка ⁻¹	контроль	74,65 ± 6,83	65,24 ± 5,81	87,54 ± 8,15
	стрес	179,15 ± 17,12	91,25 ± 9,02	183,42 ± 17,34
Шиффові основи, ум. од. х мг білка ⁻¹	контроль	6,37 ± 0,54	8,32 ± 0,68	9,42 ± 0,91
	стрес	10,78 ± 0,91	9,95 ± 0,73	12,97 ± 1,08

*- $p < 0,05$ щодо контролю

Показано, що за умов стресової виразки шлунка вміст проміжних продуктів ПОЛ збільшувався: у слизовій оболонці шлунка – у 2,4 рази, у печінці – у 1,4 рази та у підшлунковій залозі – у 2,1 рази по відношенню до контролю (табл. 1).

При визначенні кінцевих продуктів ПОЛ у досліджуваних органах за умов дії стресу виявлено статистично значиме накопичення шиффових основ. Так, у слизовій оболонці шлунка вміст шиффових основ збільшувався у 1,7 рази, у печінці – у 1,2 рази та у підшлунковій залозі – у 1,4 рази відносно контрольних величин (табл. 1).

Отримані результати експериментальних досліджень свідчать про порушення структури біомембран клітин досліджуваних органів за умов стресової виразки. Встановлене накопичення окиснювальних пошкоджень мембранних ліпідів пов'язане з надлишковим вмістом активних кисневих метаболітів у цих клітинах. Такі зміни можуть виникнути як внаслідок зростання утворення вільних радикалів, так і при недостатній ефективності роботи системи антиоксидантного захисту клітин. Накопичення

перекисних угруповань у жирнокислотних залишках фосфоліпідів мембран може призвести до змін їх властивостей, таких як проникність, стійкість ліпід-білкових комплексів та спричинити інактивацію ферментів.

Висновки. Таким чином, за умов стресової виразки спостерігається окисне пошкодження мембранного апарату клітин слизової оболонки шлунка, печінки та підшлункової залози щурів, що проявляється у підвищенні вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів. Найбільше ушкоджуються мембрани епітеліоцитів шлунка, в яких зафіксоване максимальне збільшення продуктів ліпідної пероксидації.

Встановлені зсуви окисно-антиоксидантної рівноваги у бік окисного стресу є підґрунтям для розвитку функціональних розладів органів травного тракту.

1. Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Хмара Н.Ф. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов // Лабораторное дело. – 1988. – № 2. – С. 60-63.
2. Колесова О.Е., Маркин А.А., Федорова Т.Н. Перекисное окисление липидов и методы определения продуктов липопероксидации в биологических средах // Лабораторное дело. – 1984. – № 9. – С. 540-546.

3. Лапина Т.Л. Язвенная болезнь и патология печени (анализ 6456 секционных наблюдений за 1983-1992 гг.) / Т.Л. Лапина, В.В. Серов, Л.О. Севергина // Архив патологии. – 1996. – № 6. – С. 33 – 37. 4. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. – М.: Информполиграф, 2002. – 305 с. 5. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 66-68. 6. Choung R.S., Talley N.J. Epidemiology and clinical presentation of stress-related peptic damage and chronic

peptic ulcer // Curr. Mol. Med. – 2008. – Vol. 8. – P. 253-257. 7. Porter N.A., Caldwell S.E., Mills K.A. Mechanism of free radical oxidation of unsaturated lipids // Lipids. – 1995. – Vol. 30, №4. – P. 277-290. 8. Takagi K. and Okabe S. The effects of drugs on the production and recovery process of the stress ulcer // J. Pharmacol. – 1968. – Vol. 18. – P. 9-18.

Надійшла до редколегії 15.10.09

УДК 615.45:615.033

Є. Торгалло, канд. біол. наук, Л. Гайда, канд. біол. наук,
Ю. Степанов, канд. біол. наук

ВПЛИВ КВЕРЦЕТИНУ ТА ЛІПОФЛАВОНУ НА АКТИВНІСТЬ ГЛУТАТІОНПЕРОКСИДАЗИ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГЕМОРАГІЧНОГО ІНСУЛЬТУ

Досліджували вплив кверцетину та ліпофлавонолу на активність глутатіонпероксидази в головному мозку, нирках та селезінці за умов експериментального геморагічного інсульту. Виявлено, що активність глутатіонпероксидази при геморагічному інсульті знижувалась, а на фоні введення кверцетину та ліпофлавонолу дані показники підвищувались у всіх досліджуваних органах. Встановлено підвищення активності може свідчити про активацію процесів знешкодження продуктів пероксидного окиснення ліпідів, ксенобіотиків в результаті реакцій нуклеофільного заміщення та приєднання, а також, про участь ферментів в ендогенному метаболізмі, що забезпечує локальний захист організму, збільшуючи стійкість клітин й організму в цілому.

Studied the influence of quercetin on the activity and lipoflavonol glutathione peroxidase in the brain, kidneys and spleen under conditions of experimental hemorrhagic stroke. Revealed that the activity glutathione peroxidase with hemorrhagic stroke decreased, and the background of the introduction of quercetin and lipoflavonol this index rose in all organs investigated. Assigned to increase activity may indicate the activation process peroxysidno disposal of products of oxidation of lipids, xenobiotics as a result of nucleophilic substitution reactions and adherence, as well as on enzymes involved in endogenous metabolism, which provides local protection of body cells and increasing the stability of the whole organism.

Вступ. Геморагічний інсульт є одним із найпоширеніших серцево-судинних захворювань. Рівень смертності внаслідок геморагічного інсульту в Україні в 2,5 рази перевищує відповідний показник західноєвропейських країн. Летальність у гострому періоді становить 40-70% залежно від важкості крововиливу. Більшість пацієнтів, які перенесли інсульт, залишаються інвалідами, а 20-25% з них потребують сторонньої допомоги упродовж всього подальшого життя [1]. Геморагічний інсульт є наслідком крововиливу в мозок. Кров, що вилилась у мозок, руйнує, частково здавлює нервову тканину, спричинює набряк мозку, при якому спостерігаються зміщення мозкових структур, здавлення стовбура мозку. У профілактиці і лікуванні в післяінсультному періоді застосовують фармакологічні препарати, спрямовані на метаболічний захист мозку.

Надлишковій генерації активних форм кисню, яка лежить в основі багатьох цереброваскулярних патологій, протистоїть антиоксидантна система. Глутатіонова антиоксидантна система ферментів, яка включає глутатіон-залежні ферменти перешкоджає накопиченню токсичних продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), відіграє важливу роль в детоксикації, деградації та виведенні із організму чужорідних органічних субстанцій. Глутатіонпероксидаза є ключовим ферментом в механізмах захисту клітин від екзогенних та ендогенних токсичних сполук та вільних радикалів, які виникають у відповідь на геморагічний інсульт.

Узгоджена робота глутатіонпероксидази попереджає подальшому прогресуванню пероксидації, розповсюдження неферментативних реакцій, накопичення вторинних метаболітів [2].

У профілактиці і лікуванні в післяінсультному періоді застосовують фармакологічні препарати, спрямовані на метаболічний захист мозку. Однак більшість препаратів не досягають потрібної терапевтичної субстанції в структурі мозку [3]. Тому поряд з традиційними засобами лікування (гліатилін, оксидат натрію, пірацетам, актовегін, солкосерил, церебралізін) останнім часом все більше уваги приділяється застосуванню біофлавоноїдів, зокрема найбільш перспективним з них – ліпофлавонолу та кверцетину.

Однак, біодоступність останнього до клітин мозку ускладнена в зв'язку з його нерозчинністю у водному

середовищі, що виключає внутрішньовенне введення і направлений швидкий транспорт до зони ураження [4]. Тому, застосовуючи ліпосомальну форму кверцетину – ліпофлавонолу, можна уникнути даної проблеми.

Метою нашого дослідження було вивчити вплив кверцетину та ліпофлавонолу на активність глутатіонпероксидази в тканинах мозку, селезінки та нирках при експериментальному геморагічному інсульті.

Об'єкт та методи досліджень. В досліді використовували білих щурів-самців лінії Вістар вагою 180 ± 10 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Геморагічний інсульт викликали згідно з методом [5]. Кверцетин вводили перорально, а ліпофлавонолу ("Біолек", Харків) внутрішньовенно (10 мг/кг) протягом 7 днів. Активність глутатіонпероксидази визначали за накопиченням окисненого глутатіону (GSSG) за методом [6]. Статистичну обробку результатів проводили з використанням t-критерію Ст'юдента при $p \leq 0,05$ [7].

Результати та їх обговорення. Відомо, що одним із універсальних механізмів пошкодження клітин на рівні біологічних мембран є процеси ПОЛ. В основі серцево-судинних патологічних процесів лежить порушення цілісності мембран кардіоміоцитів та ендотеліоцитів судин, що призводять до активації фосфоліпаз та оксигеназ, які стимулюють утворення вільних радикалів, провокують порушення системи пероксидації та впливають не перебіг мембранодиструктивних процесів у клітинах.

Головний мозок людини найбільш чутливий до вільно радикального пошкодження. Некерована та некомпенсована активація процесів ПОЛ, виснаження пулу ендогенних антиоксидантів та порушення регуляторних механізмів антирадикального захисту є одним з факторів пошкодження нейронів.

Нами було досліджено активність глутатіонпероксидази в гомогенаті різних органів при експериментальній моделі геморагічного інсульту у щурів та за умов застосування кверцетину та ліпофлавонолу (табл.1). Було встановлено, що активність глутатіонпероксидази статистично достовірно знижується в мозку на 70%, в нирках на 43%, в селезінці на 36%. Зниження активності досліджуваних ферментів може стати важливим чинником ініціації процесів ліпопероксидації та накопичення її продуктів, які, в свою чергу, можуть бути причиною подальшого розвитку патології [8].

Таблиця 1. Активність глутатіонпероксидази в різних органах при експериментальній моделі геморагічного інсульту та за умов введення різних форм кверцетину ($M \pm m$; $n=5$ на серію досліджень)

Органи	Контроль	Інсульт		
		без введення препарату	введення кверцетину	введення ліпофлавану
Активність глутатіонпероксидази (мкмоль GSSG/мг·хв)				
Мозок	4,24±0,35	2,55±0,43*	5,65±0,03*	7,87±0,11*
Селезінка	1,69±0,02	0,99±0,39*	2,48±0,08*	3,73±0,07*
Нирки	4,45±0,55	1,39±0,19*	4,09±0,29	6,11±0,63*

* – $p \leq 0,05$ порівняно з контролем

В досліджених органах за умов розвитку геморагічного інсульту відбувається активізація процесів декомпенсації антирадикального захисту. За цих умов знижується активність глутатіонпероксидази, що може бути однією із причин порушення проліферації клітин.

Тому, доцільним є вивчення можливостей застосування антиоксидантів для корекції встановлених нами порушень. Антиоксидантна дія флавоноїдів, особливо це стосується кверцетину, обумовлена їх здатністю нейтралізувати активовані форми кисню та блокувати ланцюгові вільнорадикальні реакції. Цитопротекторний ефект флавоноїдів може бути наслідком їх опосередкованої дії на ферментативні системи, а також участі у безпосередньому знешкодженні вільних радикалів та взаємодії з ензимами [9]. Тому припускають, що головний вплив флавоноїдів на судинну систему пов'язаний саме з антиоксидантною активністю досліджуваних речовин [10].

В результаті проведених досліджень нами встановлено, що введення ліпофлавану приводило до достовірної зміни активності глутатіонпероксидази в усіх досліджуваних органах зростання ферменту зростала в мозку майже в 2 рази, у нирках в 1,5 рази та у селезінці у 3 рази порівняно з контролем. При застосуванні препарату кверцетину спостерігали аналогічні зміни.

В результаті досліджень нами встановлено, що введення препаратів кверцетину та ліпофлавану приводило до достовірного зростання активності глутатіонпероксидази у мозку, селезінці та нирках, що може свідчити про активацію процесів знешкодження продуктів пероксидного окиснення ліпідів, ксенобіотиків в результаті реакцій нуклеофільного заміщення та приєднання, а також, про участь ферментів в ендогенному метаболізмі, що забезпечує локальний захист організму, збільшуючи стійкість клітини й організму в цілому.

Отримані результати показали, що за умов геморагічного інсульту відбувається інтенсифікація процесів ПОЛ, про що свідчить встановлене нами підвищення вмісту їх продуктів та зниження активності антиоксида-

нтних ферментів. Введення кверцетину та ліпофлавану приводить до нормалізації стану системи ПОЛ, а саме, до зниження вмісту продуктів ПОЛ та активації ферментів антиоксидантного захисту.

Висновки. Досліджено активність глутатіонпероксидази в головному мозку, селезінці та нирках при експериментальній моделі геморагічного інсульту у щурів та за умов застосування кверцетину і ліпофлавану. Встановлено, що активність глутатіонпероксидази при геморагічному інсульті знижувалась, а на фоні введення кверцетину та ліпофлавану даний показник збільшувався майже у 2 рази. Вплив ліпофлавану був більш ефективним, особливо в тканині головному мозку, що може свідчити про активацію процесів знешкодження продуктів ПОЛ, а також про участь ферментів в ендогенному метаболізмі, що забезпечує локальний захист організму, збільшуючи стійкість клітини і організму в цілому.

1. Возіанов О.Ф. Смертність населення України: головні причини, шляхи подолання негативних тенденцій // Журнал Академії наук України. – 1996. № 2. – С. 191-198.
2. Барабой В.А. Особенности биологического действия ионизирующего излучения в малых дозах / Барабой В.А. – Врачеб. дело. – 1991. – № 7. – С. 11-112.
3. Могурова Т.В., Лазарева Д.Н. Влияние лекарственных средств на свободно-радикальное окисление // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2000. – Т.63, №1. – С. 71-72.
4. Брандт. 3. Статистические методы анализа наблюдений. – М.: Мир, 1975. – 321 с.
5. Ярош О.К., Кириченко С.В., Данилов М.М. Метод відтворення інтрацеребральної геморагії у білих щурів // Журнал. Кровообіг та гомеостаз. – 2005. – №1. С.77-81.
6. Власова С. Н. Активність глутатіон-зависимих ферментів еритроцитів при хронічних захворюваннях печінки у дітей / Власова С. Н., Шабуніна Е.І., Персегіна І. А. – Лаб. дело. – 1990. – №8. – С. 19 – 22.
7. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен). Учебн. Пособие/под ред. Прохоровой М.И. – Л.: изд., Ленинград. Унив-та. – 1982. – 272 с.
8. Барабой В.А. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов / Барабой В.А. – Успехи совр. биол. – 1991. – Т. 3, вып. 6. – С. 923-931.
9. Зозуля Ю.А. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная защита при патологии головного мозга / Ю.А.Зозуля, В.А. Барабой, Д.А.Сутковой. – М.: Знание-М, 2000. – 343 с.
10. Граник, В.Г. Лекарства. Фармакологический, биохимический и химический аспекты / В.Г. Граник. – М.: Вуз. кн., 2001. – 407 с.

Надійшла до редколегії 18.01.10

УДК 504.064:594.141

Д. Лукашов, канд. біол. наук

ПАРАМЕТРИ ВИВЕДЕННЯ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ З ОРГАНІЗМУ МОЛЮСКІВ *LYMNAEA STAGNALIS* (L.) ЯК ПОКАЗНИКИ ЗАБРУДНЕННЯ ВОДНИХ ЕКОСИСТЕМ

Моллюсків Lymnaea stagnalis, які містили різко відмінні концентрації Cd, Cr та Cu в м'яких тканинах, утримували протягом 72 діб в штучному водному середовищі за умов відсутності зазначених металів. Параметри динаміки втрати металів описувалися двофазною моделлю з вираженою першою фазою, коли відбувалося швидке зниження вмісту металів та другою повільною фазою виведення. В результаті такої очистки, концентрація досліджених металів в моллюсках з водою, де спостерігали підвищений вміст металів, знизилася до фонових рівнів. В моллюсках з початковими фоновими рівнями концентрація металів істотно не змінилася.

The mollusks Lymnaea stagnalis, what contained sharply excellent concentrations of Cd, Cr and Cu in soft tissues, has been contained during 72 day in artificial water ambience in condition of the absence these metals. The metal losses Parameters were described by two-phase model with expressed by first phase, when occurred the quick reduction of the metal contents and second slow phase of the metal removing. As a result of such depuration the metal concentration in mollusks from water reservoirs, where observed high metal contents, fell to background level. In mollusks with initial background metal concentration changes was not significantly.

Вступ. Застосування біологічних підходів до моніторингу забруднення довкілля є перспективною методологією, яка здатна забезпечити адекватну оцінку антропогенного впливу на екосистему в цілому. Регламенто-

вані методи моніторингу забруднення водних екосистем обмежені дослідженнями хімічного складу води, які вимагають ретельного пробовідбору, складних аналітичних операцій та високої кваліфікації персоналу. Проте,

© Лукашов Д., 2010

використання показників хімічного складу води не є адекватною оцінкою рівня забруднення водної екосистеми. Розраховані нормативи гранично допустимих концентрацій металів для питної води (ГДКв), які мають санітарно-гігієнічну основу, можуть слугувати виключно для оцінки небезпеки здоров'ю людини і не відображають ступеню благополуччя природних екосистем. Широко застосовані при екологічних дослідженнях нормативи гранично-припустимих концентрацій металів для водойм рибогосподарського призначення (ГДКвр) також є неадекватними показниками по причині заниження рівнів, встановлених експериментально для іонних форм металів. В результаті наприклад, ГДКвр токсичного елементу Cd (0,005 мг/л) у 5 разів перевищує ГДКвр для есенціального елементу Cu (0,001 мг/л) [3].

Одним з альтернативних шляхів визначення забруднення водних екосистем є застосування гідробіонтів-біоаккумуляторів, хімічний склад тканин яких відображає наявність біологічно доступних забруднювачів в навколишньому середовищі. Проте, незважаючи на великий обсяг накопиченої в літературі інформації, на даний момент не існує встановлених екологічних норм вмісту забруднювачів в прісноводних гідробіонтах. Запропоновані нами методи визначення фонових рівнів вмісту важких металів у тканинах двостулкових та червононогих молюсків [1] можуть слугувати такими нормативами. Однак фонові рівні потребують фізіолого-біохімічного обґрунтування у зв'язку з тим, що підвищення вмісту металів в організмі може спостерігатися в результаті різноманітних процесів в організмі, безпосередньо не пов'язаних із забрудненням [13].

Метою представленої роботи було експериментальне підтвердження наявності забруднення водної екосистеми шляхом визначення параметрів нормалізації вмісту Cr, Cu та Cd в тканинах індикаторних видів молюсків при переміщенні їх до модельного середовища з встановленими фізико-хімічними параметрами.

Об'єкти та методи досліджень. Для проведення експерименту було обрано червононогих молюсків *Lymnaea stagnalis*, які характеризуються невеликими розмірами та добре переносять транспортування й акліматизацію до лабораторних умов. Було використано молюсків з трьох ставів різних районів України, в яких раніше проведеними нашими дослідженнями були розраховані характерні рівні вмісту важких металів в молюсках [1]:

Вибірка 1 – с. Жукотин (Івано-Франківська обл.), найбільший вміст (Cd – 1,2; Cr – 15,2; Cu – 58 мг/кг);

Вибірка 2 – м. Чернігів, середній вміст (Cd – 0,9; Cr – 5,6; Cu – 34 мг/кг);

Вибірка 3 – с. Решетилівка (Полтавська обл.), низький вміст (Cd – 0,6; Cr – 3,1; Cu – 9 мг/кг).

З кожного ставу було відібрано по 50 екземплярів *L. stagnalis* стандартного розміру: висотою черепашки $40,1 \pm 1,2$ мм, масою $3,4 \pm 0,8$ г. Молюсків живими зберігали у вологих бавовняних мішках і протягом доби доставляли до лабораторії. Ставковиків розміщували у 12 пластикових акваріумах, об'ємом 8 л. Для перешкодження контакту молюсків з осадом, дно акваріуму було відгороджено полімерною сітчастою стінкою з отворами 5×5 мм. В якості модельного середовища використовували штучну прісну воду наступного складу 0,5 мМ/л NaCl; 0,1 мМ/л KCl; 0,4 мМ/л CaCl₂; 0,3 мМ/л NaHCO₃ [15]. Воду в акваріумах замінювали перші 5 діб щодоби, наступні 30 діб – кожні 2 доби, починаючи з 35-ї по 72-гу добу (кінець експерименту) – кожні 4 доби. З метою підтримання сталого складу експериментального середовища молюсків протягом експерименту не годували. За період експерименту смертність молюсків склала 8%, що не перевищує природних показників. З кожного акваріуму через 1, 2, 5, 10, 13, 22, 35, 45, 52, 60, 73 доби вилучали по одному екземпляру.

М'які тканини відокремлювали від черепашки, висушували протягом доби при 95°C та мінералізували за допомогою 56% HNO₃ (хч) з додаванням 35% H₂O₂. Визначення вмісту Cr, Cu та Cd (мг/кг маси сухої речовини) проводили за допомогою атомно-адсорбційного спектрофотометру С115-М1 відповідно стандартним методам [2].

Часову динаміку вмісту важких металів апроксимували за допомогою кінетичного рівняння виду:

$$C = aT^b \quad (1)$$

де C – концентрація металу, мг/кг; T – час, доба; a та b – коефіцієнти. З рівняння (1) розраховували період напіввиведення металу $T_{1/2}$ для концентрації напіввиведення, величину якої знаходили з рівняння:

$$C_{1/2} = C_{\max} - \frac{(C_{\max} - C_{\min})}{2} \quad (2)$$

де $C_{1/2}$ – концентрація напіввиведення, $C_{\max}$ – максимальна концентрація, $C_{\min}$ – мінімальна концентрація.

Результати та їх обговорення. Порівняння концентрації важких металів у молюсках з встановленими фоновими рівнями для *L. stagnalis* з водойм України [1] показало, що у вибірці 1 на початку експерименту вміст Cr перевищував граничний фоновий рівень (5,4 мг/кг) у 2,8 разів; вміст Cu перевищував граничний фоновий рівень (24,5 мг/кг) у 2,4 рази; вміст Cd перевищував граничний фоновий рівень (0,89 мг/кг) у 1,3 рази (табл. 1). Молюски з вибірки 2 характеризувалися близькими до граничного фонового рівня вмісту зазначених металів. Вибірка 3 включала ставковиків, рівні накопичення металів в яких були у 1,5–2,7 разів нижче граничного фонового рівня.

Таблиця 1. Основні динамічні параметри процесу виведення важких металів молюсками *Lymnaea stagnalis*

Вибірка	Cd				Cr				Cu			
	$C_{\max}$, мг/кг	$C_{\min}$, мг/кг	$C_{1/2}$, мг/кг	$T_{1/2}$, діб	$C_{\max}$, мг/кг	$C_{\min}$, мг/кг	$C_{1/2}$, мг/кг	$T_{1/2}$, діб	$C_{\max}$, мг/кг	$C_{\min}$, мг/кг	$C_{1/2}$, мг/кг	$T_{1/2}$, діб
1	$1,20 \pm 0,22$	$0,55 \pm 0,18$	0,82	12,8	$15,2 \pm 3,3$	$3,0 \pm 0,5$	9,1	1,9	$58,0 \pm 32,2$	$33,7 \pm 19,8$	9,3	5,7
2	$0,91 \pm 0,31$	$0,47 \pm$	0,69	11,2	$5,6 \pm 1,2$	$2,6 \pm 0,8$	3,8	1,2	$33,5 \pm 12,8$	$22,1 \pm 9,9$	12,6	6,0
3	$0,60 \pm 0,19$	$0,40 \pm$	0,50	11,8	$3,1 \pm 0,8$	$1,7 \pm 0,3$	2,4	1,5	$9,2 \pm 2,9$	$8,0 \pm 3,2$	6,7	6,1

Примітки: $C_{\max}$ – максимальна (початкова) концентрація; $C_{\min}$ – мінімальна (кінцева) концентрація; $C_{1/2}$ – концентрація напіввиведення; $T_{1/2}$ – період напіввиведення металу.

Аналіз динаміки втрат металів молюсками у модельному середовищі показав, що протягом першої доби відбувається значне зниження концентрації всіх досліджених хімічних елементів. Проте, величина такого

зниження відрізнялася в залежності від металу. В результаті за перші 24 години виведення було втрачено 9-14% від загальної кількості Cd, 26-54% – Cr, 14-18% – Cu. Найповільніше відбувалося виведення Cd, концен-

трація якого за 73 дні експерименту знизилася у 1,5-2,2 рази, а період $T_{1/2}$ складав 11,2-12,8 діб. Зниження концентрації Cr та Cu за весь період виведення відбулося у 1,5-6,2 рази в залежності від величини початкового вмісту металу в тканинах молюсків. Проте інтенсивність виведення зазначених металів значно відрізнялася. Так період напіввиведення для Cu становив 5-7 діб, у той час як зниження концентрації Cr на 50% відбувалося вже протягом перших двох діб.

Порівняння кривих виведення металів вказує подібність процесу виділення трьох проаналізованих елементів (рис. 1). Всі криві виведення характеризуються наявністю двох періодів – першого короткого початкового періоду, під час якого відбуваються швидкі втрати організмом молюска накопиченого металу. У другій фазі, яка

триває значно довше, спостерігається повільне зниження вмісту металу до моменту досягнення практично стабільного рівня. Цей рівень відображає фізіологічну норму вмісту металу в організмі. Таким чином, виведення зазначених металів відбувається за двофазною моделлю, запропонованою [4]. Але відносно значення цих періодів у процесах виведення досліджених металів значно відрізняється. Так фаза швидкого виведення для Cd становила всього 2 доби, за які було втрачено всього 9-14% загальної кількості металу. При виведенні Cr перша фаза виведення тривала 2-5 діб, але за цей час було виведено 30-62% акумульованого Cr. Найбільш протяжна перша фаза була характерна для виведення Cu, тривалість якої складала 13-22 доби, протягом яких було втрачено 48-67% загальної кількості металу.

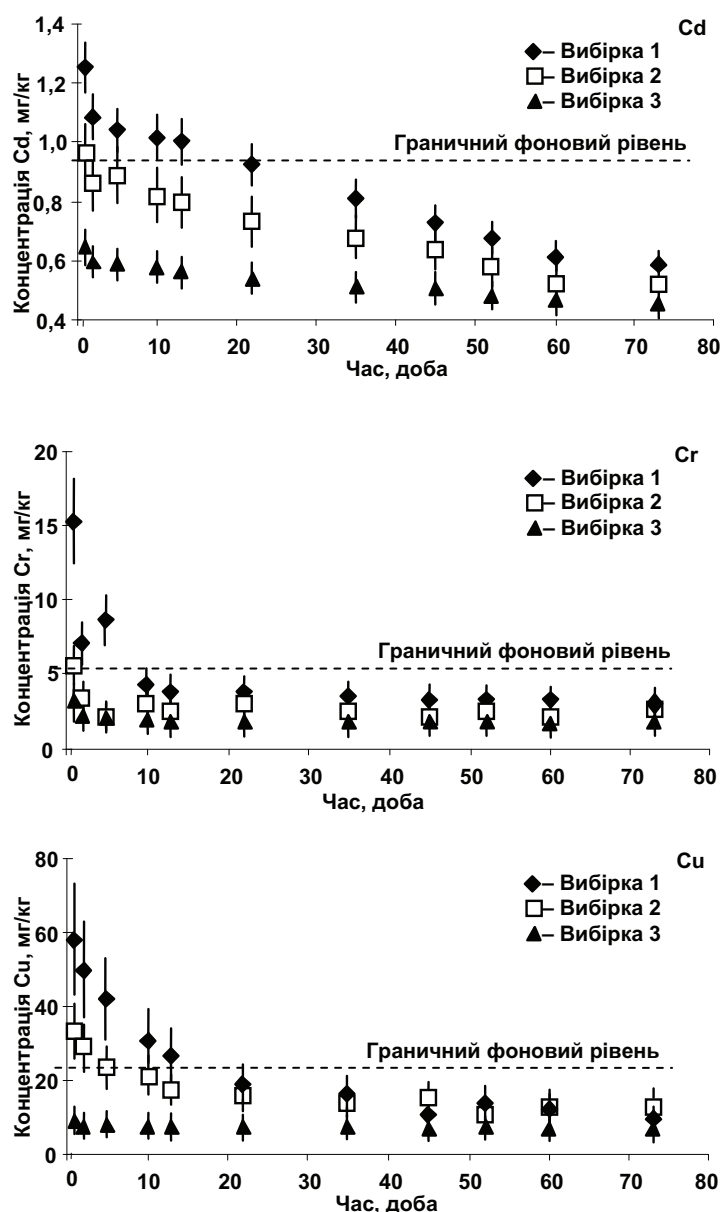


Рис. 1. Динаміка виведення металів з організму *Lymnaea stagnalis*

Описані часові залежності рівнів концентрації важких металів в м'яких тканинах молюсків розкривають процеси накопичення металів з навколишнього середовища, їх роль в організмі та механізми їх виведення. Наявність двох фаз виведення свідчить про наявність в організмі молюсків двох незалежних систем проникнен-

ня та накопичення важких металів. Відомо, що важкі метали проникають до організму молюсків двома основними шляхами: 1) через слизові оболонки травної системи під час травлення їжі та засвоєння її продуктів; 2) через поверхневі покриви частин тіла, що контактують з зовнішнім середовищем. Тривалий час доміную-

чим процесом проникнення металів до організму гідробіонтів вважали адсорбцію через покриви зовнішніх органів [9]. Саме тому, рівні накопичення важких металів в молюсках часто пов'язували із забрудненням водного середовища [9]. Проте, численними дослідженнями було доведено важливу роль травної системи у проникненні важких металів до організму молюсків. Особливо важливою такою акумуляцією є для аніонних форм металів [4]. В результаті ефективності накопичення металів з їжі може складати 10-93%.

Під час першої фази відбувається швидке вивільнення металів, які асоційовані з їжею у травному комку, або адсорбовані на стінках кишечника та каналах травної залози. Під час другої фази спостерігається виведення внутрішньоклітинної фракції металів, які зв'язані з компонентами цитозолу [9]. Важливими органометалічними сполуками всередині клітини є низькомолекулярні білки металотіонеїни [10] та металвмісні гранули [7]. Процес виведення металів за межі клітини вимагає енергетичних витрат та значного часу. Початок повільної фази виведення співпадає з різким зменшенням маси тіла та витратами запасів глікогену [9]. В нашому дослідженні істотне зменшення (на 12-32%) маси тіла (у перерахунку на масу сухої речовини) ставковиків спостерігали з 13 по 45 день утримання в акваріумах.

Ефективність асиміляції Cd з їжі становить 11-34% [5]. В результаті частка цього металу, яка пов'язана з травною системою, є незначною. Одночасно Cd інтенсивно акумулюється із зовнішнього середовища покривами молюсків [5] та міцно зв'язується з тканинами [11]. При виведенні металу з організму ставковика відбувається незначна втрата Cd в результаті процесів очищення кишечника під час першої швидкої фази. Друга повільна фаза має значну тривалість. У порівнянні з іншими металами, Cd характеризується найбільшим періодом напіввиведення. За умов попереднього утримання *L. stagnalis* в середовищі з високим вмістом Cd, спостерігали різке зниження концентрації металу протягом перших 3-х діб, однак за наступні 30 днів концентрація знижувалася лише на 40% [12]. В експериментальних умовах для *Dreissena polymorpha* $T_{1/2}$ становив 60-65 діб [14]. У природних умовах для *Crassostrea gigas* $T_{1/2}$ дорівнював 40 діб [11]. В результаті, після 72 діб експерименту молюски, які на початковому етапі мали значні відмінності концентрації цього металу, не досягли однакового стабільного рівня і характеризувалися статистично значимими відмінностями за вмістом Cd.

Ефективність накопичення Cr з їжею досягає 86-93% за умов переважання в ній бактеріальних клітин [6]. При цьому ефективність засвоєння з їжі не перевищує 19%. Одночасно ефективність поглинання Cr з водного середовища складає лише 0,3-0,5% [14]. Такий міцний зв'язок цього хімічного елементу з їжею пов'язаний з тим, що понад 98% Cr знаходиться у складі оболонки рослинних клітин, які не руйнуються під час травлення [16]. Однак у бактеріальних клітинах цей елемент знаходиться у більш легкозасвоюваній формі. Таким чином, основна частка цього хімічного елементу припадає на вміст травної системи і не є власне асимільованою організмом. Спостерігається швидка втрата Cr в результаті процесів очищення кишечника. Час першої появи Cr при експериментальному загодуванні *L. stagnalis* складав 5 годин, а через 1 добу відбувалося виведення з організму 90% металу [5]. В нашому дослідженні при максимальній початковій концентрації металу ставковики протягом перших 5 діб втрачали до 62% загального вмісту Cr.

Мідь є важливим есенціальним металом для червоногих молюсків у зв'язку з тим, що вони містять Cu-

вмісні дихальні пігменти. Тому молюски інтенсивно поглинають цей елемент з води. Крім того, ставковики можуть отримувати значну кількість металу в результаті споживання донних відкладів, збагачених Cu [8]. Як наслідок, молюски можуть отримувати до 64% загальної кількості Cu з їжі і лише 36% з водного розчину [4]. Таким чином, можна спостерігати паралельні незалежні шляхи надходження цього важливого металу до організму молюсків. Також процеси виведення даного металу характеризуються різними динамічними параметрами. Так, період піввиведення Cu з кишечника для *C. fluminea* становив 1,6 доби, а з м'яких тканин – 158 діб. В результаті протягом перших 5-ти діб спостерігали втрати до 35% загальної кількості металу [4]. В нашому експерименті період напіввиведення Cu становив близько 6 діб.

Інтенсивність процесів виведення важких металів з молюсків *L. stagnalis* з різних районів України, залежала від початкової концентрації металу в організмі. Чим більшим є вміст металу в м'яких тканинах, тим інтенсивніше проходять його втрати. В результаті процесів виведення відбувається очищення організму від надлишкової кількості металів та зниження їх концентрації до відповідних стабільних рівнів. Концентрація есенціальних металів Cr та Cu в молюсках з окремих вибірок статистично не відрізнялася починаючи з 22-35 доби, що свідчить про досягнення певної фізіолого-біохімічної норми вмісту металів. Концентрація неесенціального Cd продовжувала монотонно знижуватися до завершення експерименту (72 доби). Такий факт можна пояснити тим, що вміст неесенціальних елементів в організмі тварин не має мінімальної фізіологічної межі [13]. В результаті такої очистки, концентрація досліджених металів в молюсках з водойм, де спостерігали підвищений вміст металів, знизилася до фонових рівнів. В молюсках з початковими фоновими рівнями концентрації металів істотно не змінилася.

Висновки. В результаті утримання молюсків в умовах низької концентрації важких металів відбувається швидке зниження вмісту Cd, Cr та Cu до величини фонових рівнів. Таким чином, зазначені фонові рівні відповідають фізіолого-біохімічним нормам вмісту важких металів в організмі молюсків *L. stagnalis*. Динамічні параметри виведення досліджених металів молюсками з водойм, де спостерігали перевищення граничних фонових рівнів, можна вважати підтвердженням наявності забруднення.

1. Лукашев Д.В. Оценка фонового содержания тяжелых металлов в моллюсках *Lymnaea stagnalis* L. пресноводных экосистем Украины // Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы. – Борок, 2008. – Ч.1. – С. 57-59. 2. Методические указания по атомно-адсорбционным методам определения токсичных элементов в пищевых продуктах и пищевом сырье. – М.: ГКСЭНФ, 1992. – 26 с. 3. Светанова Е.С. Накопление тяжелых металлов и нормирование их содержания в водных экосистемах // Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы. – Борок, 2008. – Ч. 3. – С. 121-123. 4. Croteau M.N., Luoma S.N. Delineating copper accumulation pathways for the freshwater bivalve *Corbicula* using stable copper isotopes // Environm. toxicol. chem. – 2005. – V. 24, N11. – P.2871-2878. 5. Croteau M.N., Luoma S.N., Pellet B. Determining metal assimilation efficiency in aquatic invertebrates using enriched stable metal isotope traces // Aquatic toxicol. – 2007. – V.83. – P. 116-125. 6. Decho A.W., Luoma S.N. Flexible digestion strategies and trace metal assimilation in marine bivalves // Limnol. Oceanogr. – 1996. – V. 41, N3. – P. 568-572. 7. Desonky M.A. Tissue distribution and subcellular localization of trace metals in the pond snail *Lymnaea stagnalis* with special reference to the role of lysosomal granules in metal sequestration // Aquat. toxicol. – 2006. – V. 77, N2. – P. 143-152. 8. Gundacker C. Comparison of heavy metal bioaccumulation in freshwater molluscs of urban river habitats in Vienna // Environ. Poll. – 2000. – 110. – P.61-71. 9. Holwerda D.A., Hemelraad J., Veenhof P.R., Zandee D.I. Cadmium accumulation and depuration in *Anodonta cygnea* exposed to cadmium chloride or cadmium-EDTA complex // Bull.Environ.Contam.Toxicol. – 1988. – V.40. – P. 373-380. 10. Leung K.M., Ibrahim H., Dewhurst R.E., et al. Concentration of metallothionein-like proteins and heavy metals in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* exposed to different levels of waterborne cadmium // Bull.environ. contam. toxicol. – 2003. – V.71. – P.1084-1090. 11. Okazaki R.K.,

Panietz M.N. Depuration of twelve trace metals in tissues of oysters *Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica* // *Mar. biol.* – 1981. – V. 63. – P. 113-120. 12. Presing M., V.-Balogh K., Salanki J. Cadmium uptake and depuration in different organs of *Lymnaea stagnalis* L. and the effect of cadmium on the natural zinc level // *Arch. environ. contam. toxicol.* – 1993. – V. 24. – P. 28-34. 13. Rainbow P.S. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what // *Envir. poll.* – 2002. – V. 120. – P. 497-507. 14. Roditi H.A., Fisher N.S. Rates and routes of trace element uptake in

zebra mussels // *Limnol. oceanogr.* – 1999. – Vol. 44, №7. – P. 1730-1749. 15. Schlichter L.C. Unstirred mucus layers: ion exchange properties and effect on ion regulation in *Lymnaea stagnalis* // *J. exp. biol.* – 1982. – V. 98. – P. 363-372. 16. Wang W.X., Fisher N.S. Assimilation of trace elements and carbon by the mussel *Mytilus edulis*: Effects of food composition // *Limnol. Oceanogr.* – 1996. – V. 41, N2. – P. 197-207.

Надійшла до редколегії 27.01.10

УДК 577.112.384+612.817+612.821.8+612.323+612.811.3

Т. Фалалєєва, канд. біол. наук,
Т. Берегова, д-р біол. наук

АНАЛІЗ УЧАСТІ ЦЕНТРАЛЬНИХ ТА ПЕРИФЕРИЧНИХ ІОНОТРОПНИХ ГЛУТАМАТНИХ РЕЦЕПТОРІВ АМПА-ТА КАІНАТНОГО- ПІДТИПІВ У РЕАЛІЗАЦІЇ БАЗАЛЬНОЇ ШЛУНКОВОЇ СЕКРЕЦІЇ КИСЛОТИ У ЩУРІВ

Досліджено роль центральних та периферичних іонотропних глутаматних рецепторів (іГлуР) АМПА- та каїнатного- підтипів у регуляції базальної шлункової секреції кислоти у щурів. Встановлено, що як центральні, так і периферичні іГлуР АМПА- підтипу не залучені у реалізацію базальної шлункової секреції кислоти (ШСК). Центральні та периферичні іГлуР каїнатного підтипу справляють різнонаправлений вплив на базальну шлункову секрецію кислоти: центральні – стимулюють, а периферичні її гальмують. Базальна шлункова секреція кислоти приблизно на 50% є результатом збудження центральних іГлуР каїнатного підтипу ендogenous глутаматом.

It was investigated the role of central and peripheral ionotropic glutamate receptors (iGluR) AMPA- and kainate- subtype in regulation of basal gastric acid secretion in rats. It was established that both central and peripheral iGluR AMPA- subtype are not involved in the regulation of basal gastric acid secretion. Central and peripheral iGluR kainate- subtype have opposite effect on basal gastric acid secretion: central – stimulated, peripheral decreased it. Basal gastric acid secretion approximately 50% is the result of activation of central iGluR kainate- subtype by endogenous glutamate.

Вступ. На сьогодні добре відомо, що глутамат є головним збудливим нейротрансмітером в центральній нервовій системі ссавців [10], який реалізує свою дію через метаботропні (mGluR₁-mGluR₈) та іонотропні (НМДА-, каїнатний- і АМПА- підтипи) глутаматні рецептори (іГлуР). Найбільш дослідженим підтипом іГлуР у регуляції базальної шлункової секреції кислоти (ШСК) є НМДА-підтип. Література відносно участі центральних іГлуР АМПА- та каїнатного- підтипів обмежена та протиречива. За даними одних авторів активація вибірковими агоністами центральних іГлуР АМПА- та каїнатного- підтипів стимулює [9], за даними інших – гальмує [3] базальну ШСК. При цьому одночасно є відомості про те, що іГлуР АМПА- та каїнатного- підтипів не беруть участь у регуляції базальної ШСК [7]. Щодо участі периферичних іГлуР на сьогодні дані літератури обмежені лише однією роботою [8], що, очевидно пов'язано з нещодавнім їх відкриттям. В даній роботі на ізольованих препаратах шлунка щурів показано відсутність впливу не вибіркового агоністу глутаматних рецепторів L-глутамату на базальну ШСК. Так як L-глутамат збуджує всі типи і підтипи глутаматних рецепторів, зробити чіткий висновок про роль периферичних іГлуР АМПА- та каїнатного- підтипів у реалізації базальної ШСК на основі даної роботи не можна.

У зв'язку з цим метою даної роботи було дослідити роль центральних та периферичних іГлуР АМПА- та каїнатного- підтипів у реалізації базальної ШСК у щурів.

Об'єкт та методи досліджень. Дослідження проведені на 63 білих нелінійних щурах-самцях масою 170-220 г з дотриманням нормативів Конвенції з біоетики Ради Європи 1997 року, Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей, загальним етичним принципом експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 року), інших міжнародних угод та національного законодавства у цій галузі [4, 5]. Прилади, що використовувалися для наукових досліджень, підлягали метрологічному контролю. За 24 години до початку експерименту тварин відсаджували на голод, з вільним доступом до води.

Методом перфузії ізольованого шлунку за Гхошем та Шільдом [4] досліджували базальну ШСК в контрольній групі щурів при введенні плацебо (0,5 мл фізіологічного розчину, внутрішньоочеревинно (в/о)) та на фоні дії не селективного блокатора АМПА/каїнатних іГлуР ІЕМ 1751 (5 мг/кг, в/о; НДІЕМ РАМН, м. Санкт-Петербург) та селективного блокатора іГлуР АМПА-підтипу GYKI-52466 (3 мг/кг, в/о; Sigma, USA). Щурів наркотизували уретаном (1,1 г/кг, в/о; Sigma, USA). Нікотиніві ацетилхолінові рецептори блокували гангліоблокатором пентаміном (3,2 мг/кг, в/о; ТОВ "фармацевтична компанія "Здоров'я"). Для вивчення ролі периферичних іГлуР АМПА- та каїнатного- підтипів щурам на цервікальному рівні виконували білатеральну стовбурову ваготомію, за допомогою якої усували впливи з центральної нервової системи на парієтальні клітини. По завершенню дослідів щурів умертвляли за допомогою летальної дози уретану (3 г/кг, в/о; Sigma, USA). Для перевірки розподілу на нормальність було застосовано W тест Шапіро-Вілка. Оскільки наші дані виявилися нормально розподілені ми розраховували середнє значення (M), похибку середнього (m). Порівняння вибірок проводилося за допомогою t-критерію Стюдента для не зв'язаних вибірок. Статистично значущою для всіх показників вважали різницю $p < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення. У щурів з інтактною нервовою системою (ІНС) блокада центральних та периферичних АМПА/каїнатних іГлуР за допомогою ІЕМ 1751 призводила до зменшення базальної ШСК на 44% ($p < 0,01$), тобто одночасне збудження центральних і периферичних АМПА/каїнатних іГлуР ендogenous глутаматом справляє стимулюючий вплив на базальну ШСК. Отже, базальна ШСК, по крайній мірі, частково реалізується через збудження центральних іГлуР каїнатного підтипу ендogenous глутаматом.

У ваготомованих щурів, в умовах відсутності центральних впливів на секреторний апарат шлунка, ІЕМ 1751 збільшував базальну ШСК на 217% ($p < 0,001$), що є свідченням того, що збудження периферичних АМПА/каїнатних іГлуР ендogenous глутаматом гальмує базальну ШСК (рис. 1).

Гангліоблокатор пентамін повністю усував посилюючий ефект блокатора АМПА/каїнатних іГлуР на базальну ШСК у ваготомованих щурів (рис. 2). Ці результати

свідчать про те, що периферичні АМПА/каїнатні іГлуР реалізують свій вплив на базальну ШСК через холінергічну нейропередачу в ентеральній нервовій системі.

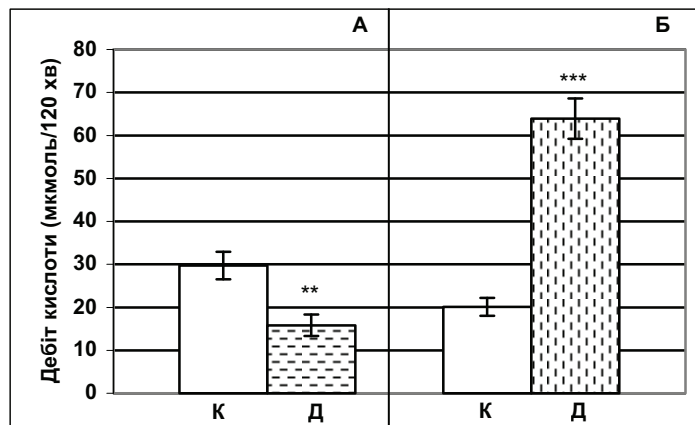


Рис. 1. Вплив IEM 1751 (5 мг/кг, в/о) на базальну шлункову секрецію кислоти у щурів з інтактною нервовою системою (А) та після стовбурової ваготомії (Б), $M \pm m$

Примітка: ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ у порівнянні з контролем; К – контроль, Д – дослід.

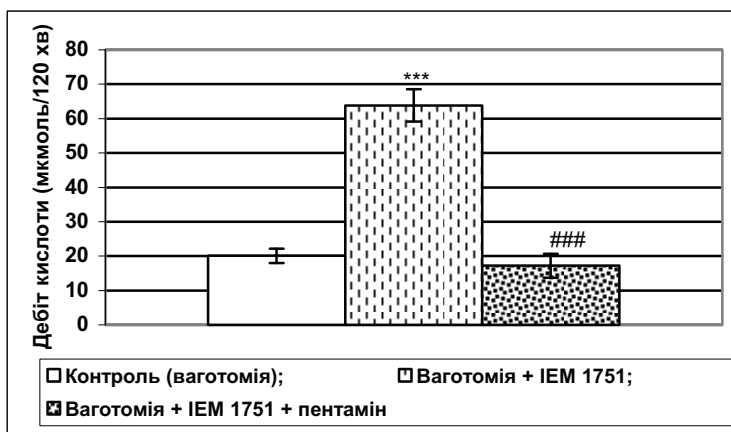


Рис. 2. Вплив IEM 1751 (5 мг/кг, в/о) на базальну шлункову секрецію кислоти у ваготомованих щурів, $M \pm m$

Примітка: *** – $p < 0,001$ у порівнянні з контролем; ### – $p < 0,001$ у порівнянні з групою ваготомія + IEM 1751.

Як у щурів з ІНС, так і у щурів після стовбурової ваготомії селективний блокатор іГлуР АМПА- підтипу GYKI-52466 не впливав на базальну ШСК. Таким чином, і центральні, і периферичні іГлуР АМПА- підтипу не залучені у регуляцію базальної ШСК (рис. 3).

Одержані дані свідчать, що центральні АМПА/каїнатні іГлуР справляють стимулюючий, а периферичні – гальмівний вплив на ШСК. В умовах ІНС сумарний ефект активації АМПА/каїнатних іГлуР – збудження, що відповідає загальним уявленням про глутамат як головний збуджуючий медіатор в центральній нервовій системі [10]. Селективний блокатор іГлуР АМПА- підтипу GYKI-52466 не впливав на базальну ШСК у щурів з ІНС та після стовбурової ваготомії. Таким чином, ефекти IEM 1751 на базальну ШСК є результатом блокади каїнатних рецепторів, на які впливає ендогенний глутамат.

Також нами встановлено, що периферичні каїнатні іГлуР реалізують свій вплив на базальну ШСК через холінергічну нейропередачу в ентеральній нервовій системі. У порівнянні з іншими підтипами глутаматних рецепторів поняття ролі каїнатних іГлуР дуже відстає.

Це пов'язано з тим, що на сьогодні селективні блокатори іГлуР каїнатного підтипу відсутні, а є лише блокатори субодиниці GluK1, а цих субодиниць існує п'ять (GluK1- GluK5) [6]. Завдяки використанню селективних блокаторів субодиниці GluK1 в центральній нервовій системі показано, що іГлуР каїнатного підтипу регулюють збуджуючу та гальмівну синаптичну передачу. Багатьма дослідженнями встановлено [1, 6], що каїнатні іГлуР в основному знаходяться пресинаптично як ауторецептори і регулюють виділення глутамату в синаптичну щілину. Також підтверджено, що каїнатні іГлуР локалізовані і на постсинаптичній мембрані в центральній [2] і ентеральній нервовій системі [5] та приймають участь у довготривалій потенціації та довготривалій депресії. Отже, аналіз наших даних та наведеної літератури дає змогу заключити, що периферичні іГлуР каїнатного підтипу знаходяться як на пересинаптичній так і на постсинаптичній мембрані ентеральних нейронів і їх гальмівний вплив на ШСК залежить від функціонального стану нікотинних ацетилхолінових рецепторів.

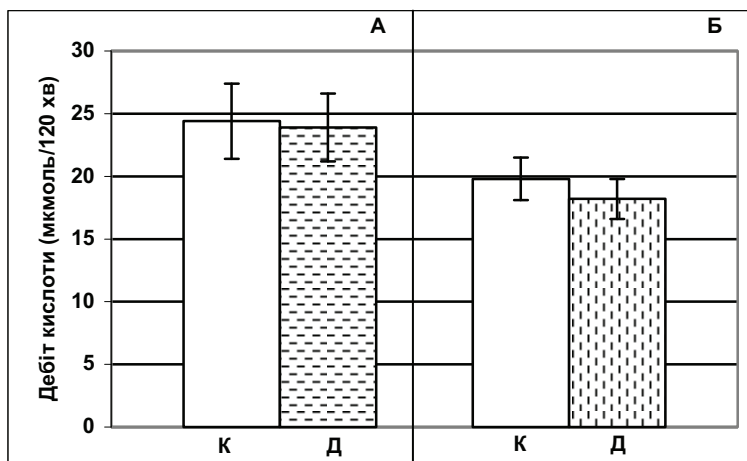


Рис. 3. Вплив GYKI-52466 (3 мг/кг, в/о) на базальну шлункову секрецію кислоти у щурів з інтактною нервовою системою (А) та після стовбурової ваготомії (Б), $M \pm m$

Примітка: К – контроль, Д – дослід.

Висновки. Одержані дані свідчать, що як центральні, так і периферичні іГлуР АМПА- підтипу не залучені у реалізацію базальної ШСК. Центральні та периферичні іГлуР кайнатного типу справляють різнонаправлений вплив на базальну ШСК: центральні – стимулюють, а периферичні її гальмують. Гальмівний вплив на ШСК периферичних кайнатних іГлуР залежить від функціонального стану нікотинних ацетилхолінових рецепторів. Базальна ШСК приблизно на 50% є результатом збудження центральних іГлуР кайнатного типу ендogenousним глутаматом.

1. Chittajallu R., Vignes M., Dev K.K. et al. Regulation of glutamate release by presynaptic kainate receptors in the hippocampus // *Nature*. – 1996. – V. 379. – P. 78-81. 2. Dingledine R., Borges K., Bowie D., Traynelis S.F. The glutamate receptor ion channels // *Pharmacol. Rev.* – 1999. – P. 1-61. 3. Garcia-Zaragoza E., Barachiina M., Moreno L. et al. Role of central glutamate receptors, nitric oxide, soluble guanylyl cyclase in the inhibition by

endotoxin of rat gastric acid secretion // *Br. J. Pharmacol.* – 2000. – V. 130. – P. 1283-1288. 4. Ghosh M.N., Shild H.O. Continuous recording of acid gastric secretion in the rat // *Br. J. Pharmacol.* – 1958. – p. 13-14. 5. Gill S., Pulido O. Glutamate Receptors in Peripheral Tissues: Distribution and Implications for Toxicology. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 2005. – P. 3-24. 6. Jane D.E., Lodge D., Collingridge G.L. Kainate receptors: Pharmacology, function and therapeutic potential // *Neuropharmacol.* – 2009. – V. 56. – P. 90-113. 7. Namiki T., Egawa M., Tominaga S. et al. Effects of GABA and L-glutamate on the gastric acid secretion and gastric defensive mechanisms in rat lateral hypothalamus // *J. Auton. Nerv. Syst.* – 1993. – V. 44. – P. 217-223. 8. Tsai L.H., Tsai W., Wu J.Y. Effect of L-glutamic acid on acid secretion and immunohistochemical localization of glutamatergic neurons in the rat stomach // *J. Neurosci. Res.* – 1994. – V. 38. – P. 188-195. 9. Tsuchiya S., Horie S., Yano S. et al. Stimulatory effect of centrally injection kainite and N-methyl-D-aspartate on gastric acid secretion in anesthetized rats // *Brain res.* – 2001. – V. 914. – P. 115-122. 10. Watkins J.C., Jane D.E. The glutamate story // *Br. J. Pharmacol.* – 2006. – V. 147. – P. 100-108.

Надійшла до редколегії 27.01.10

УДК 612.825.1:[612.821.1-2]

С. Крижановський, канд. біол. наук,
С. Тукаєв, канд. біол. наук, І. Зима, канд. біол. наук

ЕЕГ-ХАРАКТЕРИСТИКИ МНЕСТИЧНОЇ ДІЯЛЬНОСТІ У ЛЮДЕЙ З РІЗНОЮ ЧАСТОТОЮ СЕРЦЕВИХ СКОРОЧЕНЬ

В даному дослідженні проведено аналіз ЕЕГ-характеристик мнемонічної діяльності у людей з різною вихідною частотою серцевих скорочень. Показано, що для осіб з вищою частотою серцевих скорочень характерна більш генералізована експресія високочастотних діапазонів ЕЕГ. Виявлені відмінності зникають при підвищенні складності завдання.

In this research we compare EEG-characteristics of mnemonic brain activity among people with different heart rate. People with a higher heart rate had more generalized expression of high-frequency EEG-band. This difference disappeared in experiments with the more complicated tasks.

Вступ. Вивчення електрофізіологічних корелятивів когнітивної діяльності на сьогодні є однією з пріоритетних задач психофізіологічних досліджень. Особливості розподілу фізіологічних ресурсів організму в часі звичайно оцінюють за рядом характеристик, серед яких найбільш вживаними є гемодинамічні показники, ЕКГ, КГР та ЕЕГ. При цьому застосування вегетативних характеристик обумовлено в першу чергу їх прямим зв'язком із регуляторними компонентами психоемоційного напруження [1]. Завдяки цьому виникає можливість відстежування важливих характеристик функціонального стану організму за допомогою простих методів, доступних у широкому спектрі експериментальних умов. Наприклад, з розвитком

вегетативних зсувів пов'язаний стан тривожності, обумовлений зростанням активності симпатно-адреналової системи [2]. При будь-якому стресі психовегетативний синдром є обов'язковим фізіологічним компонентом, що може набувати навіть патологічного характеру при надмірній інтенсивності або тривалих афективних впливах. Показано, що тривале психоемоційне напруження вибірково пошкоджує функцію направленої уваги, в основі чого лежить пошкодження функціональних взаємозв'язків в межах фронто-парієтальної системи [5]. Тому контроль рівня психоемоційного напруження людини набуває особливого значення для ситуацій, пов'язаних із значними або тривалими навантаженнями.

© Крижановський С., Тукаєв С., Зима І., 2010

Відомо, що існує обмежена кількість стратегій адаптації до зовнішніх впливів та різних функціональних навантажень, які можуть бути прогнозовані за допомогою вегетативних показників [1]. Тому, на основі врахування комплексу фізіологічних характеристик таких стратегій, існує можливість визначення специфічних змін функціонального стану людини при переході від адекватної пристосувальної діяльності до дезадаптаційних реакцій. Враховуючи наявність зв'язку між вегетативними реакціями та мотиваційно-емоційним забезпеченням поведінки людини, можна припустити існування кореляцій між вихідним станом вегетативних функцій та особливостями активності ЦНС за умов когнітивної діяльності.

Метою роботи було виявлення за допомогою спектральних характеристик ЕЕГ стратегій адаптації мозку до когнітивних навантажень різного ступеня складності у осіб з різним вихідним рівнем частоти серцевих скорочень.

Об'єкт та методи дослідження. У дослідженні як обстежувані брали участь 62 добровольці – студенти Київського національного університету імені Тараса Шевченка віком від 18 до 22 років, обох статей, практично здорові. Під час обстеження вони перебували у затемненій звукоізолюваній камері у кріслі, в зручному положенні напівлежачи із заплющеними очима. На початку роботи протягом трьох хвилин записували ЕЕГ обстежуваних у вихідному стані спокою. Далі давалася інструкція: "Ви маєте запам'ятовувати продиктовані слова і повторювати їх вголос після відповідної команди", після чого починалося тестування. Усі використані в тесті слова мали малу кількість складів (два або три), були іменниками у називному відмінку однини. Використовували набори слів трьох різних типів: конкретні поняття, абстрактні поняття та цифри. З кожним типом слів тест повторювався тричі, причому різні варіанти завдань чергувались між собою з метою рандомізації стимульного матеріалу. В окремій пробі пред'являлось 10 однотипних слів у темпі 1 слово за 2 с, слова в різних пробах не повторювались. Проба складалася з послідовних етапів: запам'ятовування слів (20 с), утримання слів у пам'яті (20 с), повторення слів, що вдалося запам'ятати (7-15 с). Між окремими виконаннями тесту робилася пауза тривалістю 20 с. Під час повторення обстежуваним слів ЕЕГ не записували через численні артефакти, на всіх інших етапах реєстрували ЕЕГ у вигляді окремих 20-секундних проб.

Реєстрацію та первинний аналіз ЕЕГ та ЕКГ проводили за допомогою електроенцефалографічного комплексу "Нейроком" ("ХАІ-медика", Харків, Україна). У відповідності до міжнародної системи 10/20 % накладалися 19 електродів (Fp1, Fp2, F3, F4, Fz, F7, F8, C3, C4, Cz, P3, P4, Pz, T3, T4, T5, T6, O1, O2). У якості референтного використовувався об'єднаний вушний електрод. Частота дискретизації сигналу становила 500 Гц, міжелектродний опір був менше 5 кОм. Аналізу підлягали окремі фрагменти запису ЕЕГ та ЕКГ тривалістю 17-20 с, які не містили артефактів. За допомогою швидкого перетворення Фур'є здійснювали аналіз спектральної потужності (СП, мкВ^2) ЕЕГ у діапазоні частот 0,5-250 Гц. Розраховували СП у діапазонах θ_1 (4-6 Гц), θ_2 (6-7,5 Гц), α_1 (7,5-9,5 Гц), α_2 (9,5-11 Гц), α_3 (11-13 Гц), β_1

(13-20 Гц), β_2 (20-35 Гц) та γ (35-250 Гц). Аналіз ЕКГ полягав у визначенні частоти серцевих скорочень (ЧСС) для кожного окремого етапу обстеження. Значення ЧСС та СП кожного з діапазонів ЕЕГ усереднювали для однотипних 20-секундних реалізацій. Результати усереднень підлягали статистичному порівнянню з використанням рангового критерію Вілкоксона в межах однієї вибірки та критерію Манна-Уїтні для незалежних вибірок. Як значущі розглядали відмінності, для яких $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Опитування обстежуваних після проходження всіх тестів показало, що суб'єктивна складність завдань залежала від запропонованого типу слів. Найлегше учасникам дослідження було запам'ятовувати слова, що позначали конкретні поняття. Для таких завдань більшість обстежуваних комбінувала мнемонічні техніки, одночасно уявляючи зорові зображення для названих слів та повторюючи їх про себе (внутрішня мова). Другим за складністю було названо тест із абстрактними поняттями, для запам'ятовування яких використовували майже виключно внутрішню мову. І нарешті проби, в яких пред'являлися набори цифр, виявилися суб'єктивно найскладнішими. У цьому випадку одні обстежувані уявляли зорові образи, інші застосовували проговорення, однак лише 10 з 62 індивідів поєднували ці підходи.

Співставлення усереднених результатів виконання проб різних типів повністю співпало із самозвітами обстежуваних. Так, при пред'явленні конкретних понять медіанне значення кількості правильно відтворених слів становило 6,5 (квартілі 6 та 7), а абстрактних – 4,3 (4; 5). Медіана кількості правильно відтворених цифр дорівнювала 3,4 (2,4; 4,6). Було встановлено, що кількість запам'ятовуваних слів для кожного з типів значущо відрізнялась від двох інших ($p < 0,01$). Отже, всі наведені дані вказують на те, що складність проб зі словами різних типів була неоднаковою і зростала в ряді конкретні поняття – абстрактні поняття – цифри. Виходячи з цього, при подальшому аналізі враховувався фактор складності завдання, який міг впливати на ступінь напруження обстежуваних, а отже – на функціональний стан їх ЦНС та автономних вегетативних систем.

Значення ЧСС у стані спокою для проаналізованої вибірки варіювали від 59 до 104 ударів/хв, а медіана даного показника становила 76 ударів/хв (Рис. 1, Ф). Для того, щоб проаналізувати характер мозкової активності у осіб з різним вихідним тонусом вегетативних систем, було вирішено розділити обстежуваних на дві групи, виходячи з виявлених характеристик розподілу ЧСС. До першої групи увійшли індивіди з умовно низьким вихідним рівнем ЧСС, для яких він становив менше 76 ударів/хв ($n=33$), а всі інші були об'єднані у групу з умовно високим вихідним рівнем ЧСС ($n=29$). Одразу зазначимо, що між представниками обох груп не було виявлено відмінностей за результативністю запам'ятовування слів різних типів. Однак подібні результати можуть досягатись як за допомогою аналогічних, так і дещо відмінних адаптаційних механізмів. У зв'язку з цим в отриманих таким чином групах було проведено співставлення електрофізіологічних характеристик на всіх етапах виконання мнемонічного тесту.

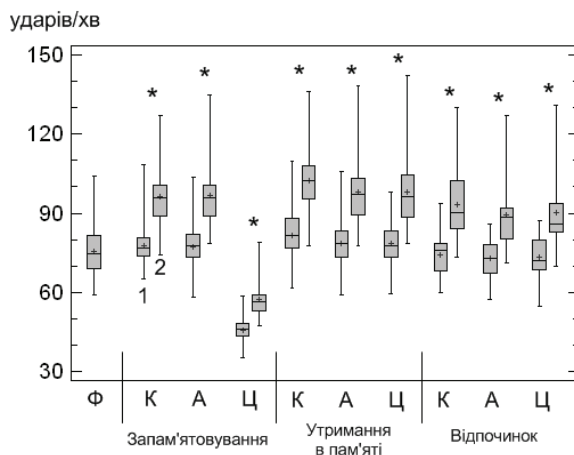


Рис. 1. Частота серцевих скорочень у вихідному стані спокою у загальній вибірці та на різних етапах виконання мнемонічного тесту у групах з низьким (n=33) та високим (n=29) вихідним рівнем ЧСС

Примітки: 1, 2 – групи з низьким та високим вихідним рівнем ЧСС відповідно; Ф – вихідний фон, К, А, Ц – проби з конкретними, абстрактними поняттями та цифрами; * – значущі відмінності між групами ($p < 0,01$).

Як видно з Рисунку 1, протягом всього періоду активної когнітивної діяльності у другій групі ЧСС залишалась значущо вищою, ніж у першій, тобто специфіка вегетативного контролю проявлялась у обстежуваних незалежно від того, який тип діяльності вони виконували – запам'ятовували нову інформацію, утримували її у пам'яті чи очікували нового завдання. Аналогічним чином, семантична складова стимульного матеріалу також не впливала на міжгрупову різницю у рівні ЧСС (Рис. 1, К, А, Ц). Найбільш яскраво цей факт ілюструють результати, отримані при запам'ятовуванні цифр: можна побачити, що в цей час в обох групах реєструвались найнижчі за весь час дослідження значення ЧСС, однак співвідношення даного показника у представників різних груп залишалось незмінним (Рис. 1, Ц). Зауважимо, що цей тип завдання виявився найскладнішим, оскільки, як уже було вказано вище, результати його виконання були значущо меншими, ніж число Мюллера та результати інших проб. При цьому між представниками різних груп не було знайдено жодних значущих відмінностей за результативністю виконання мнемонічних тестів. Отже, незалежно від динаміки функціонального стану обстежуваних та характеру інформації, яку вони обробляли, ЧСС залишалась значущо вищою у представників другої групи. Виходячи з цього, можна стверджувати, що застосо-

ваний нами критерій дозволив виявити типологічні, а не реактивні, характеристики стану людини.

Необхідно зазначити, що виражені зв'язки між показниками серцевої діяльності та фоновими значеннями потужності компонентів ЕЕГ-спектру нехарактерні для норми [6]. Тому аналіз специфіки адаптації мозку до нової діяльності було проведено з використанням реактивних ЕЕГ-показників, для чого перевірялась значущість їх змін при переході до нових експериментальних умов. Результати такого співставлення представлені на Рис. 2. Виявилось, що переважна більшість реакцій була ідентичною в обох групах. Так, найбільш характерною та стабільною особливістю виявилось зниження потужності α_1 - та α_2 -піддіапазонів ЕЕГ при переході до запам'ятовування слів різних типів. Однак у представників першої групи, що мали нижчі значення ЧСС, ці зміни носили генералізований характер, тоді як в другій групі вони обмежувались скроневими та тім'яно-потиличними ділянками кори. Тобто було встановлено, що реакція депресії низькочастотних компонентів α -діапазону у фронтальних зонах неокортексу більш характерна для індивідів з нижчою фоновією ЧСС. Зауважимо, що існують дані про зв'язок змін низькочастотного α -діапазону та функції уваги при виконанні завдань на запам'ятовування вербальної інформації [4].

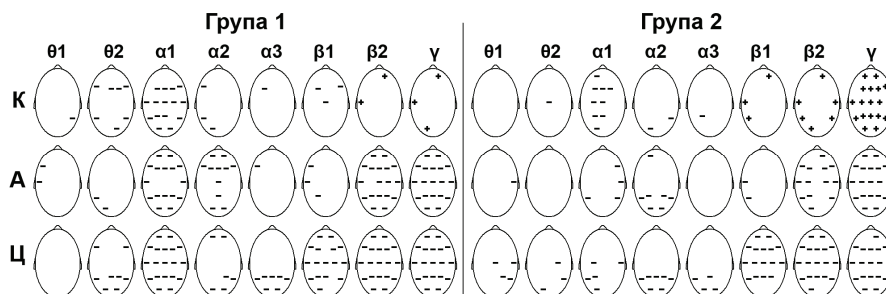


Рис.2. Зміни СП діапазонів ЕЕГ у групах низьким (група 1, n=33) та високим (група 2, n=29) вихідним рівнем ЧСС під час запам'ятовування конкретних (К), абстрактних (А) понять та цифр (Ц) (показано лише значущі зниження (-) та зростання (+) СП ($p < 0,05$))

Найбільші міжгрупові відмінності було виявлено для проб із запам'ятовування конкретних понять, тобто при виконанні найлегшого завдання (Рис. 2, К). Полягали вони в тому, що у осіб з високим вихідним рівнем

ЧСС реєструвалась експресія високочастотних компонентів спектру, якої не спостерігалось у представників першої групи. Як показано на рисунку, в обох групах реєструвалась депресія потужності α_1 -діапазону. У гру-

пі 1 також знижувалась потужність θ 2-діапазону у фронтальних та задньоскроневих ділянках, і відбувалось локальне збільшення СП β 2- та γ -діапазонів у відведеннях Т3 та Fr2. Картина змін у групі 2 помітно відрізнялась: були відсутні зміни у θ 2-діапазоні, тоді як у γ -діапазоні розвивалась генералізована синхронізація, до якої додавалась локальна експресія β -активності у скроневих відділах.

Таким чином, незважаючи на відсутність значущих міжгрупових відмінностей динаміки ЧСС, дані ЕЕГ-аналізу дозволяють зробити висновок про певні відмінності у типах адаптації обстежуваних до функціонального навантаження. Особи з нижчим рівнем ЧСС демонструють більш виражену специфічну для мнемонічної діяльності [4] депресію низькочастотних ЕЕГ-компонентів, тоді як у групі з високою ЧСС характерною особливістю була генералізована експресія γ -діапазону. На сьогоднішній день домінує думка про важливе значення низькоамплітудних γ -коливань у забезпеченні когнітивних процесів в цілому, і зокрема – у створенні внутрішніх образів [7]. Отже, отримані нами дані показали, що ідентичних результатів при запам'ятовуванні конкретних понять обстежувані досягали дещо різними шляхами. Хоча рівень загальної активності у них був приблизно однаковим, на що вказує подібність у динаміці ЧСС, представники першої групи, можливо, демонстрували підвищений рівень уваги – саме так оцінюють функціональне значення депресії низькочастотних ЕЕГ-складових за подібних умов [4]. В той же час у другій групі більш характерним могло бути використання внутрішніх образів при запам'ятовуванні нової інформації.

Наведені результати дозволяють констатувати, що фонові частоти серцевих скорочень, яка розглядалась нами як показник стану вегетативних регуляторних систем, напряду не впливала на ефективність виконання обстежуваними тестових завдань. Проте вдалося з'ясувати, що подібних результатів особи з різними вихідними значеннями ЧСС досягали неоднаковими шляхами. Якщо обстежувані з низькою ЧСС демонстрували при навантаженні динаміку ЕЕГ-показників, специфічну для процесів зосередження та уваги, то у їх товаришів реєструвались зміни, характерні для загальної активації та значного напруження [3]. Причому не можна сказати,

що якийсь з цих підходів був менш вигідним, оскільки в обох випадках результати виконання і простих, і складних завдань не відрізнялись. Відомо, що чим більш складним є пред'явлене завдання, тим більшого активізаційного забезпечення воно потребує [1, 3]. Відповідно до цього, можна припустити, що для осіб, які демонстрували в наших обстеженнях експресію високочастотних ЕЕГ-компонентів, запропоновані завдання були суб'єктивно важчими, що й обумовило характер їх реакцій. А оскільки така стратегія є більш вимогливою до фізіологічних ресурсів організму, не виключено, що при тривалому виконанні подібних навантажень працездатність у таких індивідів буде знижуватись швидше. Така інформація може бути використана при врахуванні індивідуально-типологічних особливостей індивіда для планування режиму його роботи.

Висновки: 1. Результативність виконання мнемонічного тесту не пов'язана з вихідною частотою серцевих скорочень людини. 2. Індивідуальні особливості мозкового забезпечення процесів запам'ятовування проявляються за умов середньої складності завдання, і нівелюються при її зростанні. 3. Стратегія адаптації людини до когнітивної діяльності пов'язана з індивідуальними особливостями тону вегетативних систем. Вищі значення частоти серцевих скорочень корелюють з більш генералізованим зростанням вираженості β - та γ -діапазонів ЕЕГ.

1. Сандомирский М. Е. Состояние психической адаптации в условиях хронического психоэмоционального стресса в связи с личностно-типологическими характеристиками: автореф. дис. канд. мед. наук. – Оренбург, 2001. 2. Boyer P. Do anxiety and depression have a common pathophysiological mechanism? / Acta Psychiatr. Scand. Suppl. – 2000. – Vol. 102, № 406. – P. 24-29. 3. Buzsáki G. Rhythms of the brain. / Buzsáki G. – New York: Oxford University Press, Inc., 2006. 4. Klimesch W. EEG alpha and theta oscillations reflect cognitive and memory performance: a review and analysis / Klimesch W. // Brain Research Reviews, 1999. – Vol. 29. – P. 165-195. 5. Liston C., McEwen B. S., Casey B. J. Psychosocial stress reversibly disrupts prefrontal processing and attentional control // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2009. – Vol. 106, № 3. – P. 912-917. 6. Y. Tang, Y. Ma, Y. Fan et. al. Central and autonomic nervous system interaction is altered by short-term meditation // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2009. – Vol. 106, № 22. – P. 8865-8870. 7. Думенко В. Н. Гамма-частоты ЭЭГ в предстимульные периоды при формировании когнитивной установки на лицевую экспрессию // Журн. высш. нервн. деят. – 2008. – Т. 58, № 1. – С. 5-11.

Найшло до редколегії 26.01.10

УДК 612.82/.83; 612.821

Н. Філімонова, канд. фіз.-мат. наук,
М. Макачук, д-р біол. наук, О. Сидько, студ.

ЕЛЕКТРИЧНА АКТИВНІСТЬ КОРИ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЛЮДИНИ ПРИ ТЕСТУВАННІ ОПЕРАТИВНОЇ ПАМ'ЯТІ

В результаті аналізу ЕЕГ в 16 відведеннях в дельта-, тета-, альфа-, бета1-, та бета2-діапазонах було виявлено, що характер матеріалу, який запам'ятовується, специфічно впливає на електричну активність кори головного мозку. При цьому такий вплив у всіх досліджених діапазонах ЕЕГ є більш виражений в лівій півкулі. Зокрема в дельта- і тета-діапазоні така активність в лівій півкулі кори головного мозку при запам'ятовуванні геометричних фігур була більш вираженою, ніж при запам'ятовуванні літер та цифр. Це може свідчити про те, що функціональна система, що визначає запам'ятовування геометричних фігур є більш широкою, ніж функціональна система, що визначає запам'ятовування літер і цифр.

As a result of analysis of the EEG in 16 leads in delta-, theta-, alpha-, beta1- and beta2- frequency bands, it has been revealed, that character of a stuff which is remembered, it has the specific influence on the electrical activity of the cerebral cortex. Thus such influence in all frequency bands of the EEG is more expressed in the left hemisphere. In particular in delta- and theta-frequency bands such activity in the left hemisphere of a brain at the memorization of geometrical figures was more, than at the memorization of letters and figures. It can evidence that functional system which determines the memorization of geometrical figures wider, than functional system which determines the memorization of letters and figures.

Вступ. Оперативна пам'ять людини має складну структуру і є надзвичайно важливою для здійснення когнітивних функцій. В сучасному динамічному та інформаційно насиченому світі навантаження на психіку людини зростає, і на передній план виходять невралгічні та психічні хвороби такі, як хвороба Альцгеймера,

епілепсія, порушення мозкового кровообігу, шизофренія, депресії. Провідним проявом цих хвороб є порушення пам'яті [1]. Крім того, порушення пам'яті відбуваються і при різних когнітивних розладах у хворих літнього та похилого віку. Оскільки за даними ВОЗ та провідних спеціалістів інституту старіння США за останній

час у світі збільшується абсолютна кількість літніх людей, зростають і соціальні проблеми, які пов'язані з руйнуванням інтелекту, психічними патологіями, які супроводжуються порушеннями різних сторін пізнавальної діяльності, поведінки та соціальної адаптації цих людей. Велику роль набувають методи діагностики когнітивних порушень, особливо пам'яті, на відносно ранніх стадіях захворювання. В зв'язку з цим важливим і актуальним є аналіз механізмів процесів сприйняття та наступної переробки інформації різної модальності. Метод електроенцефалографічного дослідження є неінвазивним та відносно простим і недорогим, а аналіз електроенцефалограми (ЕЕГ) при певних когнітивних навантаженнях дає можливість отримати кількісні оцінки активності відповідних зон кори головного мозку, які залучені до виконання певної діяльності. Метою роботи було встановити як короткочасне запам'ятовування геометричних фігур, літер та цифр впливає на електричну активність мозку людини.

Об'єкт та методи досліджень. В дослідженні як обстежувані взяли участь 10 осіб (3 чоловіка та 7 жінок, правші, віком 21 ± 1 рік), студенти 3-5 курсів Київського національного університету. Впродовж дослідження кожний обстежуваний послідовно проходив 3 комп'ютерні субтести оцінки розвитку короткочасної пам'яті. В першому субтесті оцінювалась оперативна пам'ять на прості геометричні фігури: круг, еліпс, квадрат, ромб, та інш.. Обстежуваному для запам'ятовування пред'являлась деяка множина простих геометричних фігур, кількість яких у цій множині послідовно зростала від 2 до 7. Кожна множина фігур у субтесті повторювалась по 10 разів з випадковою комбінацією різних фігур. Час експозиції кожної множини фігур складав 1.5 с, після чого фігури згасали, а через 1 с з'являлась тестова фігура стосовно якої необхідно було відповісти, чи була вказана фігура в попередній множині, для чого треба було правою рукою натиснути клавішу "/", чи її там не було – для чого треба було натиснути лівою рукою клавішу "z". Всі інші субтести організовані за аналогічною схемою. В другому субтесті оцінювали оперативну пам'ять на літери, а в третьому субтесті – на цифри. В усіх субтестах реєстрували час реакції в мс з точністю до 10 мс, після чого обчислювався середній час реакції на певну кількість подразників в мс з точністю до 1 мс, крім того, фіксувалась правильність/ помилковість відповіді [2]. В усіх обстежуваних реєстрували електроенцефалограму (ЕЕГ) до початку обстеження (3 хв. фоновий запис, проба з заплющеними та відкритими очима) та під час проведення тестування. Для реєстрації та аналізу ЕЕГ використовували комплекс "Нейрон-Спектр-4/ВП" (ЕС-сертифікат № RQ043131-V від 08.11.2004р.). Обстежувані знаходились в звукоізолюваному приміщенні, з ними підтримувався аудіо-зв'язок. Запис ЕЕГ здійснювався монополярно, референтний електрод було розташовано на мочці вуха з кожної сторони, частота квантування ЕЕГ дорівнювала 200 Гц. Було використано чашечкові посріблені електроди, які накладались за міжнародною системою 10-20 у 16 стандартних відведеннях Fp1, Fp2, F3, F4, F7, F8, C3, C4, T3, T4, T5, T6, P3, P4, O1, O2. В кожному відведенні для частотних діапазонів ЕЕГ – дельта (0,5-3,9 Гц), тета (4,0-7,9 Гц), альфа (8,0-12,9 Гц), бета1 (13,0-19,9 Гц), бета2 (20,0-35,5 Гц) за допомогою програми "Нейрон-Спектр" обчислювались наступні показники:

максимальна амплітуда спектру у відведенні – А максимальна, мкВ/с;

максимальна потужність спектру у відведенні – S максимальна, мкВ²/с²;

середня амплітуда спектру у відведенні – А середня, мкВ/с;

середня потужність спектру у відведенні – S середня, мкВ²/с²;

повна амплітуда спектру у відведенні – А повна, мкВ/с;

повна потужність спектру у відведенні – S повна, мкВ²/с²;

домінуюча частота спектру у відведенні – F домінуюча, Гц;

середня частота спектру у відведенні – F середня, Гц;

відношення повної потужності спектру в даному частотному діапазоні до повної потужності спектру в даному відведенні – індекс ритму, %.

Статистичний аналіз даних проводили за допомогою пакету STATISTICA 6.0 (StatSoft, USA, 2001). Нормальність розподілів змінних перевірялась тестом Шапіро-Вілка. Оскільки всі субтести проходили одні і ті ж самі обстежувані в різні моменти часу, а розподіл практично всіх параметрів за критерієм Шапіро-Вілка був відмінний від нормального, тому для множинного порівняння груп було використано критерій Фрідмана, який є непараметричним аналогом дисперсійного аналізу повторних вимірювань. Парні порівняння проводились за допомогою критерію Вілкоксона. Критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез приймався рівним $p=0,05$. Зважаючи на те, що переважна більшість параметрів мала розподіл відмінний від нормального, для опису вибіркового розподілу вказували медіану (M_e) і нижній (25%) та верхній (75%) квартилі [3].

Результати та їх обговорення. Проведений аналіз отриманих даних загалом показав, що, не зважаючи на те, що при всіх типах стимулів включалися механізми оперативної пам'яті, характер стимулів, що запам'ятовувалися, супроводжувався не однаковим патерном електричної активності головного мозку. Тому можна думати, що характер матеріалу, що запам'ятовується, обробляється не зовсім однаково. Застосовуючи критерій Фрідмана до порівняння показників ЕЕГ кожного з обстежуваних при тестуванні оперативної пам'яті на геометричні фігури, літери та цифри (Табл.1). Найбільші відмінності при запам'ятовуванні геометричних фігур, літер та цифр було виявлено в префронтальній зоні (відведення Fp1, Fp2), особливо в лівій півкулі і в правій потиличній зоні (відведення O2). При цьому в дельта-діапазоні зменшена активність в префронтальній зоні спостерігалась при запам'ятовуванні геометричних фігур порівняно з літерами та цифрами, у той час, як в правій потиличній зоні максимальна амплітуда навпаки, була підвищена (Табл.1). В альфа-діапазоні в префронтальній зоні (відведення Fp1, Fp2) підвищена активність виявлена при запам'ятовуванні літер, в той час, як в відведеннях F3, F4 ця активність була нижчою, ніж при запам'ятовуванні геометричних фігур та цифр. В правій потиличній зоні (відведення O2) меншою була активність при запам'ятовуванні геометричних фігур, але вона була підвищена в правій лобній зоні (відведення F4). В бета1-діапазоні в лівій префронтальній зоні та в правій потиличній зонах зменшена активність спостерігалась при запам'ятовуванні геометричних фігур. В бета2-діапазоні значущий вплив стимулу спостерігався в потиличній зоні, причому він був більш виражений в правій півкулі і індекс ритму був менший при запам'ятовуванні геометричних фігур.

Згідно [1], за оперативну пам'ять відповідає в основному префронтальна кора, оскільки вона має найбільш розгалужену мережу провідних шляхів, які пов'язують її з багатьма відділами мозку. Саме вона забезпечує координацію та інтеграцію інших відділів мозку. Однак

різний тип стимулів для запам'ятовування викликає потребу в різних функціональних системах, які враховують специфічність стимулів. Виходячи з результатів рангового дисперсійного аналізу можна відмітити, що більший вплив типу стимулу виявлено саме в лівій півкулі, крім потиличної зони, де більший вплив спостерігався в правій півкулі (Табл.1).

Так, в тета-діапазоні в лівій лобовій зоні (відведення F7), в лівій тім'яній зоні (відведення T5, P3) та в правій потиличній (відведення O2) активність була вищою при запам'ятовуванні геометричних фігур. Оскільки низькочастотні ритми тета- та дельта-діапазонів полегшують взаємодію нейронних мереж, які залучені до процесів оперативної пам'яті та фокусування уваги на інформації, яка отримується з пам'яті [4-6], можна зазначити, що геометричні фігури є найбільш складним стимулом для запам'ятовування. Запам'ятовування геометричних фігур та формування вербалізованої відповіді про наявність/відсутності фігури в пред'явленому списку потребує активації більш широкої функціональної системи, яка забезпечує не тільки сприйняття та збереження інформації про геометричні фігури (що за літературними даними більш локалізовано в правій півкулі), але і міжпівкульну передачу інформації для прийняття рішення в задачах виявлення та розпізнавання стимулу, що пов'язано більше з роботою структур лівої префронтальної зони кори.

Раніше вважали, що альфа-ритм характеризує мозкову бездіяльність, однак експериментальні дослідження показали, що потужність ЕЕГ в альфа-діапазоні підвищується при збільшенні кількості літер, які пред'являються для запам'ятовування [9]. Існує дві альтернативні гіпотези стосовно пояснення активності в альфа-діапазоні. Перша гіпотеза припускає існування механізмів,

згідно яких коливання в альфа-діапазоні безпосередньо задіяні в процесах пам'яті [10]. Згідно другої гіпотези, збільшення активності в альфа-діапазоні є наслідком активного блокування тих областей мозку, які таку активність генерують [9]. При цьому інформаційні потоки перенаправляються, певні зони мозку вилучаються з такого потоку, а більш потужна концентрація уваги відбувається саме в тих зонах, які спеціалізуються на переробки інформації певної модальності.

В наших дослідженнях ми також виявили відмінності в альфа-діапазоні при запам'ятовуванні стимулів різного типу. Найбільш вираженим він був в префронтальній та лобній зонах при пред'явленні літер порівняно з цифрами та геометричними фігурами. При цьому в префронтальній зоні активність була підвищеною, а в лівій лобній – зниженою. Виходячи з гіпотези активного блокування, можна припустити, що вербальний потік перенаправляється з префронтальної зони в лобну, що можливо пов'язано з активацією переднього відділу мовної кори – зони Брока. При запам'ятовуванні геометричних фігур вищою була активність в правій лобовій зоні, а зниженою – правій потиличній, що можливо свідчить про перенаправлення образної інформації в праву зорову кору.

Активність в бета-діапазоні збільшується в ситуаціях уваги, активній розумовій роботі, при поданні нового стимулу. Оскільки скроневий бета-ритм часто буває результатом м'язового артефакту, звернемо увагу на вплив стимулу в даному діапазоні в лівій префронтальній зоні (відведення Fp1) та в тім'яній та потиличних зонах (відведення T6, P3, P4, O1, O2). В лівій префронтальній зоні підвищена активність спостерігалась при запам'ятовуванні геометричних фігур, в той час, як в тім'яній – літер та цифр, а потиличній (як лівій, так і правій) – цифр.

Таблиця 1. Значущі відмінності в показниках ЕЕГ за критерієм Фрідмана при дослідженні оперативної пам'яті людини (n=10)

Діапазон	Відведення	Показник	Геометричні фігури	Літери	Цифри
ДЕЛЬТА	Fp1A1	A максимальна, мк/с	10,5 [9,8; 17,0]	12,0 [11,0; 15,0]	13,0 [12,0; 16,0]
		A середня, мк/с	4,7 [4,1; 6,0]	5,4 [5,0; 7,3]	5,3 [4,8; 6,0]
		S середня, мкВ2/ c2	34,5 [26,0; 65,0]	45,0 [39,0; 74,0]	45,0 [39,0; 62,0]
		A повна, мк/с	42,0 [37,0; 54,0]	47,5 [45,0; 66,0]	47,0 [43,0; 53,0]
	Fp2A2	Індекс ритму, %	69,0 [63,0; 84,0]	73,5 [70,0; 77,0]	75,0 [71,0; 81,0]
		A середня, мк/с	4,8 [4,4; 6,2]	5,2 [4,7; 6,7]	5,2 [4,8; 6,0]
		A повна, мк/с	42,0 [39,0; 55,0]	45,5 [42,0; 60,0]	46,5 [43,0; 54,0]
		F домінуюча, Гц	0,9 [0,8; 1,2]	0,8 [0,6; 0,9]	0,7 [0,5; 0,9]
	F3A1	F середня, Гц	1,2 [1,1; 1,3]	1,1 [0,9; 1,2]	1,0 [0,9; 1,2]
		Індекс ритму, %	62,0 [54,0; 67,0]	63,5 [57,0; 70,0]	64,5 [60,0; 70,0]
		A максимальна, мк/с	6,8 [5,8; 8,0]	6,1 [5,6; 6,7]	5,9 [4,9; 6,3]
		Індекс ритму, %	62,5 [61,0; 67,0]	69,0 [67,0; 76,0]	69,0 [65,0; 74,0]
ТЕТА	T3A1	A середня, мк/с	2,8 [2,6; 3,1]	2,9 [2,7; 3,6]	3,2 [2,8; 4,2]
		F домінуюча, Гц	1,2 [0,9; 1,6]	1,0 [0,6; 1,2]	0,8 [0,7; 1,4]
		F середня, Гц	1,3 [1,2; 1,6]	1,2 [0,9; 1,4]	1,2 [1,0; 1,6]
		F домінуюча, Гц	1,1 [0,8; 1,2]	0,9 [0,7; 0,9]	1,1 [0,7; 1,2]
	T5A1	F середня, Гц	1,3 [0,9; 1,5]	1,1 [0,9; 1,3]	1,2 [1,0; 1,4]
		A максимальна, мк/с	3,2 [2,8; 4,7]	3,0 [2,7; 3,8]	2,9 [2,6; 3,4]
		S максимальна, мкВ2/ c2	10,5 [8,2; 24,0]	9,5 [7,7; 15,0]	8,8 [7,5; 12,0]
		S повна, мкВ2/ c2	35,0 [28,0; 88,0]	29,0 [25,0; 45,0]	28,5 [23,0; 39,0]
	O2A2	A середня, мк/с	1,5 [1,3; 1,7]	1,3 [1,1; 1,6]	1,3 [1,1; 1,6]
		S середня, мкВ2/ c2	2,9 [2,2; 3,8]	2,1 [1,7; 3,2]	2,2 [1,4; 3,2]
		A повна, мк/с	14,0 [12,0; 17,0]	12,0 [11,0; 16,0]	12,5 [10,0; 15,0]
		S повна, мкВ2/ c2	28,0 [21,0; 38,0]	20,0 [16,0; 32,0]	21,5 [14,0; 32,0]
	F7A1	Індекс ритму, %	14,0 [13,0; 18,0]	12,0 [11,0; 13,0]	13,0 [11,0; 14,0]
		A максимальна, мк/с	2,5 [2,3; 2,8]	2,2 [2,1; 2,3]	2,3 [2,2; 2,8]
		S максимальна, мкВ2/ c2	6,6 [5,5; 8,7]	5,2 [4,9; 5,7]	5,8 [4,9; 8,3]
		A середня, мк/с	1,2 [1,1; 1,3]	1,1 [1,1; 1,1]	1,2 [1,1; 1,3]
	T5A1	S середня, мкВ2/ c2	2,1 [1,8; 2,3]	1,7 [1,6; 1,7]	1,8 [1,6; 2,4]
		A повна, мк/с	12,0 [11,0; 13,0]	11,0 [11,0; 11,0]	11,5 [10,0; 13,0]
		S повна, мкВ2/ c2	20,5 [17,0; 22,0]	16,0 [16,0; 17,0]	17,5 [15,0; 24,0]

Закінчення табл. 1

Діапазон	Відведення	Показник	Геометричні фігури	Літери	Цифри
АЛЬФА	Fp1A1	F домінуюча, Гц	9,2 [9,0; 9,3]	9,6 [9,2; 9,8]	9,2 [9,1; 9,2]
	Fp2A2	S максимальна, мкВ ² /с ²	5,5 [4,1; 7,7]	5,8 [5,1; 7,4]	5,7 [4,4; 6,5]
	F3A1	Індекс ритму, %	7,5 [7,0; 10,0]	7,0 [6,0; 10,0]	7,5 [6,0; 9,0]
	F4A2	A максимальна, мк/с	2,4 [2,0; 2,4]	2,0 [1,8; 2,4]	2,2 [1,9; 2,6]
		S максимальна, мкВ ² /с ²	6,0 [4,2; 6,3]	4,3 [3,2; 5,9]	5,0 [3,7; 7,0]
		S середня, мкВ ² /с ²	1,7 [1,2; 2,0]	1,3 [0,9; 1,9]	1,5 [1,1; 2,1]
		S повна, мкВ ² /с ²	21,5 [15,0; 26,0]	16,5 [12,0; 24,0]	18,0 [14,0; 27,0]
	O2A2	F домінуюча, Гц	9,7 [9,3; 10,1]	10,0 [9,6; 10,3]	10,3 [9,9; 10,5]
		F середня, Гц	10,0 [9,8; 10,1]	10,1 [9,8; 10,2]	10,3 [9,9; 10,4]
		F домінуюча, Гц	16,0 [15,3; 16,5]	15,5 [15,1; 16,4]	15,7 [14,9; 16,1]
БЕТА 1	Fp1A1	Індекс ритму, %	5,0 [5,0; 7,0]	5,0 [4,0; 6,0]	4,5 [4,0; 6,0]
	P3A1	F домінуюча, Гц	15,1 [14,8; 15,9]	15,3 [14,7; 15,8]	15,1 [14,6; 15,5]
	P4A2	Індекс ритму, %	5,5 [5,0; 7,0]	6,0 [6,0; 7,0]	6,5 [5,0; 10,0]
	O1A1	A максимальна, мк/с	1,8 [1,7; 2,3]	1,7 [1,3; 1,8]	2,0 [1,5; 2,5]
		S максимальна, мкВ ² /с ²	3,3 [2,9; 5,7]	2,8 [1,8; 3,9]	4,1 [2,4; 7,3]
		A середня, мк/с	0,8 [0,8; 1,1]	0,8 [0,6; 0,8]	0,9 [0,7; 1,1]
		S середня, мкВ ² /с ²	0,9 [0,8; 1,5]	0,8 [0,5; 1,0]	1,1 [0,6; 1,7]
		A повна	14,0 [13,0; 19,0]	13,5 [11,0; 14,0]	15,5 [12,0; 19,0]
		S повна, мкВ ² /с ²	16,0 [13,0; 27,0]	14,0 [9,1; 17,0]	19,5 [10,0; 31,0]
	O2A2	A максимальна, мк/с	1,9 [1,4; 1,9]	1,8 [1,4; 2,1]	2,1 [1,4; 2,5]
		F домінуюча, Гц	15,4 [15,1; 16,7]	15,8 [15,2; 16,1]	15,2 [14,8; 16,0]
		Індекс ритму, %	6,5 [5,0; 9,0]	8,0 [6,0; 10,0]	8,0 [7,0; 14,0]
	F8A2	F домінуюча, Гц	15,8 [15,4; 16,2]	15,6 [15,4; 15,8]	16,2 [15,6; 16,9]
	T3A1	Індекс ритму, %	6,0 [4,0; 9,0]	6,0 [4,0; 8,0]	6,5 [3,0; 7,0]
	T4A2	S повна, мкВ ² /с ²	10,5 [8,3; 13,0]	11,5 [8,5; 13,0]	11,0 [9,1; 11,0]
	T6A2	S максимальна, мкВ ² /с ²	1,9 [1,7; 2,1]	2,1 [1,6; 2,4]	2,0 [1,6; 2,0]
	O1A1	A максимальна, мк/с	1,7 [1,3; 2,2]	1,6 [1,4; 1,6]	1,8 [1,4; 2,0]
		S максимальна, мкВ ² /с ²	2,8 [1,7; 4,9]	2,5 [2,1; 2,7]	3,3 [1,9; 4,1]
		A середня, мк/с	0,6 [0,5; 0,7]	0,6 [0,5; 0,7]	0,7 [0,5; 0,7]
		S середня, мкВ ² /с ²	0,5 [0,3; 0,7]	0,5 [0,3; 0,6]	0,7 [0,4; 0,7]
БЕТА 2		A повна, мк/с	23,0 [18,0; 28,0]	23,0 [19,0; 25,0]	26,5 [20,0; 29,0]
		S повна, мкВ ² /с ²	20,0 [12,0; 29,0]	18,0 [13,0; 23,0]	25,5 [14,0; 28,0]
	O2A2	A середня, мк/с	0,5 [0,4; 0,6]	0,5 [0,5; 0,8]	0,6 [0,5; 0,7]
		F середня, Гц	24,4 [24,3; 25,3]	25,1 [24,4; 26,3]	24,9 [24,2; 25,6]
		Індекс ритму, %	6,0 [5,0; 12,0]	8,5 [7,0; 25,0]	9,5 [8,0; 12,0]
	T6A2	Індекс ритму, %	4,5 [4,0; 6,0]	6,0 [5,0; 7,0]	5,0 [4,0; 7,0]

Висновки. В результаті проведеного дослідження було виявлено, що характер матеріалу, який запам'ятовується, специфічно впливає на електричну активність кори головного мозку. При цьому такий вплив у всіх досліджених діапазонах ЕЕГ є більш виражений в лівій півкулі. Зокрема в дельта- і тета-діапазоні така активність в лівій півкулі кори головного мозку при запам'ятовуванням геометричних фігур була більш вираженою, ніж при запам'ятовуванні літер та цифр. Це може свідчити про те, що функціональна система, що визначає запам'ятовування геометричних фігур є більш широкою, ніж функціональна система, що визначає запам'ятовування літер і цифр.

1. Repovš G., Baddeley A. The multi-component model of working memory: Explorations in experimental cognitive psychology // *Neuroscience*. – 2006. – V. 139, Is. 1, 28 April – P. 5-21. 2. Філімонова Н.Б., Куценко Т.В., Макарчук М.Ю. Особливості обробки зорової вербальної та невербальної інформації в оперативній пам'яті людини // *Фізика живого*. – 2006. –

Т.14. – № 3. – С. 75 – 86. 3. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – М.: Медиа Сфера, 2002. – 312 с. 4. Basar E. Brain function and oscillations. II Integrative brain function. *Neurophysiology and cognitive processes*. – Berlin: Springer-Verlag, 1999. – 476 p. 5. Klimesch W. Memory processes, brain oscillations and EEG synchronization // *Intern. Psychophysiol.* – 1996. – V. 24. – P. 61-100. 6. Данилова Н.Н., Астафьев С.В. Внимания человека как специфическая связь ритмов ЭЭГ с волновыми модуляторами сердечного ритма // *ЖВНД*. – 2000. – Т. 50. – Вып. 5. – С. 791-804. 7. Suchan B., Yaguez L., Wunderlich G., Canavan A.G., Herzog H., Tellmann L., Homberg V., Seitz R.J. Hemispheric dissociation of visual-pattern processing and visual rotation // *Behav Brain Res*. – 2002, Nov 15. – V.136, Is.2. – P.533-44. 8. Lausberg H., Kita S., Zaidel E., Pitto A. Split-brain patients neglect left personal space during right-handed gestures // *Neuropsychologia*. Volume 41, Issue 10, 2003, P.1317-1329. 9. Jensen O., Gelfand J., Kounios J. and Lisman J. E. Oscillations in the Alpha Band (9–12 Hz) Increase with Memory Load during Retention in a Short-term Memory Task // *Cerebral Cortex*, Oxford University Press. – August 2002. – V. 12, No. 8. – P. 877-882. 10. Jensen O., Lisman J.E. An oscillatory short-term memory buffer model can account for data on the Sternberg task // *Neuroscience*. – 1998. – V. 18 – P. 10688-10699.

Надійшла до редколегії 04.02.10

УДК 577.151.042:616.379-008.64

Т. Галенова, асп., В. Конопельнюк, асп.,
Б. Цудзевич, д-р біол. наук

АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ У РІЗНИХ ТКАНИНАХ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2 ТИПУ

Досліджено активність супероксиддисмутази, каталази та глутатіонпероксидази у печінці, м'язовій та жировій тканинах щурів за умов експериментального цукрового діабету 2 типу.

The activities of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in liver, skeletal muscle and adipose tissue of rat with experimental type 2 diabetes mellitus were investigated.

Вступ. Загальновідомо, що будь-який адаптивний або патологічний процес перебігає на фоні утворення активних форм кисню (АФК) та інтенсифікації вільнора-

дикального окислення біосубстратів. Надмірна продукція АФК або порушення нормального функціонування систем антиоксидантного захисту викликають посилене

© Галенова Т., Конопельнюк В., Цудзевич Б., 2010

окислювальне ушкодження біомолекул, що призводить до розвитку окислювального стресу та дисфункції клітин і тканин організму [1]. Вважається, що посилення процесів перекисного окислення вказує на порушення захисно-приспосувальних реакцій організму на клітинному рівні та гомеостазу в цілому.

На сучасному етапі багатьма дослідниками окислювальний стрес розглядається як ключовий момент у патогенезі розвитку пізніх ускладнень цукрового діабету [2]. У хворих на цукровий діабет основним джерелом процесів вільнорадикальної активності є стан хронічної гіперглікемії [3]. Продукція вільних радикалів відбувається з перетворенням глюкози в енольну форму, активуванням обміну її сорбітоловим шляхом, а також шляхом неферментативного глікозилювання білків і утворення кінцевих похідних глікозилювання. Накопичення продуктів перекисного окислення в умовах гіперглікемії призводить до взаємодії глюкози з аміногрупами білків, підсиленню їх глікозилювання та окислення (аутооксидантне окислення) [4].

Метою нашої роботи було дослідити активність ферментів антиоксидантної системи у печінці, м'язовій та жировій тканинах щурів за умов експериментального цукрового діабету 2 типу.

Об'єкт і методи досліджень. Досліди проводили на білих нелінійних щурах обох статей масою 230-250 г. Експериментальний ЦД 2 типу (ЦД) викликали одноразовим внутрішньочеревним введенням новонародженим 1-2 добовим щурятм розчину стрептозотозину з розрахунку 80 мг на 1 кг маси тіла [5]. Контрольну групу складали щури, яким у тому ж віці внутрішньочеревно вводили 10 мМ цитратний буфер (pH=4,5), який використовували для розведення стрептозотозину. Розвиток діабету контролювали за рівнем глюкози, яку визначали за допомогою приладу "ГЛЮКОФОР-ІІ" (Україна) згідно інструкції. У досліді використовували тварин через 180 діб після введення стрептозотозину з рівнем глюкози в крові 8-14 ммоль.

Активність СОД (КФ 1.15.1.1.) визначали за методом Т.В.Сирото [6]. Принцип методу полягає у тому, що СОД інгібує аутоокислення адреналіну. За різницею швидкості реакції без додавання біологічного матеріалу та з його додаванням обчислюють активність ферменту. Каталазу активність (КФ 1.11.1.6) визначали як рекомендовано в роботі [7], що базується на здатності перекису водню утворювати із солями молібдену стійкий забарвлений комплекс. Активність глутатіонпероксидази (ГПО) (КФ 1.11.1.9) визначали за накопиченням окисленого глутатіону (GSSG) згідно методу [8].

Активність ферментів досліджували у постмітохондріальному гомогенаті печінки, м'язової та жирової тканин щурів. Активність ферментів перераховували

на мг білка, концентрацію якого визначали за методом Бредфорд [9].

Статистичний аналіз здійснювали за допомогою прикладних програм статистичного аналізу Microsoft Excel. Для оцінки міжгрупових відмінностей застосовували параметричний критерій Ст'юдента. Різницю між показниками вважали статистично значущою при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Останніми роками одержано експериментальне підтвердження важливої ролі активації ПОЛ у розвитку тканинної гіпоксії за умов різних патологій, зокрема при діабеті [10]. Стан оксидантного стресу виникає як через посилення утворення вільнорадикальних субстратів, так і внаслідок вичерпування механізмів антиоксидантного захисту. Відомо, що одним із важливих компонентів антирадикального й антиперекисного захисту є супероксиддисмутаза (СОД), що каталізує реакцію дисмутації O_2^- в H_2O_2 і каталаза, яка розщеплює H_2O_2 .

Дані досліджень СОД свідчать про зменшення її активності в м'язовій та жировій тканинах у групі тварин з експериментальним ЦД (табл.). Так, в м'язовій тканині ферментативна активність СОД знижувалася на 45%, а в жировій тканині на 30% порівняно з показниками контрольної групи щурів. При дослідженні цього фермента в печінці піддослідних тварин з моделлю ЦД нами було встановлено підвищення його активності на 47% порівняно з контролем.

Зміни активності каталази в різних тканинах щурів з експериментальним ЦД також мали різнонаправлений характер (табл.). Встановлено, підвищення активності цього фермента майже на 30% в печінці та зниження його активності в м'язовій та жировій тканинах відповідно на 24% і 44% порівняно з показниками контрольної групи тварин.

Важливу роль у забезпеченні стабільності структури та функції цитозольних та мембранних білків клітини належить глутатіон-залежній ланці антиоксидантного захисту. Відновлений глутатіон – трипептид з вільною сульфгідрильною групою, один із найбільш реакційноздатних антиоксидантів. З літературних джерел відомо, що розвиток ЦД супроводжується зниженням вмісту відновленого глутатіону [11]. Причина зменшення концентрації GSH може бути пов'язана не тільки з посиленням його використання, але і з недостатнім відновленням, тобто із зміною активності глутатіонпероксидази (ГПО) та глутатіонредуктази (ГР). Тому, нам було цікаво дослідити активність ГПО в різних тканинах щурів за умов експериментального ЦД.

Нами було встановлено зниження ферментативної активності ГПО у групі піддослідних тварин з ЦД в усіх досліджуваних тканинах. Так, у печінці активність ГПО знижувалася на 26%, у м'язовій тканині на 28%, а у жировій – на 40%.

Таблиця 1. Активність ферментів антиоксидантного захисту у різних тканинах щурів за умов експериментального ЦД 2 типу ($M \pm m$, $n=8$)

Тканина	Печінка		М'язова тканина		Жирова тканина	
	Контроль	Діабет	Контроль	Діабет	Контроль	Діабет
СОД, ум.од/мг*хв	5,5±0,8	8,1±1,2*	10,9±2,2	6,0±1,1*	40,4±5,0	27,9±3,9*
Катализа, мкМН ₂ O ₂ /мг*хв	389,7±35,8	499,8±79,1*	21,4±1,5	16,2±1,6*	107,0(11,5)	60,3(20,2)*
ГПО, мМ GSSG/мг*хв	35,3(4,2)	26,1(3,3)	26,8(1,9)	19,3(1,9)	20,7(3,3)	12,3(3,5)

* – $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою

Порівнюючи показники активності ферментів антиоксидантного захисту у групі контрольних тварин та щурів з моделлю ЦД можна зробити висновок, що різні тканини неоднаково реагують на стан оксидантного стресу, що невід'ємно супроводжує розвиток даної патології.

За умов експериментального ЦД основні ланки ферментативної антиоксидантної системи печінки (СОД та каталаза) реагують на надлишкову продукцію вільних радикалів зростанням ферментативної активності. Швидше за все це може бути обумовлено підвищенням синтезом ферментів, що відбувається завдяки вмиканню

ню адаптивно-компенсаторних механізмів захисту у відповідь на стан оксидантного стресу і направлено на підтримання фізіологічного гомеостазу.

У м'язовій та жировій тканинах навпаки відбувається виснаження запасів ферментів, що також витрачаються на нейтралізацію вільних радикалів. Оскільки м'язова та жирова тканини належать до інсулінчутливих тканин, за умов ЦД знижується швидкість фосфорилування глюкози в глюкозо-6-фосфат, і, як наслідок, зростає інтенсивність ліполізу, а отже і вміст вільних ненасичених жирних кислот, які здатні окислюватись шляхом пероксидації. Нагромадження в клітинах активних форм кисню при цукровому діабеті викликає окиснювальну модифікацію білків унаслідок окиснення залишків сірковмісних амінокислот і зміну координаційної геометрії металів в активних центрах [12]. Окрім того, відомо, що від умісту глюкози в крові залежить ступінь неферментативного глікозилювання білків, яке приводить до їхньої ковалентної модифікації і зміни структурно-функціональних особливостей [3]. Отже, зниження активності ферментів антиоксидантного захисту при діабеті можуть бути зумовлені модифікацією антиоксидантних ферментів як активним киснем, так і глюкозою.

Висновок. Таким чином, при експериментальному цукровому діабеті у щурів спостерігалось зниження активності ферментів антиоксидантного захисту – супероксиддисмутази, каталази та глутатіонпероксидази в м'язовій та жировій тканинах. Одночасно спостерігалось зростання активності каталази та СОД в клітинах печінки, що, очевидно, слід розглядати як компенсаторну реакцію у відповідь на надлишкову продукцію віль-

них радикалів та зниження активності антиоксидантних ферментів у інших тканинах.

1. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньшикова Е.Б. Окислительный стресс: биохимический и патофизиологический аспекты. – М.: Наука, 2001. – 343 с. 2. Baynes J.W., Thorpe S.R. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm // *Diabetes*. – 1999. – Vol. 48, № 1. – P. 1-9. 3. Ceriello A. Hyperglycemia: the bridge between non-enzymatic glycation and oxidative stress in the pathogenesis of diabetic complications // *Diabetes Nutr. Metab.* – 1999. Vol. 12, № 1. – P. 42-46. 4. King G.L., Loeken M.R. Hyperglycemia-induced oxidative stress in diabetic complications // *Histochem. Cell Biol.* – 2004. – Vol. 122, № 4. – P. 333-338. 5. Hemmings S.J., Spafford D. Neonatal STZ model of type II diabetes mellitus in the Fischer 344 rat: characteristics and assessment of the status of the hepatic adrenergic receptors // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2000. – Vol. 32. – P.905-919. 6. Сирото Т.В. Новый поход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использования его для измерения активности супероксиддисмутази // *Вопросы мед. клин.* – 1999. – № 3. 7. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токорев Е.В. Метод определения активности каталазы // *Лаб. дело.* – 1988. – № 1. – С. 44-67. 8. Власова С. Н., Шабунина Е.И., Персегина И. А. Активность глутатион-зависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей // *Лаб. дело.* – 1990. – № 8. – С. 19 – 22. 9. Bradford M.M. // *Analyt. Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248-254. 10. Moussa S.A. Oxidative stress in diabetes mellitus // *Romanian J. Biophys.* – 2008. – Vol. 18, № 3. – P. 225-236. 11. Dincer Y., Alademir Z., Ikova H., Akcay T. Susceptibility of glutathione and glutathione-related antioxidant activity to hydrogen peroxide in patients with type 2 diabetes: effect of glycemic control // *Clin. Biochem.* – 2002. – Vol. 35, № 4. – P. 297-301. 12. Дубинина Е.Е., Шугалай И.В. Окислительная модификация белков // *Успехи совр. биологии.* – 1993. – Т. 113, № 1. – С.71-81.

Надійшла до редколегії 01.03.10

УДК 612.3:616.33+612.337.1

І. Прибисько, інженер III кат., Т. Берегова, д-р біол. наук,
М. Харченко, канд. біол. наук

ВПЛИВ ПЕРЕРІЗКИ ПІЛОРИЧНОЇ ГІЛКИ ПЕРЕДНЬОГО СТОVBУРА БЛУКАЮЧИХ НЕРВІВ НА ЕВАКУАЦІЮ З ШЛУНКА ЇЖІ ВУГЛЕВОДНОГО СКЛАДУ ТА ВИЗНАЧЕННЯ ШВИДКОСТІ ПРОПУЛЬСІЇ ХІМУСУ ПО ДВНАДЦЯТИПАЛІЙ КИШЦІ У СОБАК

Досліджено роль пілоричної гілки переднього стовбура блукаючих нервів, що іннервує пілоричний сфінктер в евакуації з шлунка їжі вуглеводного складу та швидкість пропульсії хімусу у дванадцятипалій кишці. Встановлено, що ваготомія пілоричного сфінктера не змінює тривалість евакуації з шлунка їжі вуглеводного складу, проте змінює динаміку евакуаторного процесу, а саме вдвічі зменшує тривалість першої фази евакуації. Також встановлено, що ваготомія пілоричного сфінктера не змінює швидкість пропульсії хімусу у дванадцятипалій кишці.

It was investigated the role of ramus pyloricus nervi vagi, which innervates pylorus in gastric emptying and the rate of propulsive movement of chime in duodenum. It was established that the vagotomy of pylorus didn't change the time of gastric emptying but change the duration of first phase of gastric emptying. Also, it was established that the vagotomy of pylorus didn't change the rate of propulsive movements of chime in duodenum.

Вступ. Механізми регуляції евакуаторної функції шлунка протягом тривалого часу залишаються в центрі уваги дослідників, що працюють в фізіології травлення. Найменш вивченим питанням в даній фундаментальній проблемі є роль пілоричної гілки переднього стовбура блукаючих нервів [3], що іннервує пілоричний сфінктер, в евакуаторній функції шлунка. Разом з тим вирішення даного питання має не лише фундаментальне, але і практичне значення, так як триває дискусія з приводу доцільності збереження іннервації пілоричного сфінктера при панкреато-дуоденальній резекції, при дуоденотомії та інших оперативних втручаннях.

Об'єкт та методи досліджень. Дослідження проведені в умовах хронічного експерименту на 6-х безпородних собаках, масою 16-20 кг з вживленими фістулами у фундальний відділ шлунка та дванадцятипалої кишки, 6-8 см нижче пілоричного сфінктера. Накладання фістул на шлунок та дванадцятипалу кишку, а також передопераційну підготовку та післяопераційний догляд за

тваринами здійснювали за схемами в посібнику Шалімова С.О. [1]. Всі оперативні втручання виконували під загальним знечуленням з використанням нембуталу (35 мг/кг, внутрішньовенно) чи тіопенталу натрію (35 мг/кг, внутрішньовенно).

Тварини були розділені на 2 групи: 1 група- 3 собаки з інтактною нервовою системою, 2 група- 3 собаки після операції по перерізці пілоричної гілки переднього стовбура блукаючих нервів. Собак беруть у дослід вранці натще. Евакуацію з шлунка у собак досліджували після вуглеводного харчового навантаження (100 г хліба) з додаванням 600 гумових кульок (1х1 мм). Питома вага кульок приблизно дорівнювала питомій вазі їжі. Після цього через кожні 25 хв, до кінця випорожнення шлунка, на 5 хв відкривали запілоричну фістулу і збирали хімус, що виділявся. По результатам підрахунку кульок у кожній порції хімусу реконструювалась динаміка спорожнення шлунка у вигляді напівлогарифмічного графіка. Графіки евакуаторної активності шлунку будувалися на

© Прибисько І., Берегова Т., Харченко М., 2010

основі даних про кількість вмісту, який залишався у шлунку через послідовні 30 хв. інтервали. На напівлогарифмічному графіку по осі абсцис відкладався час після прийому після прийому їжі в хв., а по осі ординат-десятковий логарифм їжі, яка лишалася в шлунку. Кут нахилу графіка до осі абсцис характеризує величину цієї частини, тобто інтенсивність евакуації із шлунка, а сама відстань від осі абсцис до будь-якої точки на графіку вказує на кількість їжі у шлунку.

Для повної характеристики динаміки евакуаторного процесу із шлунка щільної їжі, визначали абсолютну та відносну швидкості евакуації по результатам кількості кульок, які вийшли із шлунка разом з їжею.

Під абсолютною швидкістю ми розуміємо ту середню кількість кульок, які залишають шлунок за кожний наступний період дренування. Відносна швидкість евакуації – це виражене у процентах відношення кількості кульок, які залишили шлунок за півгодини до кількості кульок, які залишилися в шлунку.

Паралельно з вимірюванням швидкості евакуації з шлунка їжі вуглеводного складу ми вимірювали швидкість пропульсії хімусу по тонкій кишці.

Пропульсія тонкої кишки досліджувалася за допомогою болюса, яким штучно імітують харчову грудку. Болюс-поролоніа куля була прикріплена до ліски завдовжки 10 см, ліска обмежена на кінці спеціальним "гудзиком". Через фістулу дванадцятипалої кишки вводили болюс і спостерігали за змінами довжини ліски, що міститься зовні. Реєстрували час, за який болюс у кишці проходить 10 см, що і є показником пропульсії хімусу по тонкій кишці. Поділивши довжину ліски (10 см)

на час її проходження по кишці, отримували швидкість пропульсії хімусу по тонкій кишці.

Результати досліджень та їх обговорення. Встановлено, що у собак з інтактною нервовою системою середня тривалість евакуації з шлунка 100 г хліба складала $297 \pm 9,2$ хв. У собак з перерізкою пілоричної гілки переднього стовбура блукаючих нервів середня тривалість евакуації з шлунка 100 г хліба складала $300 \pm 7,7$ хв. Тобто, ваготомія пілоричного сфінктера не впливала на тривалість евакуації з шлунка їжі вуглеводного складу. Одержані нами дані не співпадають з даними Holle і співавт., за даними яких перерізка пілоричної гілки переднього стовбура блукаючих нервів прискорювала евакуацію з шлунка.

Деякі відмінності у собак з інтактною нервовою системою та у собак з ваготомією пілоричного сфінктера проявлялися у динаміці евакуаторного процесу (рис.1.). У собак з інтактною нервовою системою евакуаторний процес має 3 фази: 1 фаза- поступового збільшення абсолютної і відносної швидкості евакуації (рис. 2., 3.), 2 фаза- експоненціальна, 3 фаза- кінцевого спорожнення шлунка. У собак з ваготомією пілоричного сфінктера при евакуації з шлунка їжі вуглеводного складу тривалість першої фази зменшена на 30 хв і складає 30 хв. Тому за рахунок цього тривалість експоненціальної фази евакуації у собак з ваготомією пілоричного сфінктера зростає і в середньому складає 120 хв. У собак з ваготомією пілоричного сфінктера третя фаза зберігається. Таким чином, ми заключили, що необхідною умовою реалізації першої фази евакуації з шлунка їжі вуглеводного складу є цілісність волокон блукаючих нервів, які іннервують пілоричний сфінктер.

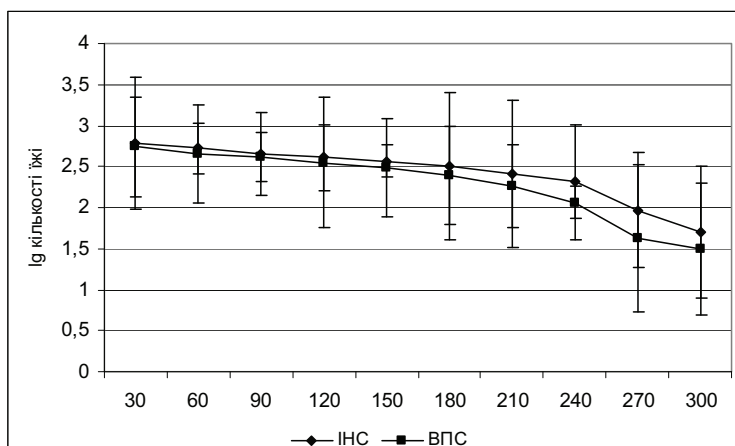


Рис.1. Динаміка евакуації з шлунка 100 г хліба у напівлогарифмічній системі координат у собак з інтактною нервовою системою (ІНС) та у собак з перерізкою пілоричної гілки переднього стовбура блукаючих нервів (ВПС)

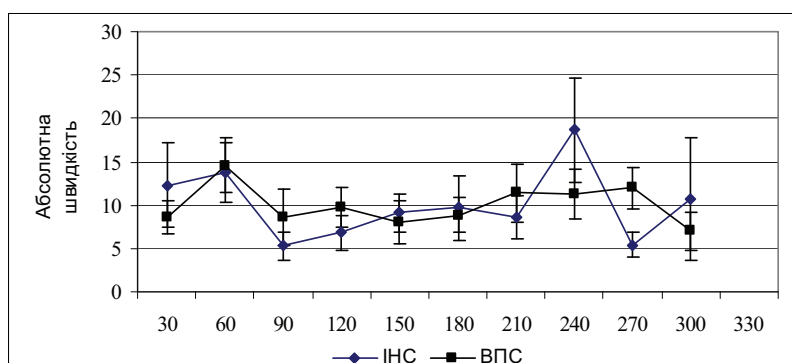


Рис.2. Абсолютна швидкість евакуації з шлунка 100 г хліба у напівлогарифмічній системі координат у собак з інтактною нервовою системою (ІНС) та у собак з перерізкою пілоричної гілки переднього стовбура блукаючих нервів (ВПС)

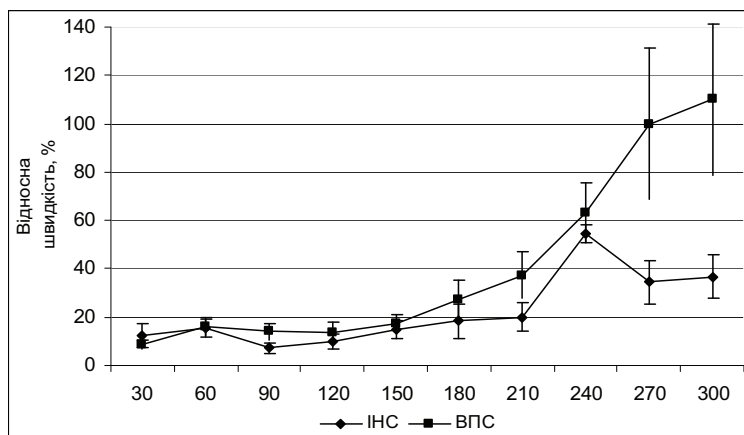


Рис. 3. Відносна швидкість евакуації з шлунка 100 г хліба у напівлогарифмічній системі координат у собак з інтактною нервовою системою (ІНС) та у собак з перерізкою пілоричної гілки переднього стовбура блукаючих нервів (ВПС)

Що стосується швидкості просування хімусу по дванадцятипалій кишці, то отримані дані не показали різниці в швидкості пропульсії хімусу у собак з інтактною нервовою системою та у собак з перерізкою пілоричної гілки переднього стовбура блукаючих нервів (рис.4.).

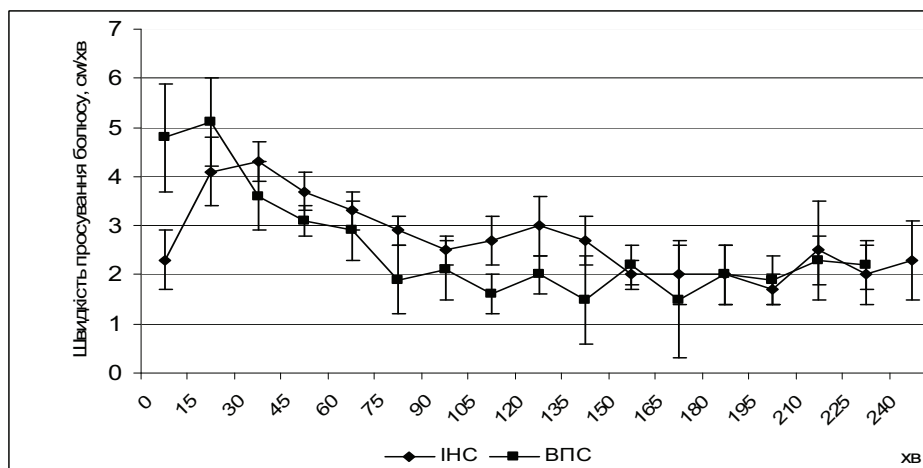


Рис. 4. Швидкість пропульсії у дванадцятипалій кишці у собак з інтактною нервовою системою (ІНС) та у собак з перерізкою пілоричної гілки переднього стовбура блукаючих нервів (ВПС), $M \pm m$, $n=28$)

Також, ми проаналізували зміни просування болюса по дванадцятипалій кишці погодинно (табл.1.) та отримані дані не показали статистично значущої різниці, що свідчить про те, що швидкість просування болюса по

дванадцятипалій кишці у собак з ваготомією пілоричного сфінктера практично однакова з швидкістю просування болюса по дванадцятипалій кишці у собак з інтактною нервовою системою.

Таблиця 1. Пропульсія у дванадцятипалій кишці у собак з інтактною нервовою системою (ІНС) та у собак з перерізкою пілоричної гілки переднього стовбура блукаючих нервів (ВПС), ($M \pm m$, $n=28$)

Швидкість просування болюса щогодинно	Собаки з інтактною нервовою системою (ІНС)	Собаки з перерізкою пілоричної гілки переднього стовбура блукаючих нервів (ВПС)
1 година (60 хв)	$3,6 \pm 0,5$	$4,4 \pm 0,8$
2 година (120 хв)	$2,9 \pm 0,4$	$2,1 \pm 0,6$
3 година (180 хв)	$2,4 \pm 0,5$	$1,8 \pm 0,7$
4 година (240 хв)	$2,1 \pm 0,8$	$2,2 \pm 0,5$

Наші дані є експериментальним поясненням моторно-вакуаторних порушень, які виникають у хворих після проведених їм оперативних втручань, що супроводжуються денервацією пілоричного сфінктера (панкреатодуоденальна резекція, екстагастральна ваготомія, стовбурова ваготомія). Саме втрата першої фази евакуаторного процесу, під час якої відбувається рецептивна релаксація, приводить до того, що у таких хворих шлунок не адаптується до об'єму вжитої їжі, тиск в шлунку підвищується [2] і виникає відчуття дискомфорту та розпирання, що в подальшому приводить до розвитку

демпінг-синдрому. Тому, при оперативних втручаннях на шлунку, кишечнику та підшлунковій залозі, хірургам варто враховувати наші дані і по-можливості зберігати парасимпатичну іннервацію пілоричного сфінктера.

Висновки. Ваготомія пілоричного сфінктера не впливає на тривалість евакуації з шлунка їжі вуглеводного складу та змінює динаміку евакуаторного процесу з шлунка, а саме вдвічі зменшує тривалість першої фази евакуації.

1. Шалимов С.А., Радзиховский А.П., Кейсевич Л.В. Руководство по экспериментальной хирургии. – М.: Медицина, 1989. – 292 с. 2. Azpiroz F. Control of gastric emptying by gastric tone // Dig. Dis. Sci. – 1994. – Vol.39, Suppl. 1. – S. 18-19. 3. Holle G.E., Hahn D., Forth W. Innervation of pylorus in control of motility and gastric emptying // Am J Physiol. – 1992. – Vol. 263, N 2, Pt.1- G. 161-168 4. Lacy B.E., Koch K.L., Crowell M.D. Manometry. In book: Schuster M.M., Crowell M.D., Koch K.L. Schuster Atlas of Gastrointestinal motility in health and Disease. Second edition. –

Hamilton-London: BC Decker Inc., 2002. – P.135-150. 5. Netter F.H. Netter's Gastrointestinal Anatomy and Motility. Canada: Novartis, 2001. – 72 p. 6. Wood J.D., Alpers D.H., Andrews P.L.R. Fundamentals of neurogastroenterology: basic science. In: Drossman D.A., Talley N.J., Thompson W.G., et al, editors. The functional gastrointestinal disorders: diagnosis, pathophysiology and treatment: a multinational consensus. McLean (VA): Degnon Associates, 2000. – P.31-90.

Надійшла до редколегії 12.02.10

УДК [616.31/.33:612.323]-08-092.9

О. Цирюк, канд. біол. наук, В. Кухарський, канд. біол. наук,
К. Непорада, д-р мед. наук

ЗМІНИ ГЛІКОПРОТЕЇДНИХ ТА ПРОТЕОГЛІКАНИХ КОМПОНЕНТІВ ШЛУНКОВОГО СЛИЗУ У ЩУРІВ ЗА УМОВ ТРИВАЛОЇ ГІПОАЦИДНОСТІ

Досліджено вплив гіпоацидності різної тривалості, викликаной введенням інгібітора протонної помпи омепразолу, на глікопротеїдний та протеогліканний склад шлункового слизу у щурів. Встановлено, що зі збільшенням тривалості гіпоацидності шлункового соку зростає вміст оксипроліну, фукози, N-ацетилнейрамінової кислоти та гексуронової кислот в слизі, що свідчить про посилення деградації колагенових та неколагенових білків слизу. Таким чином, тривала гіпоацидність призводить до руйнування слизового бар'єру, порушення резистентності та зниження інтенсивності регенеративних процесів.

It was investigated the influence of hypoacidity of different duration on evoked by H^+-K^+ -ATPase inhibitor omeprazole on composition of glycoproteins and proteoglycans in gastric mucus in rats. It was established that with increase of duration of hypoacidity in gastric mucus in rats the levels of oxiprolin, fucose, N-acetylneuraminic acid and hexuronic acid are enhanced. It is witness that degradation of collagenous and noncollagenous proteins of mucus are intensified. Thus long-term hypoacidity leads to destruction of mucus barrier, disturbance of resistance and diminishing of intensity of regenerative process.

Вступ. Важливим компонентом шлункового соку є слиз. Слиз є складною динамічною системою колоїдних розчинів високомолекулярних біополімерів, яка включає також низькомолекулярні органічні та мінеральні речовини, лейкоцити, лімфоцити та злущений епітелій. Слиз вкриває всю внутрішню поверхню шлунка, утворюючи шар товщиною 0,6 мм, який покриває слизову та захищає її від механічних та хімічних пошкоджень: слиз уповільнює зворотну дифузію іонів водню та виконує роль фільтра, який здатний пропускати лише низькомолекулярні сполуки і затримує високомолекулярні, зокрема пепсин. Захисну функцію шлункового слизу виконують неколагенові білки: нейтральні глікопротеїни (фукопротеїни), кислі глікопротеїни (сіаломуцини та сульфатовані глікопротеїни) та протеоглікани (глікозаміноглікани). Також важливу роль у забезпеченні структурної цілісності слизової оболонки шлунка виконують колагенові білки сполучної тканини, маркером деградації яких є вільний оксипролін. На сьогодні велика кількість робіт присвячена дослідженню складу та властивостей шлункового слизу, як фактору захисту, за умов гіперацидності шлункового соку [3, 7], яка є однією із ланок патогенезу виразкової хвороби дванадцятипалої кишки [1]. Накопичені факти свідчать, що на етапі раннього передракового ураження шлунка, наприклад такого як кишкова метаблазія, втрачається нормальний характер глікозилювання, і в шлунковому епітелії з'являються кишкові муцини MUC2 та MUC4 [4, 5] та змінюється структура глікопротеїнів слизу [6]. Не менш важливим є дослідження зміни складу шлункового слизу в процесі розвитку передракових станів шлунка на фоні тривалої гіпоацидності. Нами та іншими дослідниками показано, що тривале пригнічення шлункової секреції омепразолом у щурів призводить до передракового ураження слизової [2, 8, 9].

У зв'язку з цим метою даної роботи було дослідити стан слизового бар'єру шлунка в динаміці за умов тривалого пригнічення шлункової секреції шляхом введення інгібітора H^+-K^+ -АТФази омепразолу.

Об'єкт та методи досліджень. Дослідження проведені на нелінійних щурах-самцях масою 160-200 г з дотриманням нормативів Конвенції з біоетики Ради Європи 1997 року, Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експеримента-

льних та інших наукових цілей, загальним етичним принципам експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 року), інших міжнародних угод та національного законодавства у цій галузі.

На початку експерименту щурів було поділено на 8 груп. Чотири групи щурів, впродовж різних термінів отримували блокатор ключового фермента синтезу соляної кислоти H^+-K^+ -АТФази омепразол ("Sigma", USA) в дозі 14 мг/кг внутрішньочеревинно (в/о) один раз на добу, який розчиняли в 0,2 мл води для ін'єкцій: 1 група – 7 днів, 2 група-14 днів, 3 група- 21 день, 4 група-28 днів відповідно. Кожній з чотирьох груп відповідала контрольна група щурів, яким упродовж 7, 14, 21 та 28 днів вводили 0,2 мл води для ін'єкцій. В зв'язку з тим, що між відповідними досліджуваними показниками в контрольних групах тварин не було статистично значущо відмінностей, вони об'єднувались в одну групу. Тобто, після статистичної обробки результатів контроль для кожного з показників був спільним для всіх 4 дослідних груп.

Через добу після останнього введення омепразолу або води здійснювали евтаназію тварин під уретановим наркозом. Для оцінки стану слизового бар'єру шлунка в пристінковому слизі визначали вміст вільного оксипроліну, фукози, N-ацетилнейрамінової та гексуронової кислот.

Одержані результати досліджень перевіряли на нормальність розподілу за допомогою W тесту Шапіро-Вілкі. Оскільки наші дані виявилися нормально розподілені, порівняння вибірок проводилося за допомогою t-критерію Стюдента для незалежних вибірок. Розраховували середнє значення (M), стандартне відхилення (SD). Для наших даних ми приймали рівень значущості $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. В результаті проведених нами досліджень було встановлено, що введення інгібітора протонної помпи омепразолу призводить до поступового статистично значущо збільшення рівня вільного оксипроліну в шлунковому слизу в динаміці проведення експерименту – на 7, 14, 21 та 28 день (Рис.1). Після 28 днів введення омепразолу вміст оксипроліну в слизі зростає з $0,95 \pm 0,010$ до $2,50 \pm 0,011$ мкмоль/л, або на 163,2% ($P < 0,001$). Це свідчить про те, що зі збільшенням тривалості гіпоацидності шлункового соку відбувається посилення деградації колагенових білків.

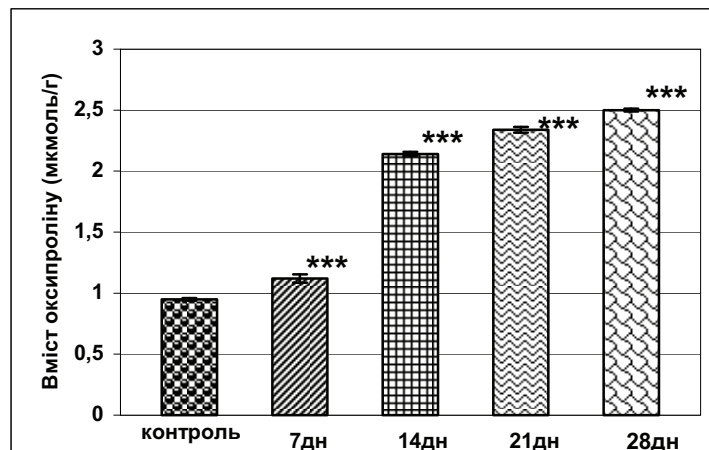


Рис.1. Вміст оксипроліну в шлунковому слизу щурів після різних термінів введення омепразолу
*** – $P < 0,001$ порівняно з контролем

Аналогічну картину спостерігали при визначенні вмісту вільної фукози в пристінковому слизі. За умов тривалого введення омепразолу показники рівню фукози збільшувались на 7, 14, 21 та 28 день порівняно з контролем (Рис.2). Через 28 днів збільшувався вміст фукози

в шлунковому слизу з $3,98 \pm 0,110$ мкмоль/л до $8,24 \pm 0,090$ мкмоль/л, або на 107,0% ($P < 0,001$) у порівнянні з контролем. Це вказує на підсилення деполімеризації фукопротеїнів сполучної тканини.

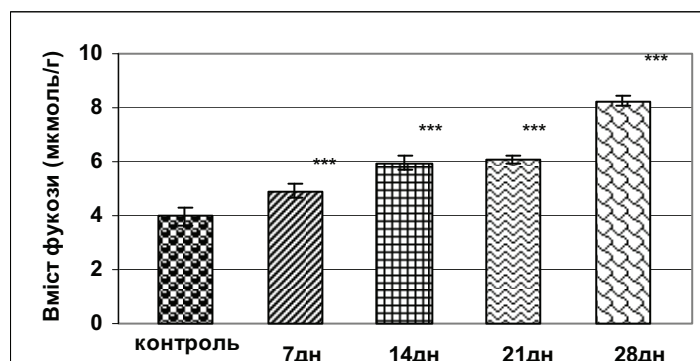


Рис.2. Вміст фукози в шлунковому слизу щурів після різних термінів введення омепразолу
*** – $P < 0,001$ порівняно з контролем

Виявлене на 7, 14, 21 та 28 день експерименту підвищення в результаті гіпоацидності вмісту N- ацетилнейрамінової кислоти свідчить про істотну дезорганізацію сполучнотканинних структур внаслідок деполімеризації неколагенових білків-глікопротеїнів і протеогліканів (Рис.3). Найвищий рівень зростання вмісту N- ацетилнейрамінової кислоти спостерігався після 28 днів введення омепразолу. На початку експерименту цей пока-

зник становив $2,90 \pm 0,18$ мкмоль/л, а через 28 днів зріс до $6,12 \pm 0,250$ мкмоль/л, або на 111,0% ($P < 0,001$). Одержані результати вказують на втрату кінцевих мономерів вуглеводного компоненту глікопротеїнів у складі шлункового муцину, тобто їх деполімеризацію, послаблення резистентності останніх до протеолітичних ферментів і зниження їх захисних властивостей.

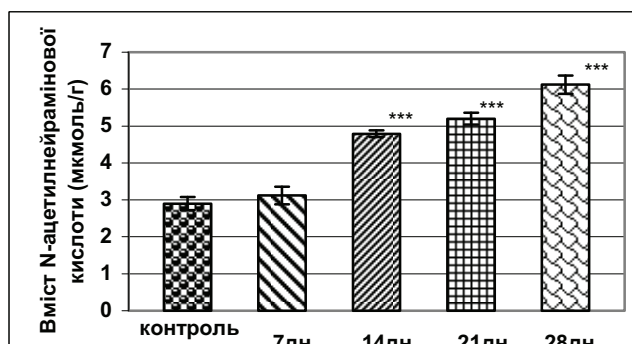


Рис.3. Вміст N-ацетилнейрамінової кислоти в шлунковому слизу щурів після різних термінів введення омепразолу
*** – $P < 0,001$ порівняно з контролем

Також під впливом тривалого введення омепразолу на 7, 14, 21 та 28 день поступово збільшувався рівень гексуронових кислот – компонентів протеогліканів сполучної тканини слизу шлунка (Рис.4). Найвищі значення були після 21 та 28 дня введення. Так, через 21 день введення показник гексуронових кислот збільшився з $7,17 \pm 0,46$ до $12,8 \pm 0,01$ мкмоль/л, або на 78,5% ($P < 0,001$),

а через 28 днів до $12,78 \pm 0,17$ мкмоль/л, або на 74% ($P < 0,001$). Отже, зростання рівня компонентів шлункового слизу призводить до дезорганізації сполучнотканинних структур слизової шлунка, обумовлену тривалим введенням омепразолу, про що свідчить збільшення вивільнення мономерів, які входять до їх складу, зокрема ацетилнейрамінової та гексуронових кислот.

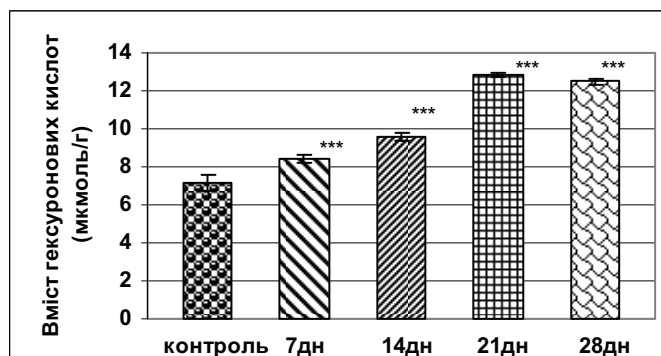


Рис.4. Вміст гексуронових кислот в шлунковому слизу щурів після різних термінів введення омепразолу

*** – $P < 0,001$ порівняно з контролем

Висновки. Таким чином, зі збільшенням тривалості гіпоацидності шлункового соку зростає вміст оксипроліну, фукози, N-ацетилнейрамінової кислоти та гексуронових кислот в слизі, що свідчить про посилення деградації колагенових та неколагенових білків слизу. Таким чином, тривала гіпоацидність призводить до руйнування слизового бар'єру, порушення резистентності та зниження інтенсивності регенеративних процесів. Слизова оболонка шлунка стає більш вразливою до мутагенів, в тому числі до дії жовчних кислот та нітрозамінів.

1. Проценко Т. Л., Хілько Т. Д., Якубцова І. В. et al. Вивчення складу глікопротеїнів шлунка за умов різних експериментальних виразок // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Сер. Біологія. – 2003. № 41. – Р.116-118. 2. Цирюк О.І., Берегова Т.В. Вплив омепразол-викликаного гіпергастринемії на базальну шлункову секрецію у щурів // Вісник проблем біології і медицини. – 2007. – Вип.3.

– С. 38-43. 3. Anand B. S., Graham D. Y. Ulcer and gastritis // Endoscopy. – 1999. Vol.31, № 2. – P.215-225. 4. Bolos C., Real F.X., Lopez-Ferrer A. Regulation of mucin and glycoconjugate expression: from normal epithelium to gastric tumors // Front Biosci. – 2001. – №6. – P.1256-63. 5. Corfield A.P., Carroll D., Myerscough N., Probert C.S. Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease // Front Biosci. – 2001. – №6. – P. 1321-1363. 6. Hakkinen I., Nevalainen T., Paasivuori R., Partanen P., Seppala K., Sipponen P. Gastric cancer associated structure in mucus glycoproteins shown as a clinically useful marker // Gut. – 1991. – №32. – P. 1465-1469. 7. Ham M., Kaunitz J.D. Gastrointestinal mucosal defense // Curr Opin Gastroenterol. – 2008. – Vol.24, № 6. – P.665-673. 8. Jensen R.T. Consequences of long-term proton pump blockade: insights from studies of patients with gastrinomas // Basic Clin Pharmacol Toxicol. – 2006 – Vol.98, №1. – P. 4-19. 9. Kakei N., Ichinose M., Tatematsu M. Effects of long-term omeprazole treatment on adult rat gastric mucosa-enhancement of the epithelial cell proliferation and suppression of its differentiation // Biochem Biophys Res Commun. – 1995 – Vol.214, №3. – P.861-868.

Надійшла до редколегії 18.02.10

УДК: 616.34-002

Г. Толстонова, канд. біол. наук

ЕКСПРЕСІЯ ТРАНСКРИПЦІЙНОГО ФАКТОРУ EGR-1 В ТОВСТІЙ КИШЦІ ЩУРІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ВИРАЗКОВОМУ КОЛІТІ

Встановлено збільшення експресії білку та мРНК редокс-чутливого транскрипційного фактору Egr-1 на ранніх етапах розвитку експериментального виразкового коліту, викликаного йодоацетамідом чи тринітробензол сульфаною кислотами. Збільшення експресії Egr-1 в слизовій оболонці товстої кишки ще до розвитку в ній уражень, можливо свідчать про його роль в запуску захисних механізмів клітини в патогенезі виразкового коліту.

We found significant upregulation of protein and mRNA expression of redox-sensitive transcription factor Egr-1 in the early stages of iodoacetamide- or trinitrobenzene sulfonic acid-induced experimental ulcerative colitis. Upregulation of Egr-1 expression in colonic mucosa before injury development may represent the role of Egr-1 in the cellular homeostasis protection during ulcerative colitis.

Вступ. Транскрипційний фактор росту ранньої відповіді (early growth response-1 (Egr-1)) – це білок "ранньої відповіді", так як його експресія дуже швидко активується великою кількістю різних стимулів (фактори росту, гіпоксія). У свою чергу Egr-1 сам, або через взаємодію з іншими транскрипційними факторами бере участь в експресії про-ангіогенних генів таких як bFGF, PDGF-A, PDGF-B, VEGF та VEGF рецептор-1/Flt1, що є критичними в механізмах розвитку й гоєння виразок не лише шляхом регуляції ангіогенезу, а також через попередження апоптозу клітин різного типу [11]. Egr-1 – цинк-зв'язаний транскрипційний фактор. Він належить до групи редокс-чутливих транскрипційних факторів,

активність яких залежить від внутрішньоклітинного балансу між про-оксидантами та антиоксидантами [3]. ДНК-зв'язуючий домен Egr-1 містить цистеїнові залишки, окиснення яких по тіоловим (SH) – групам призводить до порушення формування інтер-/інтрамолекулярних дисульфідних зв'язків, конформації молекули білка і як наслідок, змін в його транскрипційній активності [10].

Порушення окиснотно-редукційного балансу в стінці кишечника при запальних захворюваннях кишечника було показано в численних клінічних та експериментальних дослідженнях і визначається одним із етіологічних/ініціюючих факторів при даній патології [8]. В дослідженнях на моделі виразки дванадцятипалої кишки, показано

раннє (до виникнення виразки) збільшення транскрипційної активності Egr-1 в стінці дванадцятипалої кишки. Автори довели, що це є одним із ендogenous захисних механізмів в підтримці внутрішньоклітинного редокс гомеостазу [5]. Роль редокс-чутливого транскрипційного фактора Egr-1 в патогенезі запальних захворювань кишечника залишається нез'ясованим. Метою даної роботи було дослідити зміни експресії Egr-1 в товстій кишці щурів в різний термін експериментального виразкового коліту.

Об'єкт та методи дослідження. Дослідження проведено на щурах самицях лінії Sprague-Dawley вагою 160-200 г. Йодоацетамід-викликаний виразковий коліт моделювали одноразовим ректальним введенням 0,1 мл 6%-го розчину йодоацетаміду (Sigma, США) розчиненим в 1%-ному розчині метилцелюлози (Sigma, США) (7 см від анального отвору, використовуючи гумовий катетер S8 (Rüsch, Німеччина)), контрольній групі тварин вводили 0,1 мл 1%-го розчину метилцелюлози. Виразковий коліт, викликаний тринітробензол сульфонові кислотою (TNBS), моделювали одноразовим ректальним введенням 0,5 мл 6%-го розчину TNBS (Sigma, США) в 50% етанолі, відповідно контрольна група отримувала 0,5 мл 50%-го етанолу. Щурів умертвляли через 30 хв., 1, 2, та 6 год. після введення йодоацетаміду чи TNBS, видаляли 7 см товстої кишки від анального отвору та відразу занурювали в рідкий азот.

Ізольовану ділянку товстої кишки гомогенізували в лізуючому буфері з додаванням інгібітора протеїназ (Sigma, США). Концентрацію загального білку вимірювали за методом Бредфорда з використанням набору "Bio-Rad для білкового аналізу" (Bio-Rad, США). Розділення та визначення білку (100 мкг заг.білку/зразок) методом Вестерн блот проводили в 10% SDS поліакриламідному гелі з наступним переносом на Hybond-ECL нітроцелюлозну мембрану (Amersham Biosciences, США) згідно стандартного протоколу фірми Bio-Rad. Поліклональне антитіло проти Egr-1 (1:500; Santa-Cruz Biotech., США) використовували для визначення рівня відповідного білку в стінці товстої кишки, з наступною інкубацією із вторинним HRP-кон'югованим антитілом (1:3000, Santa-Cruz Biotech., США). Візуалізацію Вестерн блот проводили ECL-реагентом (Amersham Biosciences, США).

РНК ізолювали в TRIZOL реагенті (Invitrogen; США) та очищали з використанням набору Clontech Laboratories для повної ізоляції РНК (Clontech Laboratories, США). Полімеразно ланцюгову реакцію (ПЛР) у реальному часі проводили з використанням TaqMan системи (Applied Biosystems Inc.; США) для гену *egr-1*. 5 мкг загального РНК з кожного зразка брали для конвертації мРНК в кДНК застосовуючи MMLV транскриптазу (Invitrogen; США) впродовж 30 хв ($t=50^{\circ}\text{C}$). Для ПЛР у реальному часі реакції загальним об'ємом 20 мкл, 1 мкл продукту реверс транскрибування з'єднували з TaqMan універсальною сумішшю для ПЛР та сумішшю для експресії генів (Applied Biosystems; США). ПЛР у реальному часі проводили на ампліфікаторі BioRad iCycler за наступним протоколом: зворотна транскрипція (1 цикл) – 50°C – 2 хв.; активація Taq інгібітора (1 цикл), – 95°C – 10 хв.; ПЛР ампліфікація (40 циклів) – 95°C – 15 с, 60°C – 1 хв. Рівень мРНК досліджуваного гену визначали за числом умов-

них одиниць флуоресцентного сигналу (ум.од. флуор.), використовуючи число ум.од. флуоресцентного сигналу гену GAPDH для стандартизації вихідної кількості РНК. Зміни експресії вираховували за різницею числа ум.од. флуоресцентного сигналу експериментальної групи до контрольної групи.

Статистичну обробку результатів проводили за t -тестом Ст'юдента. Дані представлені у вигляді $M \pm \sigma$, n – кількість тварин в групі. Статистично значущою для всіх показників вважали різницю $P \leq 0,05$.

Результати та їх обговорення. Для дослідження ролі редокс-чутливого транскрипційного фактора Egr-1 в патогенезі запальних захворювань кишечника нами була обрана модель йодоацетамід-викликаного виразкового коліту. Йодоацетамід – це алкілюючий агент, який ковалентно зв'язується з білковими молекулами через взаємодію з SH-групами цистеїнових залишків та формує S-ацетамідо тіоетер. Крім того, йодоацетамід викликає виснаження ендogenous антиоксиданту глутатіону та перекисне окиснення ліпідів [1]. Nagata M. та ін. [7] показали, що введення гастропротектора сульфата, який діє через попередження виснаження ендogenous сульфідрилів (глутатіон), значно зменшував клінічні та морфологічні ознаки йодоацетамід-викликаного виразкового коліту. Дослідження на мишах, у яких відсутній ген, що кодує антиоксидантний фермент глутатіон пероксидазу, показали морфологічні зміни в стінці товстої кишки, що відповідають картині виразкового коліту [2]. Таким чином, йодоацетамід-викликаний виразковий коліт є адекватною моделлю для дослідження молекулярно-біохімічних змін, що запускаються в клітині в результаті зрушення оксидантного балансу.

Йодоацетамід-викликаний виразковий коліт характеризується швидким розвитком запалення і ураження товстої кишки. Через 6 год. після ректального введення йодоацетаміду помітні макроскопічні зміни в слизовій оболонці у вигляді масивного набряку, та поверхневих ерозій. З метою дослідити зміни експресії Egr-1 на ранніх етапах розвитку експериментального виразкового коліту, що передують виникненню виразок в стінці кишки, ми видаляли товсту кишки через 30 хв., 1, 2 та 6 год. після введення йодоацетаміду. В результаті проведених нами досліджень встановлено вірогідне підвищення експресії Egr-1 білку (рис. 1А). Так, через 30 хв. після ректального введення йодоацетаміду цей показник був вірогідно збільшений в 1,3 рази відносно рівня експресії в контрольній групі щурів, яким ректально вводили метилцелюлозу ($p \leq 0,001$). Відповідно, через 1, 2 та 6 год. експресія Egr-1 білку поступово збільшувалась, досягаючи піка через 2 год. Порушення внутрішньоклітинного оксидантного балансу в клітинах слизової оболонки товстої кишки, викликане йодоацетамідом, швидко підвищувало рівень мРНК Egr-1 (рис. 1Б), що свідчить про активацію процесів транскрипції. Так через 30 хв. після введення йодоацетаміду рівень мРНК Egr-1 був збільшений в 24 рази, що свідчить про швидкий запуск процесів транскрипції цього гену і може бути доказом його важливої ролі в механізмах розвитку ураження в стінці товстої кишки при виразковому коліті. Пік рівня мРНК припадав на термін 2 год. після введення йодоацетаміду. Через 6 год., коли вже розвивались поверхневі ерозії в стінці товстої кишки, спостерігався різкий спад рівня мРНК.

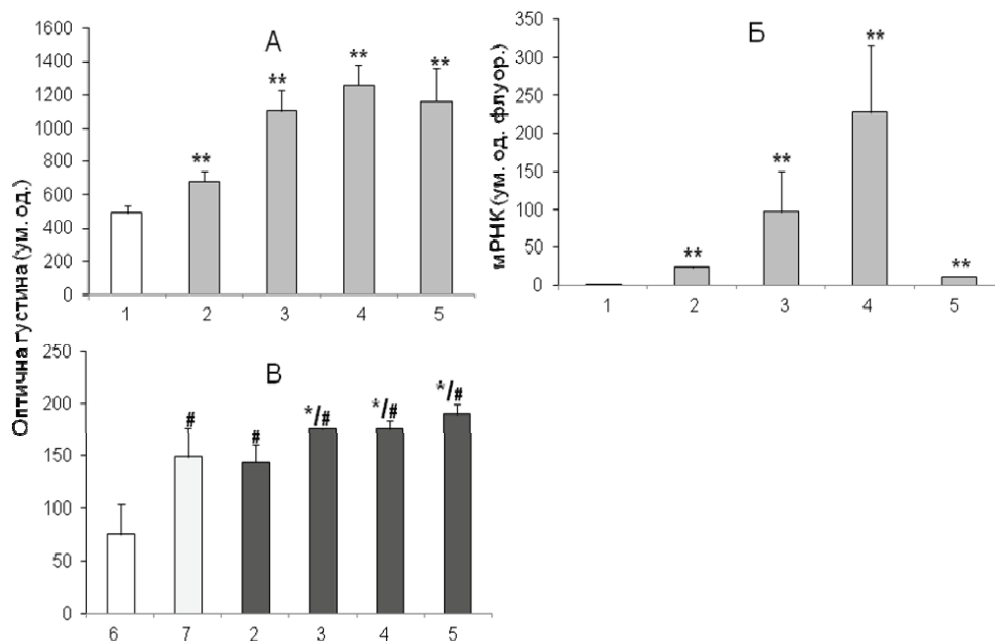


Рис. 1. Зміни експресії білку (А,В) та мРНК (Б) транскрипційного фактору Egr-1 в слизовій оболонці товстої кишки щурів на ранніх етапах розвитку йодоацетамід- (А,Б) та TNBS-викликаного виразкового коліту (В) (1-контроль-метилцелюлоза; 2 – 30 хв.; 3 – 1 год.; 4 – 2 год.; 5 – 6 год. після ректального введення йодоацетаміду чи TNBS; 6 – контроль-фіз. роз.; 7 – контроль-етанол). А, В – Вестерн блот; Б – ПЦР у реальному часі. *- $p \leq 0,01$, відносно контроль-етанол, **- $p \leq 0,001$, відносно контроль-метилцелюлоза, #- $p \leq 0,001$, відносно контроль – фіз.роз.

В наступній серії наших досліджень ми перевірили зміни експресії білку Egr-1 на іншій моделі експериментального виразкового коліту, а саме TNBS-викликаному виразковому коліту у щурів. TNBS, на відміну від йодоацетаміду викликає ураження товстої кишки, через гаптен-опосередкований механізм. Для покращення проникнення TNBS в клітину, його вводять у вигляді 50%-го розчину етанолу. Так як етанол є цитотоксичним агентом, який спричиняє оксидативний стрес [4], в наших дослідженнях ми використовували дві контрольні групи: 1 – щури, яким ректально вводили фізіологічний розчин; 2 – щури, яким ректально вводили 50%-вий розчин етанолу. Як ми бачимо на рис. 1В 50%-вий розчин етанолу вірогідно (1,9 разів, $p \leq 0,001$) збільшував рівень експресії Egr-1 в слизовій оболонці товстої кишки щурів, в порівнянні з контрольною групою, що отримувала фізіологічний розчин. Аналіз рівня експресії Egr-1 в слизовій оболонці товстої кишки щурів в різний термін після введення розчину TNBS, показав, що через 30 хв. цей рівень не відрізнявся від контрольної групи, якій вводили етанол. Але вже через 1 год. рівень експресії Egr-1 білку був в 1,2 рази ($p \leq 0,01$) вищий за такий в контрольній групі, якій вводили етанол та в 2,3 рази ($p \leq 0,001$) – в контрольній групі, якій вводили фізіологічний розчин. На відміну від йодоацетамід-викликаного виразкового коліту, рівень експресії Egr-1 білку не зменшувався, а навпаки продовжував збільшуватися через 6 год. після введення TNBS. Так, через 6 год. цей рівень був в 1,3 рази ($p \leq 0,01$) вищий за такий в контрольній групі, якій вводили етанол та в 2,5 раз ($p \leq 0,001$) – в контрольній групі, якій вводили фізіологічний розчин.

Отже, отримані нами дані свідчать про провідну роль транскрипційного фактору Egr-1 в механізмах розвитку виразкового коліту. Швидке підвищення рівня експресії Egr-1 в слизовій оболонці товстої кишки, ще задовго до виникнення уражень, можливо репрезентує його роль в захисних механізмах клітини та підтриманні її гомеостазу. На користь нашого припущення є дані

про те, що блокада Egr-1 антисенсом до Egr-1 сприяла розвитку більш агресивних цистеамін-викликаних виразок дванадцятипалої кишки. Більш того, цей ефект був пов'язаний зі зниженням експресії про-ангіогенних факторів росту bFGF, PDGF, VEGF [6]. Крім того Subbaramaiah K. та ін. [9]. в дослідженнях на колоноцитах людини, показали збільшення ДНК- зв'язування Egr-1 з промотором гену мікросомальної простагландинсинтази-1, під дією фактору некрозу пухлин- α , що сприяло утворенню простагландинів E2, які є важливим для підтримання гомеостазу в слизовій оболонці кишечника.

Висновки: 1. Експресія білку та мРНК редокс-чутливого транскрипційного фактору Egr-1 достовірно збільшується на ранніх етапах розвитку йодоацетамід- та TNBS-викликаного виразкового коліту у щурів. 2. Збільшення експресії Egr-1 в слизовій оболонці товстої кишки до виникнення в ній уражень, можливо свідчать про його роль в запуску захисних механізмів клітини в патогенезі виразкового коліту.

1. Chen Q., Stevens J.L. Inhibition of iodoacetamide and t-butylhydroperoxide toxicity in LLC-PK1 cells by antioxidants: a role for lipid peroxidation in alkylation induced cytotoxicity // Arch. Biochem. Biophys. – 1991. – Vol. 284, N2. – P. 422-430.
2. Esworthy R.S., et. al. Mice with combined disruption of Gpx1 and Gpx2 genes have colitis // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol. – 2001. – Vol. 281, N 3. – P. 848-855.
3. Huang R.P., Adamson E.D. Characterization of the DNA-binding properties of the early growth response-1 (Egr-1) transcription factor: evidence for modulation by a redox mechanism // DNA Cell Biol. – 1993. – Vol. 12, N 3. – P. 265-273.
4. Keshavarzian A., Farhadi A., Forsyth C., Rangan J., Jakate S., Shaikh M., Banan A., Fields J. Evidence that chronic alcohol exposure promotes intestinal oxidative stress, intestinal hyperpermeability and endotoxemia prior to development of alcoholic steatohepatitis in rats // Journal of Hepatology. – 2009. – Vol. 50, N 3. – P. 538-547.
5. Khomenko T., Deng X., Jadus M.R., Szabo S. Effect of cysteamine on redox-sensitive thiol-containing proteins in the duodenal mucosa // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2003. – Vol. 309, N 4. – P. 910-916.
6. Khomenko T., Szabo S., Deng X., Jadus M.R., Ishikawa H., Osapay K., Sandor Z., Chen L. Suppression of early growth response factor-1 with egr-1 antisense oligodeoxynucleotide aggravates experimental duodenal ulcers // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol. – 2006. – Vol. 290, N 6. – P. 1211-1218.
7. Nagata M., Vincze A., Kusstatscher S., Szabo S. The effect of sucralfate on experimental ulcerative colitis // Gastroenterology. – 1995. –

Vol. 108, N4. – P. A173. 8. Rezaie A., Parker R.D., Abdollahi M. Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: an epiphenomenon or the cause? // Dig. Dis. Sci. – 2007. – Vol. 52, N 9. – H. 2015-2021. 9. Subbaramaiah K., Yoshimatsu K., Scherl E., Das K.M., Glazier K.D., Golijanin D., Soslow R.A., Tanabe T., Naraba H., Dannenberg A.J. Microsomal prostaglandin E synthase-1 is overexpressed in inflammatory bowel disease. Evidence for involvement of the transcription factor Egr-1 // J. Biol. Chem. – 2004. – Vol. 279, N 13. – P. 12647-12658. 10. Webster K.A.,

Prentice H., Bishopric N.H. Oxidation of zinc finger transcription factors: physiological consequences // Antioxid. Redox.Signal. – 2001. – Vol. 3, N 4. – P. 535-548. 11. Yan S.F., Fujita T., Lu J., Okada K., Shan Zou Y., Mackman N., Pinsky D.J., Stern D.M. Egr-1, a master switch coordinating upregulation of divergent gene families underlying ischemic stress // Nature Medicine. – 2000. – Vol. 6. – P. 1355-1361.

Надійшла до редколегії 05.02.2010

УДК 612.825.56–035.85

А. Чернінський, канд. біол. наук, Н. Піскорська, канд. біол. наук,
І. Зима, канд. біол. наук

АСИМЕТРИЯ АКТИВАЦІЇ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЛЮДИНИ ПРИ ГЕДОНІЧНОМУ СПРИЙНЯТТІ ОДОРАНТІВ

Очікували, що позитивно емоційне сприйняття ольфактивних подразників буде супроводжуватися зростанням рівня активації лівої фронтальної області, тоді як негативно емоційне – правої фронтальної області. Отримані дані не підтвердили це припущення, що вказує на специфіку закономірностей залучення фронтального неокортекса до процесів емоційної оцінки ольфактивних стимулів.

We expected that positive subjective assessment of odors would be related to increasing of the left frontal activation whereas negative positive assessment of those stimuli would be associated with opposite pattern. Our data have not confirmed this suggestion. This may be due to the specialty of the processing of olfactory information.

Вступ. Нюховий аналізатор людини має тісні морфологічні та функціональні зв'язки з емоційними структурами мозку, що сприяє розвитку емоційних реакцій при сприйнятті ольфактивних чинників. Згідно моделі [1] обов'язковим компонентом функціональної системи сприйняття ольфактивних стимулів є модально-специфічні сенсорні структури. Наступним етапом обробки запахової інформації є аналіз її біологічного значення, який здійснюється емоційними структурами і у найпростішому випадку полягає у формуванні оцінки за шкалою "подобається / не подобається" (*approach / withdrawal*). Відповідно до сучасних уявлень, емоціогенез певним чином пов'язаний із асиметрією активації головного мозку. Так, права півкуля вважається більш "емоційною" в порівнянні з більш "раціональною" лівою. Багатьма дослідниками показано, що знак суб'єктивного переживання пов'язаний із асиметрією активації фронтальних областей неокортекса: переважання активації лівої півкулі супроводжується розвитком позитивно-емоційних, натомість, активація правої – розвитком негативно-емоційних станів [2]. Такі результати було отримано при використанні емоційно значущих зорових та слухових стимулів, мозковий процесинг яких значною мірою пов'язаний із новою корою. Відомо, що обробка нюхової інформації, на відміну від інформації зазначених вище модальностей, в більшій мірі здійснюється підкорковими структурами, які беруть участь у формуванні емоційних станів (лімбічна система) [3]. Відповідно до цього, ольфактивна інформація поступає до емоціогенних структур з меншим числом переключень та у менш зміненому вигляді, в порівнянні з зоровою. Зважаючи на це, постає питання, чи будуть справедливими закономірності асиметрії мозкової активації для суб'єктивних станів, викликаних впливом ароматичних чинників.

Об'єкт та методи дослідження. В експериментах брали участь 67 добровольців – студентів Київських ВУЗів віком від 18 до 25 років, обох статей (24 жінки та 43 чоловіка), з нормальною нюховою чутливістю на момент проведення експерименту. Дослідження складалось з двох етапів. На першому етапі обстежувані пропонувалася касета з десяти пробірок, всередині яких були смужки фільтрувального паперу із нанесеними на них ефірними оліями: лаванди, розмарину, іланг-ілангу, сосни альпійської, лимону, м'яти, анісу, полину гіркого, троянди та спиртової настоянки валеріани лікарської, яку вони повинні були ранжувати за ступенем приємності пропонованих ароматів. На другому етапі, який проходив в інший від попереднього день, прово-

дилось психофізіологічне дослідження. Під час нього обстежувані знаходилися в спеціальній екранованій, звуко- та світлоізолюваній камері у зручному кріслі в напівлежачому стані із заплученими очима. Далі учасникам повідомлялася інструкція щодо їх поведінки під час експерименту – за командою експериментатора відкрити пробірку та сприймати запах речовини, яка знаходиться всередині. При цьому обстежуваним пропонувалися три пробірки: дві з одорантами (запахи ефірних олій, які зайняли перше та останнє місце в тесті вибору) та одна пробірка із фільтрувальним папером, змоченим дистильованою водою, яку використовували в якості контрольної. Перебіг експерименту мав наступну схему: 3 хвилини адаптації обстежуваного до умов експерименту, 3 хвилини запису фонові ЕЕГ, 3 хвилини одоростимуляції (дійсної чи уявної). Після закінчення цієї частини дослідження учасникам експерименту пропонували заповнити спеціально розроблений бланк [4] для оцінки запаху за його суб'єктивною приємністю/неприємністю та суб'єктивною шкалою активаційного впливу. Вказана процедура повторювалася тричі – із одорантом, який у попередньому тестуванні був розміщений на першій позиції, із контрольною пробіркою з дистильованою водою, та з одорантом, який у попередньому тестуванні було розміщено на останній позиції.

Регістрація ЕЕГ проводилася за допомогою електроенцефалографа EEG-16S (MEDICOR, Угорщина) у відведеннях Fp1, Fp2, P3, P4, O1, O2, T3, T4 за міжнародною схемою 10-20%. У якості референтного використовувався об'єднаний вушний електрод. Зареєстрована ЕЕГ надалі підлягала комп'ютерному аналізу за допомогою спеціалізованої програми на основі алгоритму швидкого перетворення Фур'є. Серед параметрів ЕЕГ обчислювали спектральні потужності 7 частотних діапазонів: $\theta 1$ (4.0 – 6.0 Гц), $\theta 2$ (6.0 – 7.5 Гц), $\alpha 1$ (7.5 – 9.5 Гц), $\alpha 2$ (9.5 – 11.0 Гц), $\alpha 3$ (11.0 – 13.0 Гц), $\beta 1$ (13.0 – 20.0 Гц) та $\beta 2$ (20.0 – 25.0 Гц). Коефіцієнти асиметрії (КА) обчислювали для усіх вказаних частотних діапазонів за формулою $(L - R) / (L + R)$, де L та R – показники спектральної потужності вказаних діапазонів у лівому (L) та правому (R) відведеннях. Порівнювали отримані для фронтальних, тім'яних, потиличних та скроневих відведень значення КА, розраховані для ЕЕГ до та під час сприйняття суб'єктивно приємних та неприємних запахів. З наявних 101 реакції на ароматичні чинники було обрано лише ті, суб'єктивна оцінка яких становила +3, +4, +5 або -3, -4, -5 (за шкалою ± 5). Обсяги отриманих

вибіркові реакції на негативний запах і 39 – на позитивний. Особливо оцінювали зміни ЕЕГ при пред'явленні пробірки з дистильованою водою ($n=41$).

Значущість відмін досліджуваних параметрів при порівнянні залежних вибірок оцінювали за критерієм знакових рангових сум Вілкоксона. Для порівняння незалежних вибірок застосовували критерій Манна-Уїтні. Вказані процедури обчислювалися у програмному пакеті Statgraphics 5.1 (Manugistics, Inc.).

Результати досліджень та їх обговорення. Аналіз отриманих даних виявив, що в цілому коефіцієнти асиметрії показників ЕЕГ не зазнавали суттєвих змін при сприйнятті запахів як гедонічно оцінених ароматів, так і пробірки з дистильованою водою: з 84 аналізованих пар КА значущих змін зазнавали лише 7.

Сприйняття "запаху" контрольної пробірки з дистильованою водою супроводжувалося змінами КА $\theta 1$ -діапазона фронтальних та скроневих відведень. У стані спокою значення КА свідчили про переважання $\theta 1$ -активності у правому лобному та лівому скроневому відведеннях (в порівнянні з симетричними). Під час виконання проби КА фронтальних відведень змінив знак ($p = 0.04$), а КА скроневих відведень став меншим за модулем (зниження на 3 %, $p = 0.049$).

Позитивна гедонічна оцінка ароматів супроводжувалася змінами КА скроневих областей у $\alpha 3$ та $\beta 1$ -діапазонах. У стані спокою вказані КА були негативними, що означає більший рівень потужності вказаних діапазонів у правій півкулі. Зважаючи на фізіологічну інтерпретацію високочастотної активності, це можна інтерпретувати як свідчення більшого рівня активації правопівкульних відведень. Під час сприйняття ароматів ступінь асиметрії посилювався (на 7 %, $p = 0.001$ та 5 %, $p = 0.012$, відповідно), що свідчить про посилення ступеня активації правої скроневої області кори в порівнянні з лівою.

Сприйняття суб'єктивно неприємних одорантів також супроводжувалося певними змінами досліджуваних показників. Статистично значущі зміни відбувалися у лобних відведеннях і стосувалися спектральної потужності $\theta 1$ і $\alpha 1$ -діапазонів. У $\theta 1$ -діапазоні відбувалася інверсія КА (від переважання правого лобного в бік переважання лівого лобного відведення, $p = 0.02$), подібно до контрольної експерименту. КА $\alpha 1$ -діапазону у стані спокою характеризував домінування вказаної активності правої лобної області. Під час сприйняття одорантів знак КА не змінився, проте зменшився за модулем (на 3 %, $p = 0.047$). Крім цього, відбувалося посилення асиметрії у потиличних відведеннях в бік правої півкулі за показником потужності $\theta 2$ -діапазону (на 4 %, $p = 0.02$).

Таким чином, аналіз отриманих нами даних не виявив очікуваного ефекту змін асиметрії фронтальної активації у бік лівої півкулі при позитивно-емоційній стимуляції, та в бік правої півкулі – при емоційно-негативній, у відповідності до гіпотези [2]. Поряд з цим, слід відмітити, що наші дані дещо не узгоджуються з авторами [5], які знайшли передбачувані теорією зміни фронтальної асиметрії при сприйнятті приємних і неприємних запахів, що, правда, в групі жінок похилого віку. Перше питання, яке може виникнути – чи були використані ольфактивні стимули достатньо значущими для того, щоб впливати на суб'єктивну сферу обстежуваних. Наші попередні результати свідчать, що обстежувані гедонічно оцінювали пропонувані нами стимули на суб'єктивному рівні [4], що підтвердилося і аналізом варіабельності серцевого ритму [6]. Пояснити цей факт можна, виходячи з відомостей про анатомічну організа-

цію різних аналізаторних систем. Так, відомо, що зорова та слухова інформація надходять до кори великих півкуль через специфічні ядра таламуса, далі здійснюється її процесинг неокортикальними сенсорними та асоціативними областями, після чого результат вказаної обробки направляється до керівних (лобних) структур, які аналізують біологічне значення стимулів та формують програму дій. На відміну від цього, ольфактивна інформація поступає здебільшого безпосередньо до лімбічних (емоційних) структур [3], що обумовлює прямий вплив на функціональну активність емоційних механізмів. Такі анатомічні особливості призводять до того, що нюхова інформація у меншому ступені обробляється фронтальними структурами. На суб'єктивному рівні це проявляється у меншому ступені свідомого контролю ольфактивного оточення та меншій вербалізації нюхових відчуттів.

Спробуємо дати інтерпретацію отриманим нами даним, виходячи з наведених вище міркувань. Очікувані нами зміни фронтальної асиметрії спостерігалися у експериментах з дистильованою водою та суб'єктивно негативними запахами, причому стосувалися тільки потужності $\theta 1$ діапазону. Зростання потужності даного діапазону важко напряму зіставити із змінами рівня активації (*arousal*) відповідних ділянок головного мозку, натомість, ми пов'язуємо такі зміни із активацією функції селективної уваги. Переміщення ж фокусу цієї активності в ліву фронтальну область може бути специфікою обробки ольфактивної інформації і потребує подальших досліджень. Крім цього, зміна фронтальної асиметрії при сприйнятті негативних запахів була зареєстрована стосовно потужності $\alpha 1$ -діапазону ЕЕГ. Вказані зміни свідчили про зменшення рівня вказаної активності у правій півкулі і, якщо розглядати низькочастотну частину α -діапазону як прояв неактивного стану головного мозку, то певним чином суперечили вихідній моделі. На відміну від негативних запахів, сприйняття суб'єктивно приємних одорантів супроводжувалося змінами асиметрії скроневих областей, причому проявлялося це не у динаміці низькочастотної частини спектру ЕЕГ, а відносно високочастотної його частини – $\alpha 3$ та $\beta 2$, що інтерпретується нами як свідчення певного зростання рівня активації правої півкулі. Відповідно до моделі В. Хеллер [2], це є свідченням більшого рівня неспецифічної активації, яка супроводжує емоційне вираження. Слід зазначити, що певний відсоток обстежуваних дійсно характеризувався пропонувані позитивні аромати як активуючі [4].

Висновок. Емоційні процеси, обумовлені впливом ольфактивної інформації, мають інші закономірності залучення фронтального неокортекса, ніж емоційні процеси, пов'язані з аналізом зорової або слухової інформації.

1. Lorig T. S. Human EEG and odor response // *Progress in Neurobiology* – 1989 – V. 33. 2. Heller W. Neuropsychological mechanisms of individual differences in emotion, personality, and arousal // *Neuropsychology* – 1993 – V. 7, No 4. 3. Макачук Н. Е., Калюев А. В. Обоняние и поведение – К.: КСФ – 2000. 4. Чернинский А. А., Зима И. Г., Макачук Н. Е., Писхорская Н. Г., Крижановский С. А., Тукаев С. В. Особенности субъективной оценки человеком запахов растительных эфирных масел // *Нейронауки* – 2005 – № 2 – С.26-28. 5. Kline J. P., Blackheart G. C., Woodward B. M. et al. Anterior electroencephalographic asymmetry changes in elderly women in response to a pleasant and an unpleasant odor // *Biol. Psychology* – 2000 – V. 52, No 3. 6. Чернинский А. О., Зима И. Г., Макачук М. Ю. та ін. Обумовлення різних патернів активації автономної нервової системи людини характером суб'єктивної оцінки рослинних ароматів // *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Проблеми регуляції фізіологічних функцій* – 2006 – № 11.

Надійшло до редколегії 01.03.10

УДК 57.048+57.024

В. Пахольченко, асп., Е. Тукаленко, канд. біол. наук,
С. Данилов, канд. біол. наук, М. Макачук, д-р біол. наук

РІВЕНЬ ТРИВОЖНОСТІ У ТВАРИН З РІЗНИМ ДОСВІДОМ СОЦІАЛЬНИХ ВЗАЄМОДІЙ

Вивчено зміни рівня тривожності у щурів після хронічного соціального стресу. Використано адаптовану для щурів методику соціального стресу, в якій протягом щоденних зоосоціальних контактів у тварин встановлюється певні ієрархічні відносини, при цьому один з пари щурів набуває досвіду перемог, в інший – поразок. Встановлено, що у тварин, що мали досвід перемог загальний рівень тривожності не відрізняється від рівня контролю, тоді як рівень соціальної тривожності зменшується. У тварин, що мали досвід поразок спостерігався підвищення рівня соціальної та обумовленої тривожності, тоді як рівень загальної тривожності не відрізнявся від тварин з досвідом перемог. Можна зробити висновок, що зміни поведінки спостерігаються не лише у переможених, але і у тварин з досвідом перемог, хоча ці зміни мають не лише кількісні, а і якісні відмінності.

Changes in anxiety level were measured in rats subjected to chronic social stress. Novel adapted social stress model was used that allows rats to ascertain their zoosocial relation so that one of the rats obtains experience of winning and another – became a loser. After chronic social stress anxiety changes in different way in rats with experience of winning or losing. General anxiety in rats with experience of winning doesn't differ from control animals, whereas level of social anxiety even decreases. Increasing of social and conditioned anxiety was observed in animals with experience of losing, but level of general anxiety didn't vary from rats with experience of winning. One can conclude that changes in behavioral activity and anxiety level observe in both "winners" and "losers", and these changes have qualitative, but not just quantitative character.

Вступ. Соціальний стрес є одним з найбільш розповсюджених факторів розвитку різноманітних психічних та нервових порушень, в тому числі розладів адаптації таких як стан підвищеної тривожності, депресивноподібні порушення, тощо [1]. Зазвичай зміни поведінки після стресу пов'язують з досвідом поразок протягом соціального стресу, не звертаючи уваги на тварин, що мали досвід перемог [2]. Крім цього, більшість дослідників використовують моделі соціального стресу в яких експериментатором наперед визначені "переможці" та "переможених". Наприклад, це різноманітні модифікації моделі конфлікту, коли в клітку до більшого за масою і такого що проживає з самкою щура (резидент) вміщують меншого щура, який наперед є соціально переможеним (інтродуктор) [3]. Дана модель дозволяє чітко поділити щурів на "переможців" та "переможених", однак не дозволяє враховувати індивідуально-типологічні особливості щурів, які впливають на набуття статусу "переможця" і "переможеного". В нашому дослідженні ми використовували методику соціального стресу, що надає обом з пари щурів можливість стати "переможцем" чи не вступати в агоністичні контакти. Такий повторюваний протягом 14 діб досвід призводить до формування певного поведінкового стереотипу.

При цьому оцінка поведінкових реакцій проводилась з використання тестів, що дозволяють не лише оцінити загальний рівень тривожності, а більш специфічно визначити окремі аспекти тривожності, що можуть змінюватись під впливом соціального стресу. Отже, метою нашої роботи було оцінити рівень загальної, соціальної та обумовленої тривожності у щурів з різним досвідом соціальних взаємодій.

Об'єкт та методи досліджень. Дослідження було проведено на 56 білих самцях щурах масою 280±47 г на початку експерименту, що утримувались в стандартних умовах віварію з вільним доступом до води та їжі. Всі маніпуляції з тваринами проводились у відповідності до біоетичних норм. Протягом експерименту тварин зважували періодично для контролю ваги. На початку експерименту всіх тварин тестували у тестах "Відкрите поле" та "Чорно-біла камера". Після тестування щури були рандомізовано поділені на 2 групи:

I групу (n=20) склали тварини, які служили контролем. Тварини цієї групи впродовж дослідження утримувались в стандартних умовах віварію та не мали досвіду соціальних взаємодій

II групу (n=36) утворювали тварини, що мали досвід дії соціального стресу протягом 14 днів. Після закінчен-

ня періоду стресу щурів II групи ділили на наступні підгрупи: до підгрупи II-w нами були віднесені щури, що мали досвід перемог, до підгрупи II-l – щури, що мали досвід поразок та до підгрупи II-c – так звані "компромісні щури", які не вступали в агоністичну взаємодію.

Процедура соціального стресу [4], використана в даному дослідженні, була організована таким чином, що за 5 днів до початку стресу щури розміщувались у індивідуальних клітках для зняття попереднього соціального досвіду. Після цього на одну добу щурів приблизно однакової ваги розміщували парами у клітках з прозорою плексигласовою перегородкою з отворами, яка надає можливість візуального та нюхового, але не фізичного контактів. Наступного дня кожна пара щурів зазнавала наступних маніпуляцій: адаптаційний період – 3 хв, зняття перегородки на 10 хв для соціальних взаємодій. Протягом 10-хвилинного періоду підраховувались кількість успішних атак у кожного щура, кількість садок на партнера. Успішною атакою вважали завалювання щура на спину і утримування його в такому положенні більше 3-4 сек. Така схема повторювалась кожен день протягом 14 діб. Таким чином кожний щур протягом досвіду соціальних взаємодій мав рівний шанс стати як переможцем, так і переможеним. Тварини що мали 10 і більше перемог або поразок визнавались відповідно щурами з досвідом перемог або поразок. Тварини з рівною кількістю перемог та поразок або такі що не проявляли агоністичних взаємодій визначались як компромісні тварини.

Після соціального стресу або після відповідного періоду для контрольної групи всіх щурів послідовно тестували у:

Хрестоподібному припіднятому лабіринті (ХПЛ). В ХПЛ щура на 5 хв. розміщували на припіднятій Х-подібній алеї та оцінювали загальний рівень тривожності і дослідницької активності. Для оцінки безпосереднього ефекту соціальних взаємодій щурів II групи тестували в ХПЛ через 30хв після останнього досвіду соціального стресу, а щурів I групи приблизно в той же час доби, що і тварин II групи.

Тесті соціальних взаємодій, коли експериментальна тварина поміщалася у клітку з іншим щуром (індиферентним). При цьому оцінювали рівень соціальної тривожності. Показником підвищеного рівня тривожності вважали зниження активності експериментального щура направленої на індиферентного щура. Додатково за кількістю вставань на задні лапи оцінювали рівень дослідницької активності.

Тесті захисного риття (ЗР тест) – тварина розміщується у стандартній клітці, з однієї із стінок якої виступав металевий стрижень на який подавався струм приблизно 1 мА. Щур отримувал удар струмом, як правило, через 1-3 хв після розміщення в клітці. Після цього протягом 10 хв оцінювали час риття матеріалу підстилки та висоту заритого. Риття у напрямку небезпечного предмету є видоспецифічною реакцією гризунів у відповідь на наявність загрозливого об'єкту. Даний тест дозволяє оцінити рівень обумовленої тривожності за тривалістю риття, а також визначити стиль пристосування тварини (активний/пасивний) за наявністю чи відсутністю реакції риття як такої.

Статистичний аналіз отриманих даних проводили за допомогою програми Statistica 7.0. За критерієм Шапіро-Уїлка визначили, що дані поведінкової активності належать до ненормально розподілених. Тому ці дані аналізували за допомогою непараметричних критеріїв Манна-Уїтні та Крускала-Уоліса. Критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез приймали рівним 0,05.

Результати та їх обговорення. Аналіз даних тестування у тестах "Відкрите поле" та "Чорно-біла камера" до початку процедури соціального стресу не виявив суттєвої різниці між поведінковою активністю та рівнем тривожності у щурів, які в майбутньому мали досвід перемог та поразок. Було виявлено, що у щурів, які в майбутньому мали досвід поразок, рівень дослідницької активності у тесті "Відкрите поле" за показником кількості вставань на задні лапи біля стінки був достовірно менший ($p=0,02$) в порівнянні з щурами з досвідом перемог.

Важливо підкреслити, що вага тварин в нашому дослідженні динамічно змінювалася у різних груп і в різні фази експерименту. На початку експерименту вага тварин у підгрупах не відрізнялась статистично значуще. При зважуванні тварин після закінчення періоду стресу виявлено статистично значущу різницю у вазі тварин з досвідом перемог (підгрупа) та поразок (). При цьому тварини підгрупи II-w достовірно більше ($p=0,003$), ніж тварини підгрупи II-l. Крім цього, приріст ваги у тварин з досвідом перемог був достовірно вищим ($p=0,01$), ніж навіть відповідний приріст у контрольних тварин.

При тестуванні у Хрестоподібному припіднятому лабіринті (ХПЛ) було виявлено, що у щурів з досвідом перемог та у компромісних тварин кількість уринацій була достовірно вищою ($p=0,03$ та $p=0,03$ відповідно) в порівнянні з контрольними щурами. Однак при цьому ми не виявили достовірної різниці у рівні загальної тривожності між щурами різних груп.

У тесті соціальних взаємодій у щурів підгруп II-w та II-c збільшувався час контактів з індивідуальним щуром ($p=0,00006$ та $p=0,001$ відповідно) в порівнянні з контрольними тваринами. Крім того, відмічалось зменшення дослідницької активності за показником кількості вставань на задні лапи у щурів II-w підгрупи ($p=0,001$), II-l ($p=0,0004$) та II-c ($p=0,0007$) підгруп. Виявилося, що щури з досвідом перемог мали статистично значуще більшу тривалість контактів з індивідуальним щуром ($p=0,01$) та більшу кількість вставань на задні лапи ($p=0,02$) в порівнянні з тваринами II-l підгрупи.

В тесті захисного риття не було відмічено достовірних відмінностей у часі або висоті заривання електрифікованого стрижня між щурами різних підгруп. Однак було виявлено відмінності між групами у співвідношенні тварин, що демонстрували поведінку заривання стрижня та такими, що не заривали стрижень протягом всього періоду тестування. В контрольній групі 30% (6 з 20 щурів) щурів заривали стрижень протягом тесту, серед щурів з досвідом перемог заривали стрижень 3 з 10 щурів (30%),

тоді як тільки 1 з 11 (9%) щурів в підгрупі щурів з досвідом поразок заривали стрижень. Серед компромісних тварин не було жодного щура, який демонстрував поведінку заривання стрижня. Крім того, у щурів підгрупи II-w спостерігалася тенденція до більшої тривалості риття ($p=0,08$) у порівнянні з тваринами II-l підгрупи.

Отримані результати вказують на гетерогенність змін рівня тривожності після соціального стресу, що доводить необхідність тестування тварин у батареї тестів для більш повної характеристики поведінкових зрушень після стресу. Слід зазначити, що нами практично не виявлено різниці у рівні загальної тривожності між щурами з досвідом перемог та поразок, що може свідчити про несформованість певного поведінкового репертуару "переможця" та "переможеного". Але наявність відмінностей у тестах соціальної та обумовленої тривожності дозволяє припустити специфічний вплив соціальних взаємодій на окремі аспекти тривожності. Збільшення тривалості контактів у тесті соціальних взаємодій у тварин підгрупи II-w можна пояснити зменшенням рівня соціальної тривожності в порівнянні з контрольними та тваринами підгрупи II-l. Ми не виявили і очікувану різницю у тривалості контактів між контрольним та щурами з досвідом поразок, що можна пояснити умовами проживання щурів: контрольні щури проживали групами та мали соціальні контакти з постійними партнерами по клітці, тому контакт з незнайомим самцем можливо призвів до збільшення рівня соціальної тривожності. Більший рівень дослідницької активності у контрольних щурів у порівнянні з усіма іншими групами може свідчити про збільшення саме соціальної тривожності на фоні незмінного рівня загальної тривожності. З іншого боку, у щурів з досвідом поразок спостерігається зменшення дослідницької активності у порівнянні з іншими підгрупами і зменшення тривалості контактів у порівнянні з "переможцями", що може свідчити про збільшення соціальної та загальної рівня тривожності. Зниження дослідницької активності у щурів з досвідом перемог та у компромісних щурів можна пояснити збільшенням тривалості контактів. Іншими словами, за таких умов спостерігається перерозподіл відсотку часу витраченого на дослідження соціальних (індиферентний щур) та несоціальних (клітка) стимулів. Цікаво відмітити, що компромісні тварини більш схожі на щурів з досвідом перемог, ніж на щурів з досвідом поразок у тесті соціальних взаємодій. Вірогідно це пояснюється відсутністю аверсивного досвіду соціальних взаємодій. Відсутність різниці у тесті захисного риття за показниками висоти риття та часу витраченого на риючу поведінку можна пояснити тим, що в більшості випадків щури демонструють дві протилежні реакції: після удару струмом та періоду дослідження стрижня щур або демонструє поведінку замирання та не підходить до зонду і відповідно не проявляє риючої поведінки, або ж після періоду дослідження спостерігається риюча поведінка і в такому випадку стрижень заривається на приблизно однакову висоту. Такі результати можуть свідчити про гетерогенність показників цього тесту, тобто можливо що тривалість поведінки риття може вказувати на рівень обумовленої тривожності, а показник наявності або відсутності поведінки риття – на стиль реагування тварини на стресор (в даному випадку – удар струмом) [5]. Виходячи з цього, можна зробити висновок, що в нашому експерименті у тварин після соціального стресу практично не змінювався рівень обумовленої тривожності, за винятком тенденції до більшого її рівня у тварин з досвідом поразок. Однак спостерігались відмінності між підгрупами тварин у стилях пристосування.

Відсоток щурів з активним типом пристосування не відрізнявся у тварин підгрупи II-w та у контрольних щурів, тоді як серед компромісних тварин не було виявлено жодної тварини з активним стилем пристосування, що може бути пов'язано з відсутністю у них переважання перемог або поразок та відсутністю аверсивних взаємодій як таких. За останніми уявленнями [6] стиль пристосування переважно є вродженою характеристикою, хоча може до певної міри змінюватись під впливом життєвих чинників. Потребує подальших досліджень питання про причину різниці у кількості тварин з активною та пасивною стратегією пристосування між щурами з досвідом перемог, поразок та компромісними тваринами. Така різниця може пояснюватись вихідною різницею між тваринами до впливу стресу або ж різним впливом стресу на тварин з різним досвідом соціальних взаємодій. Однак, напевне можна сказати що наявна в нашому дослідженні різниця у кількості тварин з активним стилем пристосування вказує на взаємозв'язок стилю пристосування та поведінки в умовах соціального стресу.

Висновки. 1. У щурів з досвідом перемог спостерігається зменшений рівень соціальної тривожності, зменшений рівень обумовленої тривожності у порівнянні з щурами з досвідом поразок. 2. У щурів з досвідом поразок спостерігається збільшення соціальної та обумовленої тривожності в порівнянні з контрольними щурами

та щурами з досвідом перемог. 3. Після соціального стресу спостерігається різниця у співвідношенні щурів з активним та пасивним стилем пристосування. Найменше щурів з активним стилем пристосування спостерігається у компромісних тваринах. У щурів з досвідом перемог кількість тварин з активним стилем пристосування не відрізнялась від контрольних тварин і була найбільшою. 4. Зміни поведінки після соціального стресу спостерігаються не лише у переможених, але і у тварин з досвідом перемог, хоча ці зміни мають кількісні і якісні відмінності.

1. Gruenewald T., Kemeny M., Aziz N. Subjective social status moderates cortisol responses to social threat // *Brain, Behavior, and Immunity*. – 2006. – Vol. 20. – P. 410–419.
2. Kollack-Walker S., Watson S.J., Akil H. Social Stress in Hamsters: Defeat Activates Specific Neurocircuits within the brain // *The Journal of Neuroscience*. – 1997. – Vol. 22. – P. 8842–8855.
3. Huhman K. Social conflict models: Can they inform us about human psychopathology? // *Hormones and Behavior*. – 2006. – Vol. 50. – P. 640–646.
4. Kudryavtseva N. The sensory contact model for the study of aggressive and submissive behaviors in male mice // *Aggr. Behav.* – 1991. – Iss.17. – Vol. 5. – P. 285–291.
5. DeBoer S., Koolhaas J. Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology // *European Journal of Pharmacology*. – 2003. – Vol. 463. – P. 145–161.
6. Koolhaas J., de Boer S., Buwalda B., van Reenen K. Individual Variation in Coping with Stress: A Multidimensional Approach of Ultimate and Proximate Mechanisms // *Brain Behavioral Evolution*. – 2007. – Vol. 70. – P. 218–226.

Надійшла до редколегії 24.02.10

УДК 57.042+57.024+591.513.2

О. Бондаренко, студ., Т. Говоруха, канд. біол. наук, ст. наук. співроб.,
О. Коваленко, асп., М. Макачук, д-р біол. наук

ЗДАТНІСТЬ ДО НАВЧАННЯ ТА ПЕРЕКИСНЕ ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ У МОЗКУ ЩУРІВ З РІЗНОЮ СХИЛЬНІСТЮ ДО АЛКОГОЛІЗМУ

У щурів з різним ступенем алкогольної мотивації після хронічної алкоголізації досліджено здатність до навчання в радіальному лабіринті, а також інтенсивність ліпопероксидних процесів в тканинах мозку цих щурів. Показано неоднакову ліпопероксидну реактивність тканин мозку щурів з різним ступенем алкогольної мотивації, щури що не надають перевагу алкоголю мають більшу ліпопероксидну реактивність. Щури що надають перевагу алкоголю мають різноспрямований вплив етанолу на відтворення умовної реакції.

The learning ability of rats with different degree of alcoholic motivation was investigated in the complex radial maze, after chronic alcoholic intoxication. Also the intensity of lipid peroxidation in brain tissues of these rats was explored. It was shown different lipid peroxidation's reactivity of brain tissues in rats with different degree of alcoholic motivation. The more intensity of lipid peroxidation in alcohol nonpreferring rats was demonstrated. The different oriented influence of ethanol on recall conditional response in alcohol preferring rats was demonstrated.

Вступ. Відомо що алкоголь викликає цілу низку змін в організмі як людини, так і тварин, в тому числі порушує когнітивні функції, оскільки навіть невеликі дози етанолу ускладнюють утворення умовних рефлексів. Крім вищезгаданих змін поведінки алкоголь не менш значимо порушує процеси окисного гомеостазу [4]. Самі ж процеси перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) відіграють важливу роль у реалізації і розвитку різних стрес-реакцій та патологічних процесів, включаючи і алкогольну інтоксикацію, яка вважається одним із найбільш небезпечних факторів захворюваності та смертності [3, 4].

Метою роботи була оцінка здатності до навчання в радіальному лабіринті щурів в залежності від схильності до вживання етанолу, та процесів ПОЛ.

Об'єкт та методи досліджень. Досліди були проведені в умовах хронічного експерименту на 75 білих нелінійних щурах-самцях масою 150–200 г. Тварин утримували на стандартному раціоні виварію і вільному доступі до води та їжі. Винятком був режим харчування експериментальних тварин протягом перших 5 діб навчання умовній реакції з харчовим підкріпленням в радіальному лабіринті – тварини отримували 25% від раціону їжі, але при цьому не обмежувався доступ до води.

Умовний рефлекс виробляли за методикою Я. Буреша і співав. (1991) у радіальному лабіринті (РЛ)

впродовж 14 діб. При цьому щури здійснювали по одній пробіжці в день до годівнички, де як підкріплення використовували шматочок твердого сиру розміром 4 мм. При аналізі кожної пробіжки враховували латентний період (ЛП, с), акт прийому їжі, а також кількість та характер помилок (вибір неправильного рукава без підкріплення, повторний захід у рукави з підкріпленням) [1]. Через 14 діб після початку тестування в РЛ, тварин ділили на тих що добре навчаються (ДН) і тих що погано навчаються (ПН). Протягом періоду алкоголізації проводили тестування щурів в РЛ з метою підтримання виробленої навички. Після завершення алкоголізації проводили перевірку поведінки щурів в РЛ. При тестуванні тварин аналізувались останні тестування перед алкоголізацією та 2-а і 8-а доба після завершення введення етанолу.

Хронічну алкоголізацію тварин проводили в два етапи:

На I етапі визначали схильність щурів до етанолу за допомогою "двох пляшкового" методу. Тварин, які не мали до цього контакту з етанолом саджали на 14 діб в індивідуальні клітки, які оснащені двома поїлками: одна з водою, інша з 15% розчином етанолу. Протягом цієї фази тварини впродовж 24 годин мали вільний вибір між розчином етанолу та водою.

На II етапі, проводили примусову алкоголізацію шляхом введення тваринам етанолу, як єдиного джерела рідини, але без харчової депривації впродовж місяця. Через 30 днів для оцінювання індивідуального рівня вживання алкоголю кожну тварину на 4 дні саджали в індивідуальну клітку з двома поїлками (одна з водою, інша з 15% розчином етанолу).

Розташування поїлок змінювалось для виключення формування умовного рефлексу на їх певне положення.

Про формування експериментального алкоголізму судили, враховуючи наступні показники: 1) індивідуальний об'єм випитого спирту за одиницю часу (не менш ніж 5 г/кг за добу); 2) відсоткове співвідношення випитого спирту до об'єму всієї рідини (не менш ніж 60%) [5]. Після встановлення вихідного рівня вживання води та розчину етанолу тварин поділили на алкоголь-залежних і алкоголь-незалежних [2].

Після завершення навчання в РЛ і алкоголізації щурів були поділені на 6 груп:

I група – "контроль ДН" – інтактні тварини, що добре навчалися в РЛ;

II група – "контроль ПН" – інтактні тварини, що погано навчалися в РЛ;

III група – "алкоголь-залежні ДН" – тварини, що під час алкоголізації надавали перевагу етанолу і добре навчалися в РЛ;

IV група – "алкоголь-залежні ПД" – тварини, що під час алкоголізації надавали перевагу етанолу і погано навчалися в РЛ;

V група – "алкоголь-незалежні ДН" – тварини, що під час алкоголізації надавали перевагу воді і добре навчалися в РЛ;

VI група – "алкоголь-незалежні ПН" – тварини, що під час алкоголізації надавали перевагу воді і погано навчалися в РЛ.

Після закінчення алкоголізації та тестування в РЛ (радіальному лабіринті) у тварин брали для біохімічного аналізу мозок. Інтенсивність ліпопероксидних процесів у гомогенатах мозку оцінювали за тестом з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК), запропонованим Стальною та Гаришвілі [6]. Вміст ТБК-активних продуктів виражали в наномолях у розрахунку на 1г сирової маси тканини.

Статистичний аналіз даних проводили за допомогою програми Statistica 7.0. Згідно критерію Шапіро-Вілکا виявилось, що вибірки даних активності поведінки належать до ненормально розподілених, а вибірки даних показників інтенсивності ПОЛ у мозку – до нормально розподілених. Тому поведінкові показники обробляли за допомогою непараметричного критерію Манна-Уїтні та представляли у вигляді медіани та 25% і 75% квартилів. Для порівняння динаміки змін показника з часом при багаторазовому використанні одного тесту використовували критерій Вілкоксона. Критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез приймали рівним 0,05.

Результати та їх обговорення. Після завершення алкоголізації на основі прийнятих нами критеріїв, тварин було розділено на алкоголь-залежних і алкоголь-незалежних у співвідношенні 19/37. Загалом це говорить про відносно невисокий відсоток особин в популяції, які схильні до алкоголізму. При цьому в групі щурів, які надавали перевагу алкоголю, кількість тварин, що добре навчалися, достовірно не відрізнялась від кількості тварин, що погано навчалися. В групі тварин, які не надавали перевагу алкоголю, кількість щурів, що добре навчалися була достовірно меншою ($p=0,04$) ніж кількість щурів, що погано навчалися (співвідношення становить 13/24).

За результатами тестувань після завершення алкоголізації у контрольних груп щурів (I група і II група) кількість помилок та тривалість ЛП реакції протягом експерименту достовірно не змінювались. На відміну від алкогольیزованих груп, у яких ці показники протягом експерименту збільшувались.

В алкогольизованих груп в порівнянні з контрольними достовірно вище показники ЛП умовної реакції з харчовим підкріпленням у РЛ (у групах алкоголь-залежних: III групи ($p=0,04$) і особливо у IV групи ($p=0,003$); у групах алкоголь-незалежних: V групи ($p=0,02$) і VI групи ($p=0,002$)). У щурів контрольних груп по відношенню до алкогольизованих груп достовірно знижуються показники ЛП, а особливо у тих тварин, які погано навчалися (II група ($p=0,002$)). Що свідчить про пригнічуючий ефект хронічної алкоголізації протягом 48 днів, на відтворення умовної реакції з харчовим підкріпленням.

Виявлено відмінності між алкоголь-залежними і алкоголь-незалежними тваринами у кількості помилок в РЛ після алкоголізації, у алкоголь-незалежних тварин спостерігається збільшення кількості помилок після завершення алкоголізації. У III групі в порівнянні з V групою кількість помилок після алкоголізації була більшою ($p=0,007$), так само у IV групі і VI групі ($p=0,007$). Окрім того у алкоголь-незалежних тварин збільшувалась кількість помилок в порівнянні з показниками до початку алкоголізації, як у VI групі ($p=0,04$) так і у V групі ($p=0,007$), особливо у останніх. При чому, у V групі збільшувалась кількість пробіжок в рукави без підкріплення ($p=0,04$), а у тварин VI групи окрім того, що збільшується кількість пробіжок в рукави без підкріплення ($p=0,006$) (яка є набагато більшою, ніж у попередньої групи тварин), також зростає кількість повторних пробіжок в рукави з підкріпленням ($p=0,02$). У групі алкоголь-залежних тварин статистично значущого зростання кількості помилок після алкоголізації не знайдено. Такі відмінності між групами алкоголізації свідчать про посилення негативного впливу алкоголю на процеси навчання саме при відсутності алкогольної мотивації, особливо у тварин, які до алкоголізації добре засвоювали умовний рефлекс.

Що ж стосується актів прийому їжі, то до початку алкоголізації тварини, що добре навчалися показали 100% засвоєння умовної реакції, тобто всі щури, які досягали годівнички здійснювали акт прийому їжі. У тварин, що погано навчалися був низький рівень засвоєння умовної реакції. У контрольних тварин групи I і групи II кількість актів прийому їжі достовірно не змінювалась протягом всього експерименту. Після алкоголізації у групах алкоголь-незалежних тварин відбувається зниження кількості актів прийому їжі у VI групи ($p=0,04$), а особливо у V групи ($p=0,007$). Також, деяке зменшення кількості актів прийому їжі відбувається в групах алкоголь-залежних тварин.

Результати вивчення впливу алкоголізації та процесу навчання в РЛ на інтенсивність ліпопероксидних процесів у тканинах мозку щурів представлені в рисунку 1.

Видно, що тривале вживання етанолу щурами з вираженою алкогольною мотивацією (алкоголь-залежних) достовірно знижує рівень ТБК-активних продуктів в тканині мозку цих тварин в порівнянні з контролем та в порівнянні з групою щурів з низькою алкогольною мотивацією (алкоголь-незалежних). Тобто в групах тварин, які надають перевагу алкоголю спостерігався найнижчий рівень ліпопероксидних процесів як у тварин, що добре навчалися (по відношенню до групи контроль ($p=0,03$); по відношенню групи алкоголь-залежних ($p=0,002$)) так і у тих що погано навчалися в РЛ (по відношенню до гру-

пи контроль ($p=0,04$); по відношенню до груп алкоголь-залежних ($p=0,0001$)).

Інша ситуація спостерігається в групах тварин з низькою алкогольною мотивацією (алкоголь-незалежних). Вони мали найвищий рівень ліпопероксидних процесів у тканинах мозку, причому як у тих тварин, що добре навчалися, так і у тих, що погано навчалися, він був достовірно вищий за показники контрольної групи: (тварини, що добре навчаються ($p=0,001$); тварини, що погано навчаються ($p=0,0002$)) та показники групи алкоголь-

залежних тварин (тварини що добре навчаються ($p=0,002$); тварини, що погано навчаються ($p=0,0001$)). Група контрольних тварин займає проміжне положення за рівнем ліпопероксидних процесів в тканинах мозку щурів між двома групами алкоголізації.

Між тканинами мозку щурів, що добре навчаються і тих, які погано навчаються як серед контрольних тварин так і у алкоголь-залежних і алкоголь-незалежних щурів достовірної різниці в рівнях ПОЛ не виявлено.

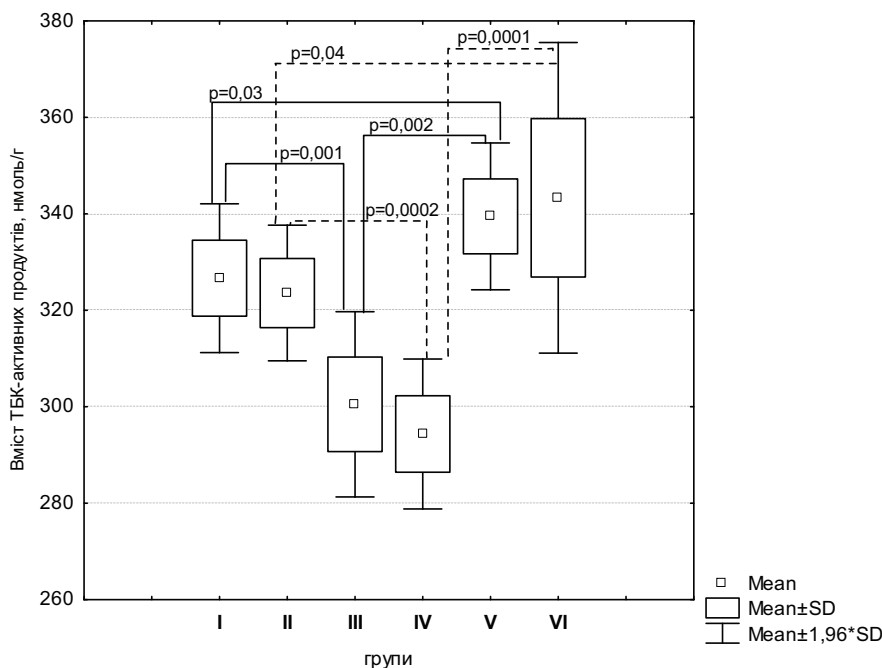


Рис. 1. Вміст ТБК-активних продуктів у гомогенатах мозку щурів після впливу хронічної алкоголізації та навчання в РЛ (n=42)

Таким чином у групах щурів з експериментальним алкоголізмом кількість помилок та рівень ЛП умовної реакції в РЛ (радіальному лабіринті) зростає протягом експерименту і є достовірно більшим у порівнянні з групами контролю, особливо у тварин алкоголь-незалежних груп. Це свідчить про пригнічуючий вплив хронічної алкоголізації протягом 48 діб на швидкість навчання і відтворення умовної реакції з харчовим підкріпленням, особливо у тварин з низьким ступенем алкогольної мотивації.

Отримані результати ілюструють неоднакову інтенсивність ліпопероксидних процесів у тканинах мозку щурів, які мають різний ступінь алкогольної мотивації. Максимальний антиоксидантний ефект етанолу проявлявся в тканині мозку тварин, які надавали перевагу етанолу (алкоголь-залежні), він був значно нижче показників групи контроль, можливо внаслідок зрушення природного антиоксидантного балансу тканини. Інша ситуація в групі алкоголь-незалежних щурів, для яких характерна протилежна реакція. Для цієї групи тварин є характерним максимальний прооксидантний ефект етанолу, який значно вище за рівень алкоголь-залежних щурів і щурів групи контроль.

Такий вплив етанолу на мозкову тканину у тварин з високою алкогольною мотивацією (алкоголь-залежних) може бути пов'язаний з тим, що етанол може мати певні антиоксидантні властивості. Алкоголь-незалежні тварини мали менший ступінь алкоголізації, оскільки за

методикою на початку алкоголізації надавали перевагу воді, вибираючи між нею та етанолом.

Висновки. 1. Хронічне вживання етанолу спричиняє достовірне зниження швидкості навчання і відтворення умовної реакції з харчовим підкріпленням у тварин із низькою алкогольною мотивацією порівняно зі щурами, що надають перевагу алкоголю. 2. Максимальний антиоксидантний ефект етанолу проявляється у тварин, які надавали йому перевагу, а максимальний прооксидантний ефект етанолу у тварин, які не виявляли бажання вживати алкоголь. 3. Між тканинами мозку щурів, що добре навчаються і тих, які погано навчаються як серед контрольних тварин так і у щурів з різною алкогольною мотивацією достовірної різниці в рівнях ПОЛ не виявлено.

1. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д.П. // Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения – М.: Медицина. – 1991.
2. Власова Н.В., Родионов А.П. // Фармакокинетика этанола и предрасположенность животных к добровольной алкоголизации. – М.: Медицина. – 1988.
3. Дегтярева Е.А. // Мед. всесвіт. – 2002. – Т. 2, № 1-2, с. 124-133.
4. Ерышев О.Ф., Рыбакова Т.Г., Шабанов П.Д. // Алкогольная зависимость. – СПб.: Издательство "ЭЛБИ-СПб" – 2002.
5. Пархоменко Ю.М., Донченко Г. В., Пилипчук С. Ю. // Український біохімічний журнал. – 2007. – Т. 79, № 3, с.62-68.
6. Стальная И.Ю., Гаришвили Т.Г. Методы определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии / Под. ред. проф. В.Н. Ореховича. – М.: Наука – 1981.

Надійшла до редколегії 02.02.10

УДК 581.1.001

Н. Грудіна, провідний інженер, Л. Бацманова, канд. біол. наук,
В. Стороженко, канд. біол. наук

ПРЕАДАПТАЦІЯ ЯК ЕЛЕМЕНТ ТА ФАКТОР ФОРМУВАННЯ НЕСПЕЦИФІЧНОЇ СТІЙКОСТІ РОСЛИН

В огляді висвітлено розвиток уявлень щодо явища преадаптації. Подані основні положення концепції преадаптації провідних вчених цієї галузі. Обговорюється питання врахування преадаптацій з метою підвищення стійкості рослин.

The data about development of conceptions about preadaptation phenomenon are presented in the review. The basic aspects of preadaptation concept by leading scientists in this branch are resulted. The problem of consideration of preadaptation for purpose of plant resistance increase is discussed.

Екологічне випробування нових сортів і гібридів, поза своїм природним ареалом, дає можливість з'ясувати фенотипову та фізіологічну реакцію рослин на змінені умови місцезростання, прогнозувати поширення та закріплення в новій екологічній ніші новоствореного сорту. Такий підхід у селекційній роботі стикається з явищем преадаптації, як одного із способів освоєння рослинними угрупованнями нових територій існування. Основними факторами подальшої інтенсифікації агро-виробництва в сучасних умовах будуть біологізація та екологізація рослинництва на основі керування потенціалом онтогенетичної та філогенетичної адаптації компонентів агроценозів. Одним із шляхів управління ростом і розвитком рослин в онтогенезі та покращення їхньої продуктивності є підбір таких впливів, які збільшують рівень "корисних" ознак в певній фазі онтогенезу рослин, тому розвиток вчення про преадаптацію видається надзвичайно актуальним як у практичному, так і теоретичному аспектах [5].

Так, кожен вид організмів має різні пристосування, які дають йому можливість існувати в умовах відмінних від оптимальних, та сприяють його поширенню як виду. Пристосування виду до змін навколишнього середовища в межах адаптаційної еволюції має три складові: преадаптація, адаптація, постадаптація.

Термін "преадаптація" (від латинського прае – попереду, перед і адаптація), введений у біологічну науку французьким дослідником Леонардо Кено в 1901 році для означення явища попереднього пристосування. Автор преадаптацію розглядав як "такі особливості організму, що виникають як випадкові варіації і, є ще некорисними або напівкорисними за даних умов існування, тобто є тими, що не мають значення, але із зміною умов існування будуть готовими пристосуваннями, корисними за нових умов" [14, с. 76].

Разом з тим, антидарвінівське трактування цього явища, висунене Кено та його послідовниками, призвело до того, що феномену не надавали належної уваги як закордонні, так і вітчизняні дослідники. Як показує аналіз дискусії навколо проблеми преадаптації, ще немало і сучасних дослідників відкидають реальність цього явища, базуючись на твердженні, що саме поняття преадаптації за будь-якого тлумачення включає в себе телеологічний зміст. Існує думка, що термін "преадаптація" є двозначним, оскільки ранні генетики і сучасні дослідники трактують його по-різному. Прихильники синтетичної теорії еволюції відмічають, що термін "преадаптація" в раціональному його розумінні не несе в собі ніякого телеологічного забарвлення і може бути прийнятим, а причиною обережного відношення до проблеми є недостатнє її опрацювання.

За час свого існування концепція преадаптації зазнала значних змін, і нині її положення суттєво відрізняються від поглядів Кено. Вона охоплює різноманітні процеси і явища пов'язані з розвитком нових пристосувань у організмів. Ці процеси і явища можуть відноси-

тись до особливостей будови, фізіології, індивідуального розвитку, поведінки і способу їх життя.

Сучасна концепція преадаптації містить два основні аспекти – генетико-екологічний і морфо-функціональний [8]. Так, генетико-екологічний підхід розглядає в якості преадаптаційних нейтральні особливості фенотипу, які підтримуються мутаційним процесом, ефектом плейотропії, корелятивними взаємозв'язками в організмі і при зміні умов існування стають адаптаційними. За своєю суттю генетико-екологічна концепція є малопродуктивною, тому що в ній відсутній конкретний аналіз розвитку преадаптаційних ознак. Окрім того, з поля її зору зникає творча роль природного добору.

Згідно з морфо-функціональною концепцією, на відміну від попередньої, розвиток преадаптацій базується на існуючих пристосуваннях, під безпосереднім і неперервним контролем природного добору. Отже, преадаптивний стан у організмі виникає на основі попередньої пристосувальної еволюції, а природний добір поступово удосконалює уже існуючі пристосування, забезпечуючи найбільш економічне функціонування організмів і систем.

Георгієвський [2], розглядаючи механізми і результати дії добору з позиції "парадоксального" ефекту (добір працює не тільки на потреби найближчого часу), виокремлює наступний аспект у сучасному розумінні преадаптації: розвиток адаптаційних ознак може супроводжуватись формуванням особливостей, які не мають селективної цінності за даних умов існування, проте, зберігаючи їх у потенції, організми можуть виявляти прихований адаптаційний ефект за певних змін довкілля. Автор виділяє поняття преадаптації як самостійну еволюційну категорію, якщо адаптація, що виникла за певних умов існування, може виявитися корисною при зміні навколишніх факторів, які є різко відмінними від умов її формування, тобто ознаки, що є адаптаційними в одному середовищі можуть без змін бути використаними в іншому.

Отже, преадаптація як самостійне еволюційне явище, в основі якого лежить потенційна мультифункціональність, відображає факт існування в організмі ще не реалізованої готовності пристосування у майбутньому, задіює механізми корелятивної та спонтанної мінливості, поєднаної еволюції ознак і є не наслідком, а одним із способів набуття нових філогенетичних адаптацій [2; 8]. Дані із області еволюційної морфології, фізіології та екології, що підтверджують об'єктивне існування преадаптації, були наведені авторами [7; 14].

Феномен преадаптації відомий мікробіологам вже досить тривалий час. Показано, що преадаптація низькими дозами імідазолідів виявила здатність у стафілокока (*Staphylococcus aureus*) розвивати стратегію адаптації до ядів, використовуючи індукторами їхні низькі токсичні дози для ферментативних репараційних систем. У спеціальному дослідженні з перевірки гіпотези преадаптації методом відбору в чистих лініях дрозофіли, Дж. Беннет показав, що стійкість комах до ядів генетично подібна до стійкості бактерій до ліків (антибіотиків) і має безпосереднє відношення до преадаптації

(наявність у популяції особин, стійких до дії токсичного агента) [2]. Дані дослідження можна трактувати з позиції генетичного адаптаціонізму, враховуючи існування мобілізаційного резерву внутрішньовидової спадкової мінливості, так і з позиції фізіологічної адаптації.

Кулагін [9] зазначає, що в якості преадаптацій (як і адаптацій) можуть бути ознаки будь-якого масштабу і рівня. Таке порівнювання є правомірним не тільки з тієї причини, що адаптації можуть бути тісно пов'язаними з преадаптаціями, але саме преадаптації, за рахунок природного добору, здатні до перетворення в нові спеціалізовані адаптації. Таким чином, преадаптації допустимо класифікувати, розрізняючи їх за зв'язками з абіотичними і біотичними факторами, за морфофізіологічним змістом та приналежністю до організмів та популяцій. За критерії можна брати показники нормального органогенезу і онтогенезу, розмноження і розселення в нові екологічні ніші. Окрім того, Кулагін висунула преадаптаційну концепцію газостійкості деревних рослин, згідно з якою, забруднення біосфери промисловими викидами – новий екологічний факт, який виник внаслідок науково-технічної революції, і рослини ще не набули специфічних захисних пристосувань, які б забезпечували їхню життєдіяльність у змінених умовах. Вживання рослин у техногенно забрудненому довкіллі він пояснює поєднанням механізмів газостійкості з іншими набутими видами стійкості до екстремальних факторів середовища в процесі еволюції, особливо посухо- і морозостійкості. Ці положення знайшли експериментальне підтвердження в працях Ількуня [7]. Автор, розвиваючи концепцію газостійкості виділяє дві категорії: пристосування організмів йде за рахунок фенотипової реалізації латентних функцій та переорієнтування "старих" адаптацій у новому напрямку з встановленням нових адаптаційних зв'язків. Преадаптація і адаптація проявляються комплексно і слугують основою виживання виду в різко змінених умовах місцезростання. Феномен преадаптивності складається із преадаптацій і функціонування спеціалізованих адаптацій [9].

Шкорбатов [13] пов'язує ефект преадаптації з існуванням генетичної пам'яті біологічних систем, яка впливає на накопичення і використання адаптивного фонду рослин. Блоки генів адаптації можна розглядати в якості основних елементів еволюційної "пам'яті виду" про екологічні ситуації минулого часу.

Згідно концепції Зусмановського [6] механізмом преадаптації є генетичний пошук, а зміни в розвитку організмів мають завдячувати не випадковим мутаціям, а роботі генетичних систем, що містять елемент випадковості.

Гуревич [3] розвиває новий підхід в розумінні преадаптації і розглядає її як фундаментальну властивість живих систем, яка визначає їх здатність до випереджаючого віддзеркалення дійсності. В основу класифікації преадаптацій автором покладений принцип взаємодії індивіда і фактора довкілля в екологічній ніші. Преадаптивне значення має набуття рослинами неспецифічної стійкості під впливом стрес-фактора, загартування, багатьох фотоперіодичних реакцій, осциляції. Показано, що за часом підвищення рівня структурованості фотосинтетичного апарату рослин жоржини оптимізує фізіологічні процеси їх пристосування до періоду активного функціонування, а підвищення фотосинтетичної активності випереджає інтенсифікацію лінійного росту органів і накопичення маси. Динаміка фотосинтетичної і ростової активності супроводжується змінами в гормональному балансі. Оцінюючи біологічне значення описаних закономірностей, автор інтерпретує їх як приклад преадаптації, яка є алгоритмовою експресивною радіацією.

Довганюк [4] зазначає, що реалізація ранніх преадаптаційних ростових реакцій (на прикладі томата) сприяє кращому пристосуванню рослин загущених ценозів, а зміна кількості червоної радіації в спектрі падаючого світла є тригером запуску ростових реакцій преадаптації.

Преадаптації є резервом корисних ознак для селекції. Пристосування рослин і тварин до потреб людини здійснюється в своїй більшості тим самим шляхом, що і пристосування організмів до природних умов – поступовим відбором дрібних корисних ознак. Такі ознаки є вигідним резервом для людини та аналогом існуючого в природі явища преадаптації. До їх числа слід віднести великі мутації, які в ряді випадків можуть привести до кінцевої мети в селекційній роботі. Прикладів використання таких великих мутацій в селекції існує багато, проте менш поширеними є уявлення про те значення, яке можуть мати для селекційної практики потенційно корисні ознаки, які слабо виражені фенотипово або ж не мають цінності в даній місцевості. Дані літератури містять приклади такого роду преадаптації та її використання в селекції [2]. Так, із популяції дикої картоплі (*Solanum demissum*) поширеної в горах Мексики, була виділена лінія, яка виявилась стійкою до бородавчатої хвороби (*Synchytrium endobioticum*) та фітофторозу (*Phytophthora infestans*). Однак вартий уваги той факт, що обидва фітопатогени, які є широко розповсюдженими в місцях вирощування культурних сортів, не виявлені на територіях місцезростання їх дикого родича. Отже, оточуюче середовище не індукувало цю адаптацію, навпаки, основа, на якій штучно була виявлена адаптивність до нового середовища, існувала первісно в прихованому стані. Резистентність дикої картоплі до фітопатогенів виявилась домінантною, що було використано для створення нових стійких сортів шляхом гібридизації.

Будь-який стресовий фактор, очевидно, впливає на рослинний організм двоюко: як ушкоджуючий так і подразнюючий. Ушкодження проявляються в порушенні цілісності мембранних структур клітини, зміні її властивостей, роз'єднанні дихання і фосфорилування, та інших процесах, тоді як, стресор-подразник – викликає формування цілого ланцюга відповідних захисних реакцій направлених на репарацію ушкодження. Фізіологічні стресори здатні індукувати посилення відновних процесів, які призводять до формування довготривалої неспецифічної стійкості. Фізіологічний стрес, індукуючи надлишкову активацію метаболізму, може підвищувати загальні адаптивні механізми рослинного організму і сприяти його преадаптації до інших можливих стресових впливів, збільшуючи його неспецифічну стійкість [12].

Дослідження на тваринних об'єктах показали, що токсичний ефект різноманітних фізичних і хімічних факторів може бути послаблений попереднім впливом на організм малих доз токсичного агента. Так, на щурах попередньо оброблених на ранніх етапах постембріонального розвитку низьким тиском кисню, дія високого тиску цього газу не викликала підвищення рівня стрес-індукованого накопичення продуктів перекисного окиснення ліпідів у органах [2].

Дослідження біофізичних процесів клітин гарбуза *Cucurbita pepo* показало, що потенціал дії (ПД), ініційований перепадом температур в декілька градусів, викликає тимчасове підвищення стійкості тканин як у локальній зоні, так і за її межами. ПД-індуковане підвищення стійкості є неспецифічним та інтерпретується автором як преадаптація. ПД, виконуючи роль екстреного сигналу про початок стресового впливу, викликає при цьому комплекс функціональних змін, які і забезпечують успішне виживання рослин за стресових умов до початку власне адаптаційних змін [10].

Утворення активних форм кисню (АФК) за рослинного патогенезу є фактом загальновідомим. Генерацію АФК при інфікуванні пов'язують з активністю позаклітинних ферментів, локалізованих на плазмалемі і клітинній стінці. Так, Джечевом [15] був зроблений висновок, що утворений в результаті окиснювального вибуху пероксид водню проникає в клітини рослини і в невисокій концентрації сприяє преадаптації рослин до наступної "атаки" стресора.

Прикладом преадаптації, як складової розширення (збільшення) адаптаційного потенціалу є дослідження проведені нашою лабораторією. Так, попередньо було з'ясовано, що пероксид водню в концентрації $1 \cdot 10^{-4}$ М підвищує неспецифічну резистентність рослин пшениці за рахунок активації антиоксидантних ферментів [1]. Обробка рослин пшениці різних екотипів пероксидом водню, у фазу кушіння індукувала активність природних захисних механізмів, що сприяло формуванню неспецифічної резистентності до повторної дії стресора у фазу трубкування. Результатом цих процесів стала стабілізація окиснювального метаболізму в наступну фенофазу. Преадаптація позитивно вплинула на формування маси зерна в колосі [11].

Отже, на сьогодні проблема преадаптації набуває значення одного з перспективних напрямків еколого-еволюційних досліджень, хоча в її розвитку домінують історико-критичні і загальнобіологічні аспекти. Реалізація біохімічних, фізіологічних та структурно-функціональних передумов виявляє "запас адаптивності" і дає можливість заселяти нові зони місцезростання і

сприяти тим самим внутрішньовидовій диференціації та прогресивній еволюції.

Преадаптація може виступати фактором підвищення неспецифічної стійкості рослин в умовах антропогенно зміненого довкілля.

1. Бацманова Л., Таран Н., Оканенко А., Стимуляция пероксидом водорода защитных реакций у растений пшеницы // Стратегия и тактика защиты растений: Матер. науч. конф., Минск, 2006. – М., 2006.
2. Георгиевский А.Б. Проблема преадаптации. – Л., 1974. 3. Гуревич А. Преадаптация и ее роль в жизни растений // Интродукция акклиматизация и культивация растений. – 1996. – № 5. 4. Довганюк А., Тараканов И. К вопросу о механизмах преадаптации растений // Современная физиология растений: от молекул до экосистем: Матер. междунар. науч. конф., Сыктывкар, 2007. – С., 2007. 5. Жученко А. Проблемы адаптации в современном сельском хозяйстве // Сельскохозяйственная биология. – 1993. – № 5. – С. 3–35. 6. Зусмановский А.В. Механизмы эволюционной изменчивости. – Уфа, 1999. 7. Илькун Г. М. Газоустойчивость растений. – К., 1971. 8. Иорданский Н.Н. Эволюция жизни. – М., 2001. 9. Кулагин Ю. Газоустойчивость растений и преадаптация // Экология. – 1973. – № 2. – С. 50–54. 10. Ретивин В., Пятагин С. Преадаптация тканей стебля Cucurbita перо к повреждающему действию низких температур, индуцированная потенциалом действия // Физиология растений. – 1997. – № 4. – С. 499–510. 11. Таран Н., Бацманова Л., Грудина Н. та інш. Вплив перексиду водню на зернову продуктивність рослин озимої пшениці в умовах Полісся//Вісник аграрної науки. – 2008. – № 9. – С. 21–24. 12. Шакирова Ф. М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. – Уфа, 2001. 13. Шкорбатов Г. Основные черты адаптаций биологических систем // Журнал общей биологии. – 1971. – № 9. – С. 131–142. 14. Bock W. J. Preadaptation and multiple evolutionary pathways. – Evolution, 1959. 15. Gechev N., Gadiev I., Van Breusegem F., et al. Hydrogen peroxide protect tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes // Cell. Mol. Life Sci. – 2002. – Vol. 59. – P. 708–714.

Надійшла до редколегії 1.03.10

УДК 577.125.8

С. Сенін, асп., К. Дворченко, канд. біол. наук,
Т. Берегова, д-р біол. наук, Л. Остапченко, д-р біол. наук

ВПЛИВ МУЛЬТИПРОБІОТИКУ "СИМБІТЕР® АЦИДОФІЛЬНИЙ" НА СТРУКТУРНИЙ СТАН ЛІПІДІВ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ЗА УМОВ ТРИВАЛОЇ ШЛУНКОВОЇ ГІПОХЛОРИДРІЇ

Встановлено, що за умов тривалої шлункової гіпоацидності спричиненої "Омезом®", спостерігались суттєві зміни в структурній організації ліпідів печінки щурів. Мультипробіотик "Симбітер® ацидофільний" нормалізував вміст функціональних груп ліпідів у гепатоцитах.

It was established that under the conditions of long-term gastric hypoacidity caused by "Omez®", significant changes in the structural organisation of hepatic lipids is observed. Multiprobiotic "Symbiter® acidophilis" normalised lipidic functional groups' content in hepatocytes.

Вступ. Тривале використання інгібіторів протонної помпи парієтальних клітин шлунка при лікуванні гіперацидних станів призводить до підвищення рівня гастрину та розвитку шлункової гіперплазії і атрофії [2]. Відомо, що зниження секреції соляної кислоти негативно впливає на мікробіоценоз травної системи, що призводить до колонізації шлунково-кишкового тракту різноманітними патогенними мікроорганізмами та розвитку дисбактеріозів [7].

За умов шлункової гіпохлоридрії зменшується стимулюючий вплив на секрецію жовчі холецистокініну та секретину, які виділяються у дванадцятипалу кишку під впливом соляної кислоти. Це може спричинити розвиток патологічних процесів у гепатобіліарній системі, одним з показників якого є порушення структури мембран клітин, інтегральним та суттєвим елементом яких є ліпіди. Роль ліпідів у фізіологічних процесах та при розвитку патології залежить від якісного та кількісного складу їх окремих структурних елементів [1].

Тому метою роботи було дослідити вплив мультипробіотику "Симбітер® ацидофільний" на структурний стан ліпідів печінки щурів за умов тривалого пригнічення шлункової секреції.

Об'єкт та методи досліджень. Досліди проводили на білих нелінійних щурах-самцях вагою 180-200 г, які були розділені на три групи. Маніпуляції з тваринами та їх утримання в виварії здійснювались згідно міжнародних правил [4]. Контролем (I група) слугували щури, яким упродовж 28 діб вводили 0,2 мл внутрішньочеревно (в/ч) та 0,5 мл перорально воду для ін'єкцій. Гіпоацидний стан у щурів (II група) моделювали щоденним введенням упродовж 28 діб "Омезу®" (виробництва Dr. Reddy's, Індія), блокатора H^+ , K^+ – АТФази – ключового ферменту синтезу соляної кислоти парієтальними клітинами шлунка. "Омез®" вводили в дозі 14 мг/кг в/ч, розчиненого в 0,2 мл води для ін'єкцій. Щурам (III група) одночасно з введенням "Омезу®" вводили мультипробіотик "Симбітер® ацидофільний" (виробництва ТОВ "О.Д. Пролісок") перорально в дозі 0,14 мл/кг, розчиненого в 0,5 мл води для ін'єкцій.

Ліпіди з печінки щурів екстрагували за методом Фолча хлороформ – метанольною сумішшю (2:1, за об'ємом) [3]. З отриманих сумарних ліпідів знімали спектри на інфрачервоному (ІЧ) Фур'є – спектрометрі "Nexus" ("Thermo Nicolet", США), обладнаним датчиком DTGS. Вимірювання площин піків на ІЧ спектрах виконувалось за допомогою

програмного забезпечення приладу OMNIC (версія 5.1). Спектри реєстрували в трьох повторах для кожної проби. Кількісну оцінку структурних елементів ліпідів здійснювали за методом нормування площ і визначили їх у відсотках [5]. Статистичну обробку результатів досліджень проводили з використанням t-критерію Ст'юдента. Відмінності вважали достовірними при $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Для з'ясування структурних особливостей ліпідів печінки контрольних щурів були зняті ІЧ – спектри Фур'є в діапазоні хвильових чисел від 4000 до 400 cm^{-1} (рис. 1). Наявність в спектрі ліпідів смуги поглинання 3600-3100 cm^{-1} викликано

валентними коливаннями гідроксильних груп. Виявлений пік поглинання в ділянці 3010 cm^{-1} – відповідав валентним коливанням цис-ізомерів ненасичених та поліненасичених жирних кислот. Смугою поглинання в діапазоні від 2800 до 2929 cm^{-1} збігалась з валентними коливаннями СН – груп. Зафіксовані смуги поглинання при 1720 cm^{-1} , 1679 cm^{-1} , 1454 cm^{-1} та 1210 cm^{-1} співпадали з валентними коливаннями карбонільних, альдегідних, CH_2 – та фосфатних груп відповідно. Виявлений пік з максимумом поглинання при 968 cm^{-1} – відповідав коливанням транс-ізомерів [6].

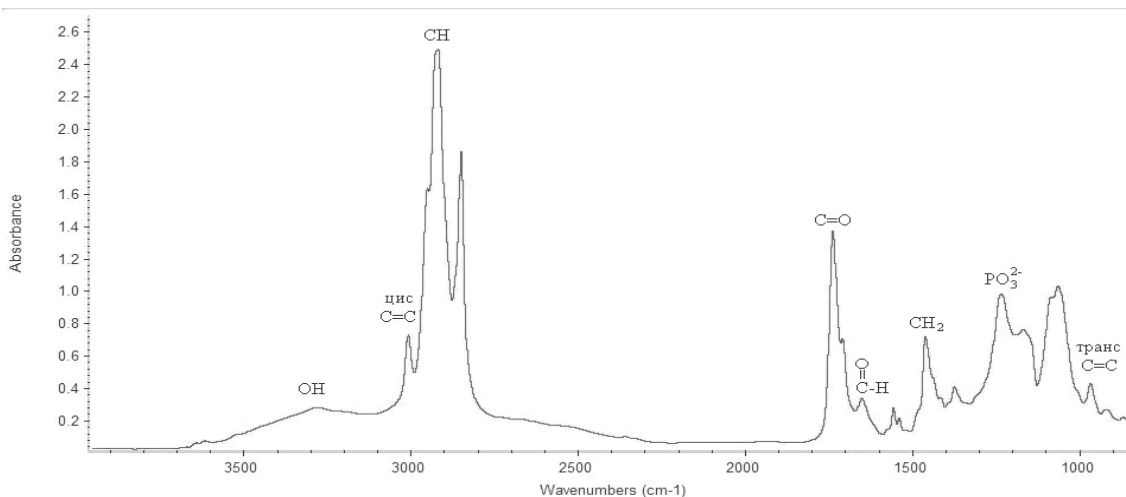


Рис.1. ІЧ-спектр Фур'є загальних ліпідів печінки контрольних щурів

Аналіз ІЧ-спектрів Фур'є ліпідів гепатоцитів контрольних щурів дозволив розрахувати відсоткове співвідношення функціональних груп (табл.1). Виявлено, що ліпіди характеризувались переважанням СН- (у середньому 45,95%), карбонільних (22,28%), гідроксильних (11,06%), CH_2 - (6,95%) та фосфатних (7,78%) груп. Вміст альдегідних груп, цис- та транс-ізомерів складав 1,67%, 2,65% та 1,66% відповідно.

Показано, що за умов тривалого пригнічення шлункової секреції соляної кислоти омепразолом, спостерігались суттєві зміни в структурній організації ліпідів печінки щурів (табл. 1). Зокрема, збільшувався вміст гідроксильних груп – у 2,4 рази; альдегідних груп – у 1,7 рази, фосфатних груп – у 1,4 рази та транс-ізомерів в 1,2 рази порівняно з контролем. За цих же умов відбувалось зниження карбонільних груп та цис-ізомерів в 1,3 та 1,5 рази відповідно.

Таблиця 1. Вміст функціональних груп ліпідів (% від загальної кількості) печінки щурів за умов тривалої шлункової гіпоацидності, ($M \pm m$, $n=7$)

Досліджувані параметри	Група тварин	контроль	"Омез®"	"Омез®" + "Симбітер® ацидофільний"
Гідроксильні групи (3600-3100 cm^{-1})		11,06 $\pm$ 1,01	26,61 $\pm$ 1,85	16,93 $\pm$ 1,52
Цис-ізомери (3010 cm^{-1})		2,65 $\pm$ 0,12	1,71 $\pm$ 0,09	2,07 $\pm$ 0,14
СН-групи (2800-2929 cm^{-1})		45,95 $\pm$ 2,53	32,81 $\pm$ 2,09	44,26 $\pm$ 2,15
Карбонільні групи (1720 cm^{-1})		22,28 $\pm$ 1,92	16,06 $\pm$ 1,47	18,52 $\pm$ 1,63
Альдегідні групи (1679 cm^{-1})		1,67 $\pm$ 0,09	2,91 $\pm$ 0,11	1,37 $\pm$ 0,12
CH_2 – групи (1454 cm^{-1})		6,95 $\pm$ 0,70	6,87 $\pm$ 0,81	6,74 $\pm$ 0,42
Фосфатні групи (1210 cm^{-1})		7,78 $\pm$ 0,84	11,02 $\pm$ 1,03	8,51 $\pm$ 0,69
Транс-ізомери (968 cm^{-1})		1,66 $\pm$ 0,08	2,01 $\pm$ 0,13	1,60 $\pm$ 0,07

*- $p < 0,05$ порівняно з контролем;

** - $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили "Омез®"

Зростання певних структурних елементів у складі ліпідів (гідроксильних і альдегідних груп) та зниження цис-ізомерів свідчить про інтенсифікацію процесів перекисного окислення ліпідів, оскільки саме подвійні зв'язки цис-ізомерів ненасичених та поліненасичених жирних кислот є головною мішенню вільних радикалів. Такі структурні перебудови можуть призвести до суттєвих змін плинності мембран, активності мембранозв'язаних ферментів, переносників та інших мембранних білків. Зниження карбонільних, СН-груп та підвищення фосфатних груп може свідчити про підвищення обмін-

них процесів у фосфоліпідах мембран гепатоцитів. Збільшення вмісту транс-ізомерів, може бути пов'язано з процесами окиснення поліненасичених жирних кислот, що супроводжується накопиченням ізопропанів – головних маркерів окисного стресу in vivo.

Встановлено, що за умов сумісного введення тваринам "Симбітеру® ацидофільного" та "Омезу®", спостерігалось суттєве відновлення структурної організації ліпідів гепатоцитів у порівнянні з групою щурів з гіпоацидним станом (табл. 1). Знизився рівень гідроксильних груп (в 1,4 рази), альдегідних груп (в 1,5 рази) та

фосфатних груп і транс-ізомерів (в 1,2 рази). При цьому підвищився вміст СН-груп (в 1,4 рази), карбонільних груп і цис-ізомерів (в 1,2 рази) відносно групи шурів, яким вводили омепразол.

Висновки. Отримані результати експериментальних досліджень свідчать, що на фоні тривалого пригнічення шлункової секреції соляної кислоти блокаторм H^+ , K^+ – АТФази "Омезом[®]", спостерігались суттєві зміни структурної організації ліпідів печінки шурів. Мультипробіотик "Симбітер[®] ацидофільний" нормалізував більшість структурних складових ліпідів гепатоцитів до контрольних значень.

УДК 577.112.083

1. Заяківська О.С. Вплив модифікації жирнокислотного складу клітинних мембран на гастропротекцію за умов стрес-індукованих уразень // Медичні перспективи. 2006. – №4. – С. 24-27. 2. Burkitt M.D., Varro A., Pritchard D.M. Importance of gastrin in the pathogenesis and treatment of gastric tumors // World J Gastroenterol. – 2009. – Vol. 15(1). – P. 1-16. 3. Folch J., Lees M. and Stanley G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J. Biol. Chem. – 1957. – Vol. 226. – P. 497-509. 4. Guide for the Core and Use of Laboratory Animals. National Research Council. Washington: Nat. Acad. Press. – 1996. – 250 p. 5. Lamba O.P., Borchman D., and O'Brien P.J. Fourier transform infrared study of the rod outer segment disk and plasma membranes of vertebrate retina // Biochemistry. – 1994. – Vol.33. – P. 1704-1712. 6. Qing-Bo Li, Xue-Jun Sun, Yi-Zhuang Xu. Use of Fourier-transform infrared spectroscopy to rapidly diagnose gastric endoscopic biopsies // World J Gastroenterol. – 2005. – Vol. 11(25). – P. 3842-3845. 7. Williams C., McColl K.E.L. Proton Pump inhibitors and bacterial overgrowth // Alimentary pharmacology and Therapeutic. – 2006. – Vol. 23. – P. 3-10.

Надійшла до редколегії 01.03.10

В. Гришук, інж.1-кат., Я. Рока-Мойя, асп.,
Д. Жерносеков, канд. біол. наук, Г. Березницький, канд. хім. наук

ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА СПОСОБІВ ОЧИСТКИ ПРОТЕЇНУ С

Протеїн С є основним компонентом антикоагулянтної ланки системи гемостазу. Недостатність протеїну С (набута або спадкова) призводить до розвитку тромботичних ускладнень. Тому одержання препаратів протеїну С є актуальною задачею біотехнології. В даній роботі представлено порівняльну характеристику хроматографічних методів очистки протеїну С. Показано перевагу методу імуноафінної хроматографії з використанням моноклональних антитіл до протеїну С.

Protein C is the main component of anticoagulant cascade of haemostasis system. Protein C deficiency (inherited or acquired) leads to development of thrombotic complications. That's why the obtaining of protein C preparations is an actual task of biotechnology. In the present paper the possible chromatographic procedures for protein C purification have been analyzed. The advantage of immunochromatography with monoclonal antibodies against protein C has been shown.

Вступ. Протеїн С (ПС), вітамін-К-залежний білок плазми крові, є фізіологічним антикоагулянтом, який виконує регуляторну функцію при активації процесів зсідання крові та фібрinolізу, бере участь в локалізації системної запальної відповіді, зменшенні апоптозу ендотеліальних клітин у відповідь на дію цитокінів і розвиток ішемії [2].

Протеїн С є дволанцюговим глікопротеїдом з молекулярною масою 62 кДа, що синтезується в печінці у вигляді неактивного проферменту. Активація протеїну С здійснюється на фосфоліпідній мембрані комплексом тромбін-тромбомодулін [2]. Концентрація білка в крові складає 3-5 мг/л, час напівжиття активованого ПС – 16-30 хвилин [5]. Антикоагулянтна функція активованого ПС здійснюється за принципом негативного зворотнього зв'язку. Активовані протеїн С в присутності протеїну S як кофактору, іонізованого кальцію і фосфоліпідів високоселективно інактивує фактори Va і VIIIa шляхом їх гідролізу, тим самим перешкоджаючи перетворенню протромбіну в тромбін [2]. Клінічні дослідження показали, що ПС має перспективу широкого застосування. Препарат може бути використаний не тільки для лікування генетично дефіцитних на ПС пацієнтів, але також за септичного шоку для стримання розвитку запальної відповіді, при операціях заміни колінних і кульшових суглобів, некрозі тканин внаслідок дії кумарину, при гепариніндукованій тромбоцитопенії і т.і. Крім того, для діагностики та лікування велике значення має своєчасне визначення вмісту/активності ПС в плазмі крові людини, що дозволяє оцінити антикоагулянтний потенціал крові і є прогностичним показником [1, 2, 4].

Оскільки, на відміну від інших антикоагулянтів, протеїн С циркулює в кровотоці у вигляді зимогену та активується лише у випадку необхідності, концентрат ПС є засобом попередження і лікування тромбозів у пацієнтів з набутим дефіцитом ПС і сприяє уникненню проблем, пов'язаних з переливанням свіжозамороженої плазми, не викликаючи побічних ефектів за рахунок його антикоагулянтної та антитромботичної дії [16].

Для остаточного розуміння функцій ПС, особливо на молекулярно-клітинному рівні, уточнення його властивостей, які необхідно враховувати при практичному застосуванні препарату ПС, важливим є продовження досліджень як *in vivo*, так і *in vitro*. Створення модельних систем, наближених до умов *in vivo*, які б відтворювали протікання процесів за участі ПС як регулятора, вимагає використання електрофоретично чистого білкового препарату. Оскільки проблеми по виділенню протеїну С пов'язані з невисокою концентрацією білка в плазмі крові і складними умовами відокремлення ПС від інших вітамін-К-залежних білків плазми крові, метою роботи було порівняння ефективності різних способів очистки ПС з плазми крові людини та фракції IV-1 за Коном.

Матеріали і методи досліджень. Фракцію IV-1 за Коном (фракція білків плазми крові, яку одержано етаноловим осадженням за методом Кона) надано ЗАТ "Біофарма", м. Київ. Для одержання концентрату, що містив протеїн С, 15 г фракції IV-1 суспендували в фізіологічному розчині за присутності 1мМ бензамідину, додавали $(NH_4)_2SO_4$ до 40% насичення та інкубували 12 год при 4°C. Суспензію центрифугували протягом 40 хв при 6000 g. До отриманого супернатанту додавали $(NH_4)_2SO_4$ до 70% насичення, інкубували протягом 1 год при 4°C і потім центрифугували 40 хв при 6000 g. Отриманий осад розчиняли у 0,02 М трис-фосфатному буфері pH 6.0, що містив 2 мМ бензамідину і центрифугували суспензію протягом 40 хв при 6000 g. Супернатант знесолювали на G-25. Одержану суміш білків використовували для отримання протеїну С.

Плазму крові донорів надано співробітниками Центру крові Київського військового госпіталю.

Контрольна плазма крові ліофілізована (Ренам, Росія).

Метало-афінний та гідрофобний сорбенти синтезовано у відділі хімії та біохімії ферментів Інституту біохімії за модифікованою методикою згідно [15]. Спочатку шляхом взаємодії епоксिमетакрилатів різної молекулярної маси з імінодіоцтовою кислотою синтезували метакрилатні мономери, які містили залишки імінодіоцтової кислоти. Синтезовані мономери кополімеризували

за радикально-ланцюговим механізмом з акриламідом та метиленбісакриламідом, внаслідок чого утворювалась нерозчинна матриця металоафінного сорбенту. Після синтезу отриману матрицю ретельно промивали водою та обробляли розчином сульфату міді. В результаті обробки утворювався металоафінний сорбент, який було використано для очищення протеїну С [3].

Електрофорез у поліакриламідному гелі в присутності DS-Na проводили за методом Лемлі [13]. Як маркери використовували суміш білків Low Molecular Weight Calibration Kit (Pharmacia, 97; 66; 43; 31; 21,5; 14,4 кДа) та # 0671 Fermentas, 170; 130; 95; 72; 55; 43; 34; 26; 17; 11 кДа). Для відновлення дисульфідних зв'язків зразки обробляли 5% β -МЕ протягом 10 хв при 60°C. Гелі фарбували 0,125% розчином кумасі G-250, що містить 25% ізопропанолу і 10% оцтової кислоти, або азотнокислим сріблом. Концентрацію білків у розчині з нейтральним рН визначали за методом Бредфорда [6] у модифікації Седмака.

Амідолітичну активність визначали, використовуючи хромогенний субстрат S_{2366} для протеїну С ("Chromogenic", Швеція). Швидкість вивільненого під дією ферменту рНА визначали в двупроменевому режимі при 405 – 492 нм на рідері Titertec Multiscan MC ("Titertech", Фінляндія), приймаючи коефіцієнт поглинання 1М розчину рНА при 405 нм рівним 10500 [8].

В роботі використано сефадекс ДЕАЕ-А-50 (Pharmacia, Sweden), гідрофобний сорбент на основі епоксिमетакрилату та стиролу (Інститут біохімії НАНУ, Київ), металоафінний сорбент з використанням іонів міді (Інститут біохімії НАНУ, Київ), активована BrCN-сефароза 4В з іммобілізованими антитілами до протеїну С (люб'язно надано лабораторією біохімії Американського Червоного Хреста, м. Роквілл, США).

Результати досліджень та їх обговорення. Традиційне очищення протеїну С з плазми крові або з фракції IV-1 за Коном складається з декількох етапів: адсорбція сульфатом барію, фракціонування сульфатом амонію та застосування методів колоночної хроматографії. Перші два етапи вважаються класичними для отримання препарату протромбіну, але вони визнані доцільними також і для очищення протеїну С [9, 14, 15].

Методи включають використання різних афінних сорбентів для отримання вітамін К-залежних факторів зсідання крові (фактори II, VII, IX, X та протеїни С, S та Z) [11] або для фракціонування матеріалу, який містить

фактори II, VII, та IX та протеїн С [11, 12, 15]. З метою отримання останнього можна використовувати іонообмінну, гідрофобну та різновиди афінної хроматографії. Іонобінна хроматографія є доцільною не тільки для одержання протеїну С з плазми крові, але і з фракції IV-1 за Коном [5, 14]. Остання є побічним продуктом при отриманні сироваткового альбуміну людини і є сировиною для виділення протеїну С (один грам концентрату фракції IV-1 містить приблизно 100 мкг протеїну С) [14].

Гідрофобну хроматографію використовують, як правило, для очищення протеїну С, отриманого з концентрату, що містить вітамін-К-залежні фактори зсідання крові II, VII, IX та протеїн С [10]. Метод афінної хроматографії придатний для одержання протеїну С з будь-якої сировини, що містить цей білок, і є найбільш зручним [7, 16].

З метою вибору ефективного методу одержання електрофоретично чистого функціонально активного протеїну С ми використали вищезазначені види хроматографії і порівняли отримані результати. Як сировину ми використовували плазму крові людини і фракцію IV-1 за Коном.

Імуноафінна хроматографія з використанням моноклональних антитіл до протеїну С

Принцип методу полягає в утворенні комплексу антиген-антитіло (в даному випадку – протеїн С-моноклональні антитіла до протеїну С) для селективної екстракції потрібного матеріалу з багатокомпонентної білкової суміші. Основна перевага методу полягає в його потенційно високій вибірковості, що дозволяє вилучати із складної суміші компоненти дуже низького вмісту. Крім того, отриманий на імуноафінних сорбентах білок може мати до 1000-кратного ступеню очистки [7].

Для одержання протеїну С (вміст білка в крові складає 3-5 мг/л) нами було використано активовану BrCN-сефарозу з іммобілізованими на ній моноклональними антитілами 7D7B10 до протеїну С (колонка 1x10 см). Сорбент врівноважували 0,05М трис-НСІ буфером рН 7,4, що містив 0,15М NaCl, 1мМ ЕДТА, наносили плазму крові (150 мл), яку попередньо було діалізовано проти того самого буферу. Швидкість нанесення матеріалу та швидкість елюції складала 0,65 мл/хв. Елюцію протеїну С здійснювали 0,05М трис-НСІ буфером рН 7,4, що містив 0,15М NaCl та 10мМ CaCl₂. Гомогенність одержаного білка перевіряли методом DS-Na електрофорезу. Профіль елюції представлено на рис. 1

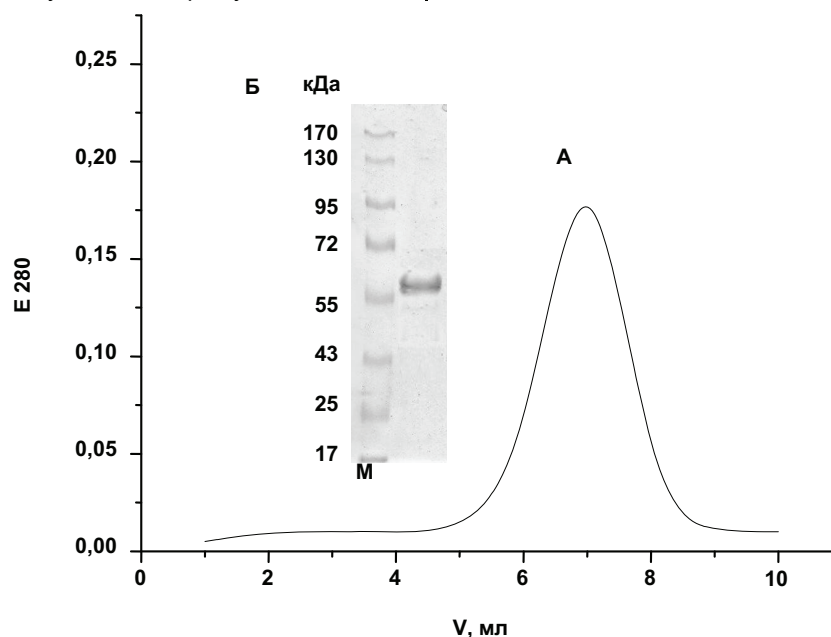


Рис 1. А – профіль елюції протеїну С на сефарозі 4В з іммобілізованими моноклональними антитілами до протеїну С; Б – електрофореграма отриманого матеріалу (М – маркери, кДа)

В результаті застосування цього способу виділення протеїну С можна досягти майже 100% виходу кінцевого продукту, який зберігає активність, якщо повторити нанесення на сорбент вихідної сировини. Перевагою даного способу виділення протеїну С з плазми крові є одноетапна процедура очищення і висока специфічність: з моноклональними антитілами зв'язується тільки протеїн С.

Недоліком є висока вартість афінного сорбенту, але при дотриманні умов його експлуатації та зберігання ця незручність компенсується багаторазовим використанням, стабільністю носія і високою якістю отриманого матеріалу.

Іонобмінна хроматографія на сефадексі ДЕАЕ А-50

Для вилучення протеїну С з фракції IV-1 за Коном було використано сефадекс ДЕАЕ А-50 (колонка 2x23 см), врівноважений 0,02М трис-фосфатним буфером рН 6,0, що містив 2М бензамідину і 0,15М NaCl. Розділення ПС-вмісної білкової суміші (26 мл), одержаної як описано в Матеріалах і методах, проводили в тому самому буфері лінійним градієнтом 0,15–0,6М NaCl зі швидкістю елюції 20 мл/год. Хроматограма розділення суміші білків з використанням даного носія (рис. 2) практично співпадає з даними літератури [5, 12].

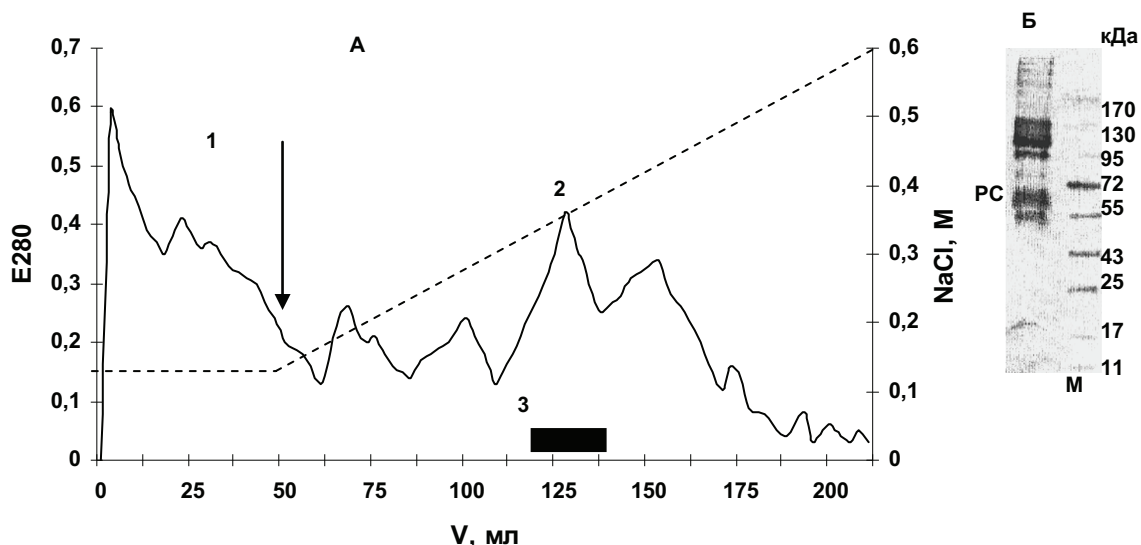


Рис. 2. А – хроматограма розділення суміші білків, отриманих з фракції IV-1 за Коном, на сефадексі ДЕАЕ А-50:

1 – матеріал, що не зв'язався з сорбентом; 2 – фракція, що містила протеїн С;
3 – зона активності протеїну С, визначена за хромогенним субстратом S2366.

Стрілка вказує на початок елюції лінійним градієнтом 0,15–0,6М NaCl. Б – електрофореграма фракції, що містила протеїн С

Однак використання зазначеного сорбенту не дало змоги отримати електрофоретично гомогенний білок. Цілком ймовірно, що для кращого очищення та економії часу слід, можливо, застосовувати більш ефективний аніонобмінник та ступінчастий градієнт.

Металоафінна хроматографія на мідь-вмісному сорбенті

Метод базується на використанні іонів металів як ліганду, з яким зв'язуються білки, що мають на поверхні залишки гістидину. Загальноновживаними є іони Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} . До іонів двох останніх металів значну афінність мають фосфопротеїни [14, 15] та деякі глікопротеїни. Метод є недорогим, відносно специфічним і придатним для отримання білків, які важко відокремити один від одного. Ці властивості сорбенту можуть бути використані для ефективного очищення протеїну С від протромбіну [9, 12, 14].

Нами синтезовано метало-афінний сорбент, який за властивостями був схожий з сорбентом, рекомендованим в роботах [14]. Молекула протеїну С містить 18 залишків гістидину, з них 15 є поверхнево доступними, тоді як протромбін має 5 гістидинових залишків, з яких поверхнево доступними є лише 4 [10, 14], що обумовлює різну силу зв'язування з лігандом. 15 мл білкової суміші, одержаної як описано в Матеріалах і методах, змішували з 15 мл сорбенту та інкубували протягом 2 год при 4°C. Елюцію з носія здійснювали 0,02 М фосфатним буфером рН 7,0, який містив 15 мМ імідазолу (гістидиновий конкурент) зі швидкістю 10 мл/год. Ре-

зультати хроматографії на металоафінному сорбенті представлено на рис. 3.

Отримана хроматограма відповідає даним літератури [14, 15]. Однак, електрофоретичний аналіз зразків елюату показав наявність високомолекулярних домішок. Тому наступним кроком в перевірці методів одержання ПС було застосування гідрофобної хроматографії.

Гідрофобна хроматографія на сорбенті 1

Для розділення вітамін-К залежних білків рядом авторів була запропонована методика використання гідрофобних сорбентів [10, 11]. В роботі [10] для очищення рекомбінантного протеїну С використовували Тоуреарл phenyl 650 М. Автори роботи вважають, що завдяки цьому сорбенту відбувається ефективне відокремлення протеїну С від інших вітамін-К-залежних білків. Поширеним афінним сорбентом є також Phenyl-сефароза НР. Доцільним може бути використання Тоуреарл phenyl 650 М, ДЕАЕ-сефарози-FF і феніл-сефарози [11]. Спосіб одержання протеїну С на гідрофобних сорбентах є одноетапним, доволі швидким і простим, однак має свої недоліки: по-перше, низький ступінь очистки; по-друге, спорідненість до даного носія, крім протеїну С, мають фактор Х зсідання крові та деякі супутні білки плазми крові. З цієї причини отриманий матеріал не є гомогенним і повинен підлягати додатковому очищенню.

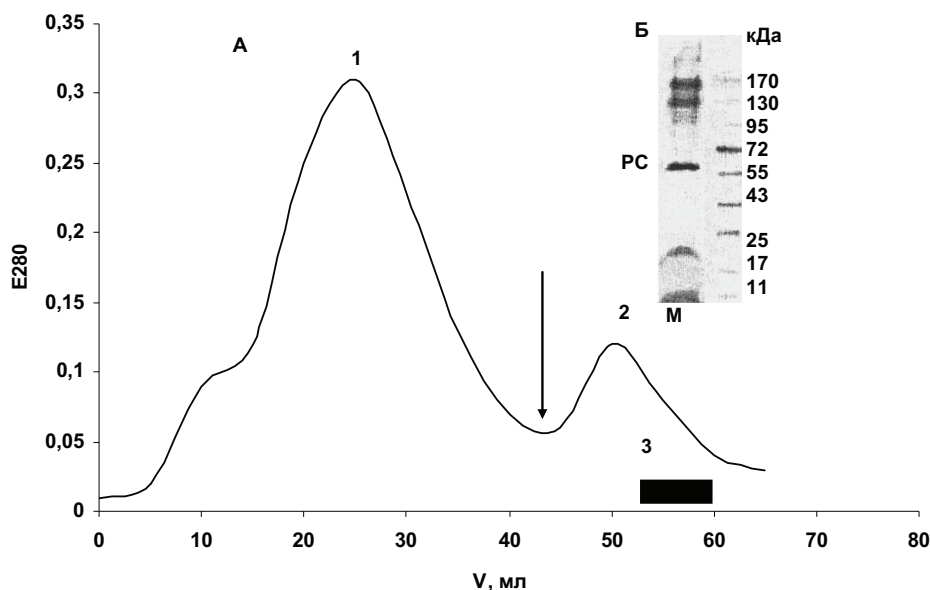


Рис. 3. А – хроматограма розділення суміші білків, отриманих з фракції IV-1 за Коном, на мідь-вмісному сорбенті:

- 1 – матеріал, що не зв'язався з сорбентом; 2 – фракція, що містила протеїн С;
3 – зона активності протеїну С, визначена за хромогенним субстратом S2366.
Б – електрофореграма фракції, що містила протеїн С. Стрілка вказує на початок елюції

Нами було синтезовано гідрофобний сорбент 1 на основі стиролу. На рис. 4 наведено результати хроматографічного розділення на гідрофобному сорбенті 1 фракції IV-1 за Коном, яка підлягала попередньому фракціонуванню сульфатом амонію.

23 мл білкової суміші, одержаної як описано в Матеріалах і методах, в 0,1 М фосфатному буфері рН 7.0, що містив 1мМ бензамідину та 0,8 М сульфату амонію, наносили на сорбент, врівноважений тим самим буфером, і залишали на інкубування протягом ночі при 4°C. Матеріал, що не зв'язався з носієм, елюювали 0,1 М фосфатним буфером рН 7.0, що містив 1 мМ бензамідину і 1,1 М сульфату амонію зі швидкістю 20 мл/год. Елюцію ПС проводили тим самим буфером, але без сульфату амонію, з тією самою швидкістю. Отриманий матеріал характеризували електрофоретично (рис. 4).

Аналіз зразків показав, що використання такого сорбенту для очищення IV-1 фракції за Коном було ефек-

тивніше, ніж сефадексу ДЕАЕ А-50 та мідь-вмісного сорбенту, однак отриманий матеріал теж містив домішки інших білків плазми крові і потребував додаткового очищення (застосування гелі-фільтрації на сефакрилі S-200, Superdex-75 або іонообмінної хроматографії на іонообміннику, подібному до Mono Q).

Детальний аналіз одержаних результатів показав, що шлях отримання протеїну С традиційними хроматографічними методами не дуже вдалий, оскільки вся хроматографічна процедура доволі тривала: процес включає два етапи (матеріал, отриманий на сефадексі ДЕАЕ А-50, мідь-вмісному та гідрофобному сорбентах не є електрофоретично чистим і потребує подальшого очищення), що вимагає додаткової витрати часу і матеріалів, і, крім того, використані способи одержання ПС не давали 100% виходу кінцевого продукту.

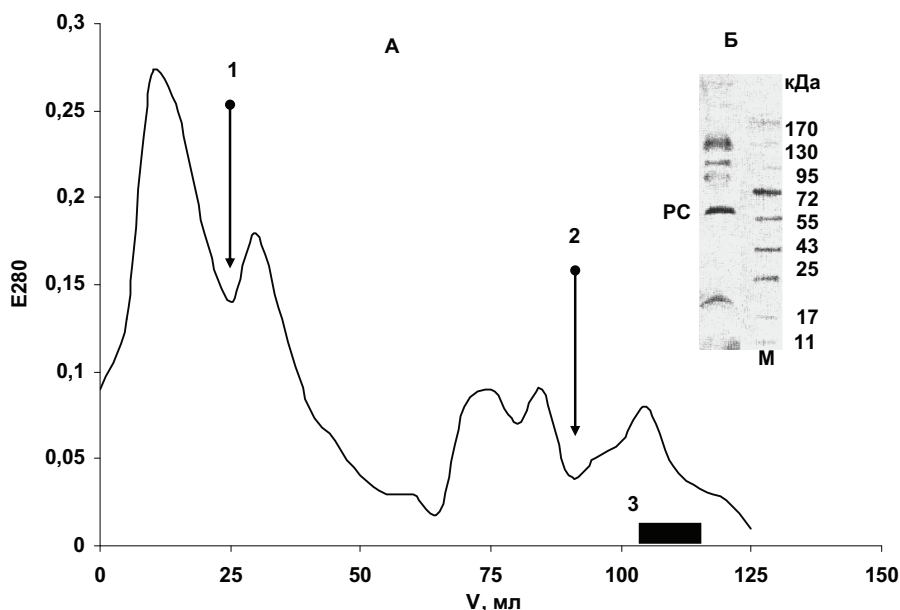


Рис. 4. А – хроматограма розділення суміші білків, отриманих з фракції IV-1 за Коном, на гідрофобному сорбенті 1:

- 1 – матеріал, що не зв'язався з сорбентом. Стрілка вказує початок елюції за присутності 1,1М (NH₄)₂SO₄;
2 – фракція, що містила протеїн С. Стрілка вказує на початок елюції за відсутності 1,1М (NH₄)₂SO₄;
3 – зона активності протеїну С, визначена за хромогенним субстратом S2366. Б – електрофореграма фракції, що містила протеїн С

В ході роботи ми перевіряли ефективність не тільки способів отримання ПС, але й сировину, з якої вилучали білок. Результати роботи показали, що IV-1 фракція за Коном, як джерело ПС, не є вдалим вибором для отримання цього білка з ряду причин: по-перше, для одержання матеріалу, який підлягає хроматографії, фракцію IV-1 необхідно піддати додатковому очищенню, процедура якого складається з 8 етапів [9]; по-друге, в отриманому матеріалі містяться не тільки віта-

мін К-залежні білки, одним з яких є ПС, але й інші компоненти плазми крові (альбумін, альфа-2-макроглобулін, антитромбін III, церулоплазмін та ін.), що значно утруднює процес одержання електрофоретично чистого препарату ПС; по-третє, матеріал отриманої фракції (а дуже часто і матеріал вихідної сировини) є частково проактивованим, що не дає можливості одержати повноцінний продукт. Попередню характеристику способів одержання протеїну С представлено в таб. 1.

Таблиця 1. Порівняння методів очистки протеїну С

*Метод очистки	**Вміст протеїну С отриманих фракцій, %
Іонообмінна хроматографія на сефадексі ДЕАЕ А-50	26
Металоафінна хроматографія на мідь-вмісному сорбенті	62
Гідрофобна хроматографія з використанням гідрофобного сорбенту 1	36
Імуноафінна хроматографія	98

Примітка: *в перших трьох випадках вихідною сировиною слугувала фракція IV-1 за Коном, в останньому випадку – плазма крові людини; **розрахунок вмісту протеїну С в отриманих фракціях проводили за результатами електрофорезу з використанням програми Totallab TL 100 (Nonlinear dynamics, UK).

Таким чином, порівняння якості фракціонування вітаміну К-залежних білків показало, що, незважаючи на необхідність додаткового очищення, найбільш ефективними для отримання протеїну С є мідь-вмісний та гідрофобний сорбенти. Однак, всі види хроматографії, крім імуноафінної, мають загальний суттєвий недолік: активність протеїну С у процесі отримання суттєво знижується.

Висновки. 1. Найефективнішим способом одержання препарату протеїну С, який можна використовувати для фундаментальних і прикладних досліджень, є імуноафінна хроматографія з іммобілізованими моноклональними антитілами до протеїну С.

2. Не завжди прагнення до дешевизни є виправданим і обґрунтованим, про що свідчать результати проведеної роботи. Спосіб очистки протеїну С методом імуноафінної хроматографії не є дешевим, однак дозволяє одержати кінцевий продукт високої якості.

1. Горницькая О.В., Платонова Т.Н. Выделение и свойства активатора протеина С из яда щитомордника обыкновенного // Биомед. химия. – 2003. – т. 49, №5. – С. 470-478. 2. Гришук В.І., Чернищенко Т.М., Горницька О.В. Роль протеїну С в системі гемостазу та визначення його активності за різних патологій // Медична хімія. – 2009. – т. 11, №1. – С. 11-17. 3. Маркарян О.К., Березницький Г.К., Жерносеков Д.Д., Забава Л.К. Синтез металоафінного сорбенту з іммобілізованими іонами міді для виділення препарату протеїну С із плазми крові людини. III Всеукраїнська наук. Конференція студ. Асп. і молодих учених, "Хімічні проблеми сьогодення", 2009, Донецьк, С. 103. 4. Платонова Т.М., Горницька О.В., Мороз Є.Д. Застосування активатора протеїна С з отрути щитомордника звичайного (Agkistrodon halys halys) для визначення активності про-

теїну С у плазмі крові за різних патологій // Лаб. діагностика. – 2001. – №3. – С. 28-31. 5. Bernardi M.E., Bermudez M.C., Hurvitz A. et al Preparation of prothrombin complex concentrate (PCC) at intermediate scale: first experience in Argentina // J. Thromb. Haemost. – 2003. – Vol. 1, Suppl. 1. – abstract number CD016. 6. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 78, N2. – P. 248-254. 7. Burgess R.R., Thompson N.E. Advances in gentle immunoaffinity chromatography // Curr. Opin. Biotechnol. – 2002. – V. 13. – P. 304-308. 8. Erlanger B. The action of chymotrypsin on two new chromogenic substrates // Arch. Biochem. Biophys. – 1966. – Vol. 115. – P. 206-218. 9. Fenton J.N., Fasco M.J., Stackrow A.B. et al Human thrombins. Production, evaluation and properties of α -thrombin. // J. Biol. Chem. – 1977. – Vol. 252, N 11. – P. 3587 – 3598. 10. Husi H., Walkinshaw M.D. Separation of human vitamin K-dependent coagulation proteins using hydrophobic interaction chromatography // J. Chromat. B. – 1999. – Vol. 736, N 1-2. – P. 77-78. 11. Josic D., Hoffer L., Buchacher A. Preparation of vitamin K-dependent proteins, such as clotting factors II, VII, IX and X and clotting inhibitor Protein C // J. Chromatogr. B. – 2003. – Vol. 790, N 1-2. – P. 183-197. 12. Kisiel W. Human plasma protein C. Isolation, characterization and mechanism of activation by α -thrombin // J. Clin. Invest. – 1979. – Vol. 64, N 3. – P. 761-769. 13. Laemli K.U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – 227. – P. 680-685. 14. Lee J.J., Bruley D.F., Kang K.A. Effect of pH and imidazole on protein C purification from Cohn fraction IV-1 by IMAC // Adv. Exp. Med. Biol. – 2007. – Vol. 599. – P. 61-66. 15. Perez-Campos E., Cordoba F., Perez-Ortega E., et al Purification of protein C, a natural anticoagulant from human plasma by affinity chromatography with concavalin A // Preparative Biochem. Biotechnol. – 1996. – Vol. 26, N 3-4. – P. 183-188. 16. Regnault V., Rivat C., Pfister M., Stoltz J.-F. Monoclonal antibodies against human protein C and their uses for immunoaffinity chromatography // Thromb. Res. – 1991. – Vol. 63, N 6. – P. 629-640.

Надійшла до редколегії 22.03.10

УДК 574.64

І. Злацький, асп., В. Гандзюра, д-р біол. наук

ВПЛИВ ІОНІВ МІДІ НА ЕМБРІОНАЛЬНИЙ РОЗВИТОК *Danio rerio* (HAMILTON, 1822)

Розглянуто вплив іонів міді на розвиток ембріонів. Досліджено зміни в ембріогенезі Danio rerio. Встановлено безпечні та небезпечні концентрації токсикана.

Influence of ions of copper on development embryos is considered. Changes in embryogenesis are investigated. Safe and not safe concentrations the toxicant are established.

Вступ. Останнім часом вплив антропогенного навантаження на Земні екосистеми, включаючи водні, досить чутливий і постійно зростає. Особливо цінну інформацію можна одержати при вивченні гідроекосистем, найбільш уразливих до забруднень, оскільки накопичують їх з усієї водозбірної площі, а відтак діагностика системи може характеризувати і стан забруднення всього регіону водозбору. Саме тому дослідження про-

дуктивності біосистем за умов токсичного забруднення середовища проведено нами на прикладі водяних організмів та їх популяцій. Із забруднюючих речовин найбільше значення для водних екосистем мають нафта та продукти її переробки, пестициди, детергенти, антисептики й сполуки важких металів. Тому важливим, є вивчення впливу різних забруднюючих, токсичних речовин на водні організми, а саме на риб, як найбільш

представлених гідробіонтів у водному середовищі. Це унеможливує подальше прогнозування стану гідро екосистем за певного рівня забруднення. Вивчаючи цю проблему, можливо буде в майбутньому діагностувати та прогнозувати, як токсичні речовини впливатимуть на популяції та угруповання риб, які є чутливими біоіндикаторними організмами при оцінці рівня забруднення водойми і якості водного середовища.

При цьому особливої уваги заслуговують саме важкі метали [1]. На відміну від інших токсичних забруднювачів, іони важких металів при потрапленні до водних біотопів у подальшому не виводяться із системи, а тільки перерозподіляються по ній. В дуже незначних кількостях важкі метали необхідні для життя. Вони проникають у живу клітину у вигляді катіонів і поглинання їх жорстко регулюється, оскільки багато які важкі метали у великих кількостях токсичні [2].

Найчутливішими до забруднення є молодь гідро біонтів. Саме в молодому віці організм є найбільш уразливим до забруднення токсичними речовинами. На ранніх стадіях розвитку іони важких металів можуть впливати на проникність клітинних мембран, впливати на стабільність слизової оболонки, стабільність кісткової тканини та ін. В подальшому, це може накласти чуттєвий вплив на розвиток організму. Шкодочинний вплив може призвести до зниження життєвих функцій, як в окремого організму, так і в популяції чи угрупованні. Тому з'ясування особливості впливу іонів важких металів на розвиток на ранніх стадіях організмів є досить важливим. З'ясувати ці зміни на ранніх стадіях розвитку риб і було метою нашої роботи.

Ікру риби, останнім часом, стали все частіше використовувати, як тестові об'єкти в токсикології при оцінці якості води. А саме в Європі та Америці модельними об'єктами досліджень є запліднена ікра риби виду *Danio rerio* [3]. В сучасних дослідженнях на токсичність, спостерігають ембріональний розвиток організму. Зміни на ранніх стадіях при дії токсикантів можуть призводити до деградації ембріона, недорозвиненості дорослої особи або взагалі загибелі ембріону на ранніх стадіях.

В багатьох країнах заборонені експерименти на дорослих особинах, тому досліді направлені на вивчення розвитку ембріонів є перспективними. Крім цього переваги таких експериментів в тому, що вони тривають досить короткий час – 48-72 години. Розвиток ембріона *Danio rerio* добре описаний в літературі, оскільки ембріони Даніо є одними із важливих моделей в дослідках ембріонального розвитку хребетних тварин та рекомендована, як тестова риба. Ця риба використовується в дослідках в області молекулярної генетики, біології розвитку, нейробіології та транс генних дослідках [4].

Утримання дорослих особин не потребує великих затрат. Риба може продукувати на протязі всього року багато прозорої не липкої до субстрату ікри вже на 4 місяці життя. Нерест стимулюється різкою зміною світлового режиму наявності рослинності, об яку риба третється при нересті та пом'якшенням води. Яйця досить великі $d = 1\text{ мм}$ і помітні неозброєним оком. Одна самка дає в середньому 50-200 яєць в день. Ікра на світло під біокулярним мікроскопом має перевітеліновий простір з жовтком огорнене мембраною, зародишковий диск знаходиться на анімальному полюсі. Яйця телопецетальні, ділення меробластичне та дискоїдальне. *Danio rerio*, можуть поїдати свою ікру, тому це слід враховувати при постановці досліду. Відомі порушення на різних стадіях розвитку ембріона, які призводять до подальшої загибелі організму.

Об'єкт, матеріали та методика. Використовували групу статевозрілих особин *Danio rerio* (Hamilton, 1822) які утримувалися, окремо самці від самок, в скляних акваріумах при температурі 26С, постійній аерації з фільтруванням води. Годували рибу стандартними сухими кормами з додаванням живих. Утримували при зміні світлового режиму 12:12. На досліді брали рибу в співвідношенні 2:1 самці до самок в невеликий скляний акваріум з приготовленою синтетичною водою, аерацією не менше 80%, температурою 26С за стандартною методикою [5]. Збирали ікру за допомогою чашок, які ставили на дно акваріуму і накривали сталеву сіткою, для запобігання поїданню своєї ікри дорослими особинами. На сталеву сітку прикріплювалися штучні рослини для стимуляції нересту. Акваріум накривали темним ковпаком, через який не проникає світло. Через 12 годин ковпак знімався і світло починало стимулювати рибу до нересту.

Нерест та запліднення відбувався протягом 30-60 хвилин після стимуляції світлом після чого рибу відловлювали та виймали чашки з ікрою, яку добре видно поставивши чашку на темне місце. Розвиток яйця починається через 15 хвилин після запліднення. Дроблення починається після акумулювання на анімальному полюсі цитоплазми, де вона огортає ядро зиготи. Тільки частина цитоплазми яйця (бластодиск) піддається дробленню, в той час, як ділянка цитоплазми, багата жовтком не ділиться. Дроблення починається з утворення 2х потім синхронного ділення формуються 4, 8, 16, 32 клітинні бластомери. На цих стадіях (4-32), легко відрізнити запліднену ікру від не заплідненої. Візуально незапліднена ікра буде більш темною, а згодом стане білою з помутнінням. Тільки запліднена ікра може бути використана для проведення експерименту. Заплідненої повинно бути не менше 50% від загальної кількості. Запліднену ікру розміщували в 7мм чашки Петрі заповнені розчином токсиканту на синтетичній воді. Рецепт синтетичної води 2mM CaCl₂, 0.5mM MgSO₄, 0.75mM NaHCO₃, 0.08mM KCl. Кожне розведення повинно тестуватися не менше ніж на 10 ембріонах. На кожен ікринку повинно бути 2мл розчину. Окремо ставилася контрольна чашка. Експеримент вважається достовірним, якщо в контролі загинуло не більше 10% ембріонів. Позитивною відповіддю на дію токсиканту вважається більше 10% ефект або загибель ембріонів.

Параметри по яким визначається ефект або загибель ембріонів описані в стандартній методиці [5]. Ембріони які, досліджуються постійно спостерігають на протязі 72 годин інкубування при температурі 26С. На різних стадіях розвитку виділяють декілька сублетальних проявів, що свідчать про гибель ембріона. Перше, це коагуляція яйця – свідчить про повну загибель. Друге, не відділення хвоста ембріона на стадії 24 годин в подальшому призводить теж до загибелі ембріона. На стадії 48 годин повинно бути помітне серцебиття, якщо воно відсутнє, то ембріон вважається мертвим. Деякі вчені звертають увагу також на відсутність пігментації на 48 годинах розвитку, що теж свідчить про недорозвиненість ембріона в результаті дії на нього токсиканту.

Досліді спостерігають на біокулярний мікроскоп та записують чи фотографують на цифрову вебкамеру. З переносом даних на комп'ютер, де можна чітко роздивитися розвиток на різних стадіях.

Дослідження проведені за загальноприйнятими методами іхтіотоксикологічних експериментів [6]. Було проведено низку дослідів на ікрі Даніо з іонами міді в складі кристалогідрат сульфату міді – CuSO₄ * 5H₂O. Для досліджених токсикантів рибогосподарські ГДК складають – 0,01 мг Cu²⁺/л [6].

Вірогідність різниці між контрольними та дослідними вимірами оцінювали за t-критерієм Ст'юдента. Вірогідною вважали різницю між порівнюваними показниками при $p < 0,05$. Розрахунки та побудову графіків виконували з використанням прикладної програми "Microsoft Excel".

Результати та їх обговорення. Нами досліджувалася дія іонів міді на смертність ембріонів *Danio rerio* за

вище описаними показниками. Ми намагалися встановити летальні, сублетальні та концентрації, які є безпечні для ембріонів риб. В літературі нами встановлено сублетальну концентрацію (LC 50) [2]. Відповідно до цієї концентрації ми отримали розведення кратні вище та нижче LC 50 відповідно до літературних даних для кожного токсиканту.

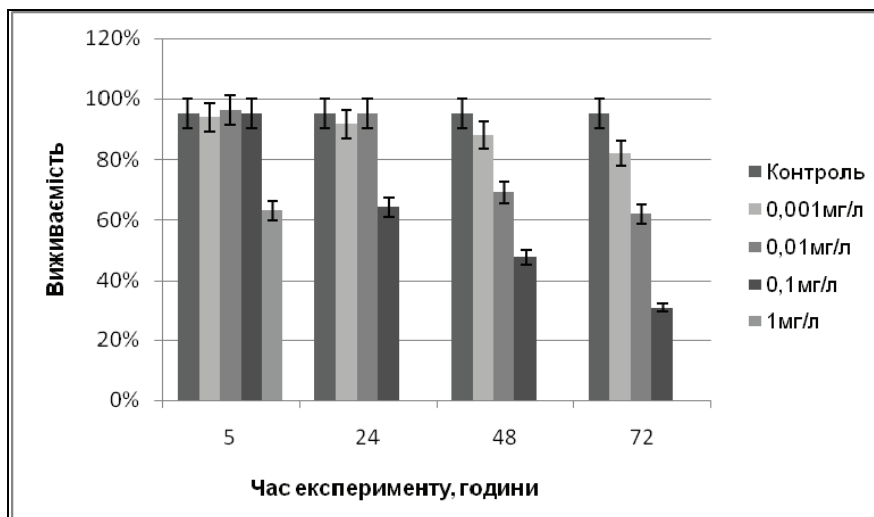


Рис.1. Вплив іонів міді на ембріональний розвиток *Danio rerio*

На діаграмі показана динаміка виживаємість ембріонів *Danio rerio* за дії різних концентрацій міді в порівнянні з контролем (рис.1). Помітно, що за дії концентрації міді 1 мг/л токсична дія проявлялася вже після 5 годин досліду, а після доби експозиції спостерігалася 100% загибель всіх ембріонів. За концентрації міді 0,1 мг/л помітна токсична дія спостерігалася після першої доби. Поступово до кінця експерименту ми спостерігаємо летальну дію іонів міді. Наприкінці досліду залишилося лише трохи більше 20% виживших ембріонів, які мали помітні сублетальні прояви (порушення пігментації).

За концентрації іонів міді 0,01 мг/л токсична дія, яка приводила до летальних наслідків не спостерігалася на протязі першої доби. Хоча треба відмітити, що розвиток ембріонів відбувався з деякими сублетальними проявами (повільний розвиток, не відділення хвоста, порушення серцебиття, порушення пігментації). На другу добу виживаність ембріонів зменшилась на декілька десятків відсотків і до кінця досліду сягнула відмітки в 60% виживши ембріонів. Слід відмітити, що на всіх стадіях у виживих ембріонів спостерігалися відхилення від нормального розвитку, тобто сублетальна дія токсиканту.

Найбільш безпечною в наших дослідках виявилась концентрація іонів міді – 0,001 мг/л. За цієї концентрації було відмічено найбільшу виживаність ембріонів, причому сублетальних проявів не було відмічено на протязі всього експерименту.

Найбільша виживаність спостерігалася в контролі, де смертність ембріонів не перевищувала 10%, що є в межах нормального розподілу.

Висновки. Отже з отриманих результатів вдалося виявити летальні концентрації, які лежать в межах від

1 мг/л і більше концентрацій іонів міді та призводять до 100% смертності ембріонів. Сублетальні концентрації, які знаходяться в межах між 0,1 мг/л та 0,01 мг/л та призводять до загибелі половини ембріонів, чи морфологічної зміни в розвитку ембріонів. Найбільш безпечною визначено концентрацію 0,001 мг/л міді, за якої спостерігалася найменша летальна дія токсиканту. Отже за дії іонів міді може спостерігатися значний токсичний вплив на ембріогенез риб, що було показано нами на прикладі ембріонів *Danio rerio*. Важливо зазначити, що вплив різних концентрацій на ранніх стадіях розвитку риб може призвести до суттєвих змін у виживших особин, які були під впливом токсиканту. В подальшому, це може призвести до зниження імунітету, порушення роботи різних життєво важливих систем та збільшення смертності, серед дорослих особин в популяціях та угрупованнях риб [7].

1. Гандзюра В.П. Продуктивність біосистем за токсичного забруднення середовища важкими металами. – Київ: ВГЛ "Обрії", 2002. – 248 с.
2. Scott, G.R., Sloman, K.A., 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behavior: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquat. Toxicol.* 68, 369–392.
3. Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dynam.* 203, 253–310.
4. Nagel, R., 2002. DarT: the embryo test with the zebrafish *Danio rerio* e a general model in ecotoxicology and toxicology. *ALTEX* 19 (Suppl. 1/02).
5. Nagel, R. (1998). Fish embryo toxicity test with the zebrafish *Danio rerio*. Initial consideration for a OECD Draft Guideline. In W. Heger, S. Jung, S. Martinet al. (eds.), UBA – Texte-band 58/98 (80-93). Berlin: Umwelt-bundesamt.
6. Гандзюра В.П., Грубінько В.В. Концепція шкодочинності в екології. – Київ-Тернопіль: Вид-во ТНПУ ім. В. Гнатюка, 2008. – 144 с.
7. Брагинский Л.П. Принципы классификации и некоторые механизмы структурно-функциональных перестроек пресноводных экосистем в условиях антропогенного пресса // *Гидробиол. журн.* – 1998. – Т.34, №6. – С.72–94.

Надійшла до редколегії 22.03.10

УДК 582.912.42.631.525.

Т. Антонюк, асп., О. Оканенко, канд. біол. наук,
Н. Таран, проф., д-р біол. наук

ДИНАМІКА ГЛІКОЛІПІДІВ ВЕГЕТАТИВНИХ ОРГАНІВ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ *RHODODENDRON* L. ПРИ АКЛІМАЦІЇ ДО ТЕМПЕРАТУРНИХ УМОВ ЛІСОСТЕПУ УКРАЇНИ

*Встановлена кількісна залежність вмісту гліколіпідів у вегетативних органах представників роду *Rhododendron* L. культивованих в природних умовах Лісостепу України протягом вегетаційного періоду. Методом тонкошарової хроматографії виявлена специфіка змін гліколіпідів від фази онтогенезу та температурного фактора. Обговорено захисну роль гліколіпідів в акліматичних процесах рослин.*

*Quantitative dependence of glycolipid content upon the phase of plant ontogenesis and stress factor action was revealed. Lipid composition of *Rhododendron* L. specie vegetative organs cultivated in the natural conditions of wood-step of Ukraine with the help TLC during vegetation period was performed. The protective role of glycolipids in plant acclimation processes is discussed.*

Вступ. Первинні термоадаптаційні зміни у системі захисних механізмів рослинного організму відбуваються на молекулярному рівні і пов'язані з трансформаціями складу та внутрішньомолекулярної структури мембранних ліпідів. Рідиннокристалічний стан ліпідів, необхідний для забезпечення фізіологічних і біохімічних функцій мембран, залежить від різноманітних факторів навколишнього середовища [1]. Рослинні мембранні ліпіди в основному представлені гліколіпідами, які є структурними компонентами хлоропластів та беруть участь у процесах фотосинтезу. За дії несприятливих чинників змінюється як якісний, так і кількісний вміст ліпідів [2]. Зміни складу ліпідів впливають насамперед на функціонування самих мембран, а потім і на функціонування клітин і тканин загалом. Тилакоїди хлоропластів вищих рослин мають у своєму складі такі гліколіпіди, як моногалактозилдіацилгліцерол (МГДГ), дигалактозилдіацилгліцерол (ДГДГ) та сульфохіновозилдіацилгліцерол (СХДГ), а також у незначній кількості фосфатидилгліцерол (ФГ) [3]. В одних випадках зміни є адаптивними, що сприяють виживанню рослин, в інших – є відображенням деструктивних процесів, що зумовлено напруженістю дії стресового чинника, тривалістю впливу, а також чутливістю рослин і стадією їх розвитку. Загалом трансформації ліпідів при дії стресових факторів віддзеркалюють фізіологічний стан рослин і ця інформація може бути використана для індикації їх толерантності. Тому метою нашої роботи було дослідити адаптивні зміни вмісту преваляючих компонентів ліпідної фракції, а саме гліколіпідів, у листках вічнозелених представників роду рододендрон (*Rh. fortunei*, *Rh. ponticum*, *Rh. amesiae*), інтродукованих в кліматичних умовах Лісостепу України.

Об'єкт та методи досліджень. Об'єктами дослідження були листки вічнозелених представників роду *Rhododendron* L. (*Rh. fortunei*, *Rh. ponticum*, *Rh. amesiae*), інтродукованих в кліматичних умовах Лісостепу України на території ботанічного саду імені акад. О.В.Фоміна Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Погодні умови протягом вегетації були типовими для середньої зони Лісостепу України. Коливання температури у досліджувані роки (2007-2009 рр.) були в межах +27 – -4°C. Відбір зразків здійснювали протягом року кожної першої декади місяця.

Екстракцію ліпідів проводили за методом Зіллі та Хармона [4] в модифікації Яковенко та Міхно [5]. Ліпіди були розділені на класи за допомогою методу тонкошарової хроматографії (ТШХ) на силікагелі, в системі розчинників ацетон: толуол: вода [91:35:7] [6]. Вміст ліпідів визначали методом денситометрії хроматограм у порівнянні з стандартами.

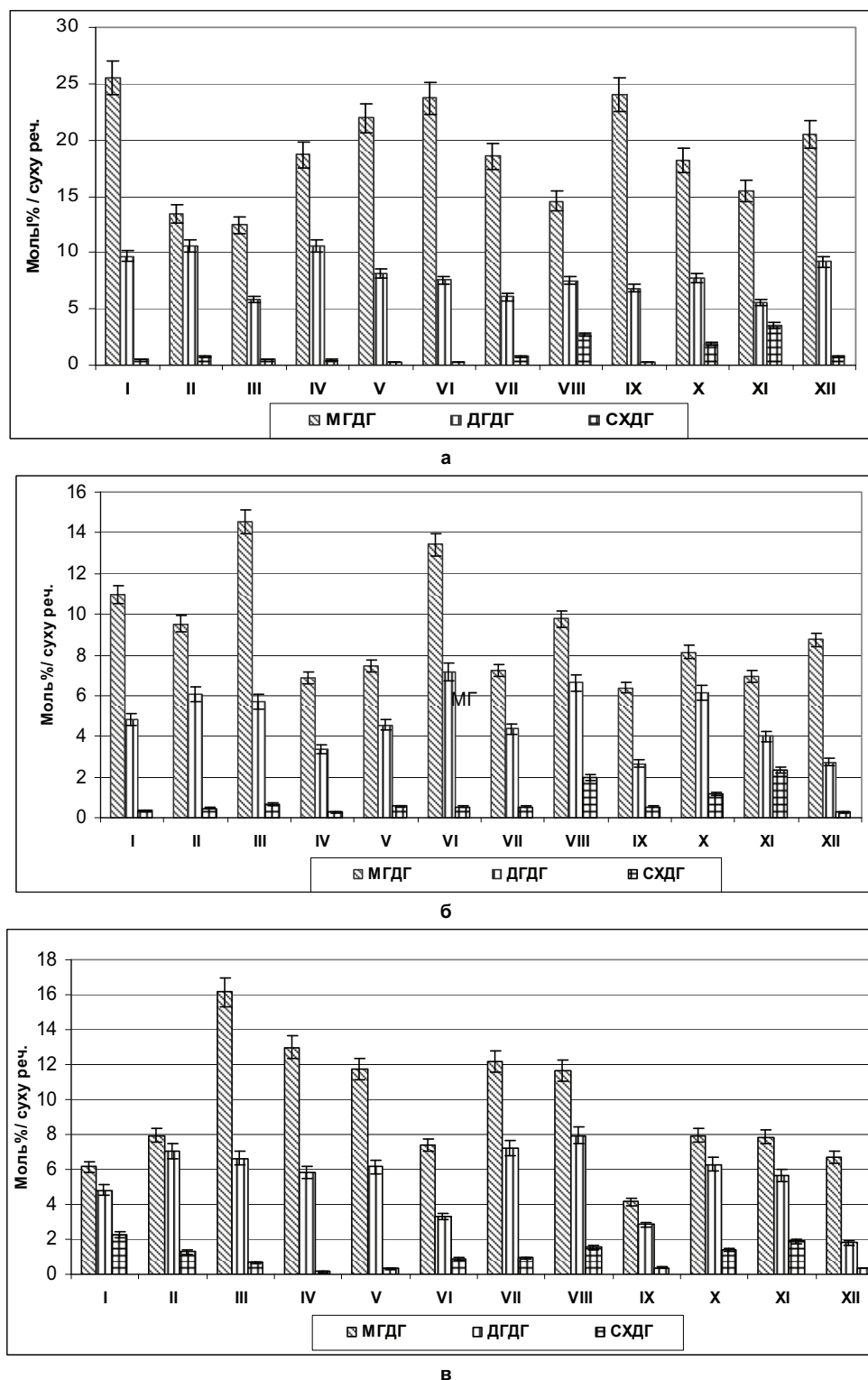
Середні та стандартні відхилення були розраховані за допомогою Microsoft Office Excel. Усі результати були

виражені як середні арифметичні значення з трьох біологічних та трьох аналітичних повторностей. Оцінку достовірності відмінностей проводили за методом порівняння середніх показників за критерієм Стьюдента. Відмінності вважали суттєвими при значенні $p \leq 0,05$.

Результати та їх обговорення. Отримані результати свідчать про наявність у вічнозелених представників роду рододендрон (*Rh. fortunei*, *Rh. ponticum*, *Rh. amesiae*) чіткої залежності між температурою в період росту і гліколіпідним складом їх листків (рис. 1). Так, в період лютий-березень, коли спостерігались різкі перепади температур (-8 – +8°C), відмічено зниження вмісту МГДГ у рослин *Rh. amesiae*, при стабільній кількості ДГДГ та незначному зростанні вмісту СХДГ.

Початок вегетаційного періоду (в усіх досліджених видів починається в квітні), характеризувався накопиченням МГДГ при відносно стабільному вмісті ДГДГ. Лише в *Rh. fortunei* починаючи з квітня спостерігалось зростання ДГДГ та зниження МГДГ, що, можливо, пов'язано з чутливістю цього виду до надлишкового освітлення. Після підвищення температури до +10 – +18 °C, в квітні, відмічене зростання вмісту МГДГ, та незначне падіння рівня ДГДГ. Відмічені трансформації ліпідів можливо пов'язані зі стабілізацією мембран, тому що відомо [6], що у рослин стійких видів швидко стабілізується рівень пероксидного окиснення ліпідів та відбувається зростання вмісту МГДГ.

Результати дослідження адаптивних реакцій ліпідних компонентів фотосинтезуючих тканин показали, що в березні у видів *Rh. ponticum* та *Rh. fortunei* відмічалось збільшення кількості МГДГ та зниження ДГДГ. У *Rh. amesiae* в березні спостерігається падіння як ДГДГ так і МГДГ, а в квітні та травні вміст галактоліпідів зростає та залишається на сталому рівні. Рівень СХДГ у усіх досліджених видів залишався стабільним. Включення інвертованих міцел молекул МГДГ біля поверхні світлозбирального комплексу (СЗК) у мембранах тилакоїдів сприяє нормальному функціонуванню фотосистем (ФС). Тому зростання МГДГ в весняні місяці може бути результатом захисту рослин від фотоокиснення при надлишковому освітленні, яке рослини цього виду особливо гостро відчувають саме у цей період за відсутності природного затінення іншими листопадними видами. Збільшення МГДГ в червні може бути реакцією-відповіддю на активацію в листках пероксидного окиснення ліпідів, адже ліпіди та їх ненасичені в жирні кислоти є субстратом окиснення [10]. При зростанні температури в кінці травня до +15 – +28 в усіх досліджених видів спостерігався стабільний рівень галактоліпідів, що свідчить про перебування рослин в оптимальних умовах [1].

Рис.1. Динаміка гліколіпідів протягом вегетативних органів вічнозелених представників роду *Rhododendron* L.а – *Rh. amesiae*, б – *Rh. fortunei*, в – *Rh. ponticum*

Умовні позначки: I – січень, II – лютий, III – березень, IV – квітень, V – травень, VI – червень, VII – липень, VIII – серпень, IX – вересень, X – жовтень, XI – листопад, XII – грудень

Результати досліджень свідчать про високу чутливість фотосинтезуючих органів усіх досліджених видів рододендронів протягом літніх місяців, а особливо протягом липня та серпня. В цей період спостерігалось різке та довготривале підвищення температури (до +27 °C). Відомо, що молекули МГДГ, на відміну від більшості ліпідів мембран, здатні утворювати небішарові структури, які можуть пакувати хлорофіл-білковий комплекс у

ліпідний матрикс [9]. Комплексна дія факторів посухи (як водного дефіциту, так і підвищеної температури) зумовлює зсув рівноваги між бішаровими/небішаровими ліпідними структурами. Виявлене нами підвищення відношення ДГДГ/МГДГ в тилакоїдах чутливих до температурного стресу рослин *Rh. ponticum* та *Rh. fortunei* може бути результатом ймовірної деструкції МГДГ. Це знижує стійкість хлорофіл-білкових комплексів до дії

температурного стресу. Менш значними змінами характеризувалися рослини *Rh. amesiae*, де спостерігали зниження вмісту МГДГ та ДГДГ, але їх співвідношення залишалось майже незмінним. В усіх видів в цей період відбувається істотне зростання вмісту СХДГ, як компоненту мембран тилакоїдів, що відіграє специфічну роль у їхній структурній організації, впливаючи на формування двошарової структури з ДГДГ та регулюючи синтез МГДГ [10], що за умов дії стресового фактору може бути спрямоване на забезпечення оптимальних умов для функціонування хлоропластів. Отже, в умовах підвищеної температури та відповідного зниження оводненості листків виникали зміни в кількості галактоліпідів як у рослин стійкого, так і в рослинах чутливого виду. Виявлені нами зміни можна розглядати як адаптивну реакцію, пов'язану зі збереженням плинності та зменшенням рівня деградаційних процесів в мембранах, зокрема, та їх стабілізацією, спрямовану на захист від зневоднення в умовах дії високої температури.

Протягом осінніх місяців спостерігалось зростання МГДГ, ДГДГ й СХДГ в *Rh. ponticum* та *Rh. fortunei*. Зміни цих показників можуть сприяти підтриманню активності мембранних ферментів [6], внаслідок чого підвищуються стійкість рослин при дії стресових чинників, таких як низькі температури.

За отриманими нами результатами та, з огляду на данні, наявні в літературі [2], які вказують на відносну стабільність фракції ДГДГ у рослин стійкого виду, збільшення її кількості у нестійкого виду, а також зниження рівня МГДГ у чутливого виду та стабільного рівня у стійких, можна характеризувати види *Rh. ponticum* та *Rh. fortunei* як чутливі до зниження температури. Зменшення МГДГ, акумуляція СХДГ та незмінність фракції ДГДГ – здатні компенсувати викликані температурним стресом пошкодження мембран і спрямовані на підтримку їх стабільності [9]. Результати дослідження адаптивних реакцій ліпідних компонентів фотосинтезуючих тканин показали, що рослини реагують на холод підвищенням вмісту гліколіпідів. Серед змін вмісту останніх відмічено накопичення СХДГ, який задіяний у стабілізації фотомембран і забезпеченні оптимальних умов для функціонування процесів фотосинтезу. Після зниження температури до -4°C відмічено максимальне збільшення СХДГ та ДГДГ в листі видів *Rh. ponticum* та *Rh. fortunei*, а у виду *Rh. amesiae* відмічена протилежна тенденція – зменшення їх кількості. При зниженні температури до -9°C у всіх видів рододендронів спостерігалось зниження вмісту сульфоліпиду. Отже, відзначені нами трансформації вмісту СХДГ, як компоненту мембран тилакоїдів, що відіграє специфічну роль у їхній структурній організації, впливаючи на формування двошарової структури з ДГДГ та регулюючи синтез

МГДГ [2], за умов дії стресового фактору може бути спрямоване на забезпечення оптимальних умов для функціонування хлоропластів [6]. Зростання фракції сульфоліпиду може бути пояснено існуванням тісного зв'язку між кількістю хлорофілу та концентрацією СХДГ, оскільки саме він визначає орієнтацію молекул хлорофілу у мембрані. Крім того, сульфоліпід забезпечує ефективну взаємодію між компонентами СЗК II, бере участь в організації реакційних центрів обох фотосистем [7] та стабілізації АТФаз.

Висновки. Проведені дослідження динаміки накопичення ліпідів у листках рододендронів дозволили встановити видову, часову та температурно залежну специфіку їх накопичення. Відносно стабільність гліколіпідів у фотосинтезуючих органах *Rh. amesiae* і *Rh. fortunei* було відзначено на початку вегетації.

Зниження вмісту МГДГ та ДГДГ та накопичення СХДГ в *Rh. fortunei* і *Rh. ponticum* було виявлено в літні та осінні місяці. Накопичення СХДГ було також зареєстровано у *Rh. ponticum* починаючи з жовтня, і протягом всього зимового періоду. *Rh. amesiae* характеризувався найбільш стабільним вмістом ДГДГ і СХДГ. Отримані дані щодо видоспецифічних змін гліколіпідів можуть свідчити про різні механізми температурних акліматизаційних процесів у досліджених (*Rh. amesiae*, *Rh. fortunei*, *Rh. ponticum*) представників роду Рододендрон.

1. Davy de Virville J, Cantrel C, Bousquet A-L, Hoffelt M, Tenreiro A-M, Vaz Pinto V, Arrabaça JD, Caiveau O, Moreau F. and Zachowski A. Homeoviscous and functional adaptations of mitochondrial membranes to growth temperature in soybean seedlings // Plant Cell Environ. – 2002. 25. P. 1289-1297.
2. Navari-Izzo F, Ricci F, Vazzana C, Quartacci MF. Unusual composition of thylakoid membranes of the resurrection plant *Boea hygropetrica*: Changes in lipids upon dehydration and rehydration // Physiol. Plant. – 1995. 94. P. 135-142.
3. Joyrd J., Block M. A., Douce R. Molecular aspects of plastid envelope biochemistry // European Journal of Biochemistry. – 1991. Vol.199. P. 489 -509.
4. Zill L, Harmon E. Lipids of photosynthetic tissue. I. Salicylic acid chromatography of the lipids from whole leaves and chloroplasts // Biochem. Biophys. Acta. – 1962. – Vol. 199. №57. P. 573-575.
5. Яковенко Г.М., Михно А.И. Методы выделения и разделения по классам липидов хлоропластов растений // Физиология и биохимия культ. растений. – 1971. – 3, № 6. – С. 651–656.
6. Оканенко О.А., Таран Н. Ю. Гліколіпіди рослин – Київ: Ленвіт, 2005. – 111с.
7. Tremolieres A, Siegenthaler PA. Reconstruction of photosynthetic structures and activities with lipids. In: Siegenthaler PA and Murata N (eds) Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics. Advances in Photosynthesis. – 1998. Vol 6, pp 175-189. Kluwer Acad Publ, Dordrecht.
8. Siegenthaler P.-A. Molecular organization of acyl lipids in photosynthetic membranes of higher plants. In: Lipids in photosynthesis: structure, function and genetics. Advances in photosynthesis 6, Siegenthaler P.-A., Murata N., eds. – 1998. – P. 120-144.
9. Kanervo E, Aro E-M, Murata N. Low unsaturation level of thylakoid membrane lipids limits turnover of the D1 protein of photosystem II at high irradiance. // FEBS Letters. – 1995. – 364. – P. 239-242.
10. Stefanov K., Markovska Y., Kimenov G. and Popov S. Lipid and sterol changes in leaves of *Haberlea rhodopensis* and *Ramonda serbica* at transition from biosis into anabiosis and vice versa caused by water stress. // Phytochemistry. – 1992. – Vol. 31. P. – 2309-3214.

Надійшла до редколегії 16.03.10

УДК 577.346/577.151

Т. Андрійчук, канд. біол. наук, Н. Ракша, канд. біол. наук,
Л. Драган, канд. біол. наук, С. Лугова, пров. інж.

ЗАЛУЧЕННЯ ФЕРМЕНТІВ РОДИНИ КАСПАЗ У РАДІАЦІЙНО-ІНДУКОВАНІЙ АПОПТОЗ ЛІМФОЦИТІВ ЩУРІВ

Досліджували участь ферментів родини каспаз за апоптозу, індукованого дією рентгенівського випромінювання. Встановлено зростання активності ініціаторної каспази-8 та ефекторної каспази-3 через 30 хв після опромінення з подальшим підвищенням активності обох досліджуваних ферментів у тимоцитах та значним зниженням активності у лімфоцитах селезінки.

Participation of caspase family enzymes in radiation-induced apoptosis was investigated. The increase of initiator caspase-8 and effector caspase-3 activities 30 min after irradiation with further activation both investigated enzymes in thymocytes and significant decrease caspase activities in splenocytes has been established.

Вступ. На сьогодні доведеним є факт визначальної ролі внутрішньоклітинного сигнального шляху в ініціації

апоптотичної клітинної загибелі у відповідь на дію променевого чинника; інтегральним компонентом цього

© Андрійчук Т., Ракша Н., Драган Л., Лугова С., 2010

шляху є мітохондрії – органели, що забезпечують конвергенцію різноманітних проапоптичних сигналів від клітинних компартментів, зокрема ядра та ендоплазматичного ретикулу в загальну виконавчу стадію. Разом з тим реалізація радіаційно-індукованих ефектів певною мірою пов'язана з залученням опосередкованого поверхневими рецепторами шляху рецепції та проведення апоптогенного сигналу. Так, автори робіт [1, 2] показали, що опромінення ультрафіолетовими чи γ -променями викликає дозозалежну агрегацію Fas рецепторів лімфоцитів та активізацію пов'язаних з даними рецепторами сигнальних каскадів.

Спільною ланкою під час реалізації апоптотичної загибелі, незважаючи на різну природу індукторів та різні шляхи надходження сигналу, є залучення ферментів родини каспаз. Активація цих ферментів спостерігається як у ранні строки після дії стрес-агентів, так і на заключних етапах клітинної загибелі і відбувається за участі взаємодоповнюючих механізмів, зокрема процесингу неактивних попередників (шляхом автолізу чи за дії інших протеїназ) та активації вже існуючих у клітині ферментів внаслідок порушення тонкого балансу між системами контролю їх активації та інгібування.

Серед каспаз розрізняють регуляторні, наприклад каспазу-8, яка обумовлює надходження сигналу від поверхневих рецепторів всередину клітини і, залежно від типу клітин, визначає ступінь залучення решти каспаз на початкових етапах після дії індуктора. Ефекторні каспази (каспаза-3, -6, -7) є визначальними під час реалізації виконавчої стадії апоптозу, забезпечуючи, з одного боку, проведення сигналу до відповідних клітинних структур, з іншого – безпосередньо беруть участь у деградації ряду ключових для підтримання клітинного гомеостазу молекул.

Активація каспазного каскаду не тільки унеможливає виконання клітиною своїх функцій, а й полегшує руйнування та упакування клітинних структур в зручні для фагоцитозу апоптотичні тільця – кінцевий етап загибелі шляхом апоптозу.

Матеріали і методи. Досліди проводили на нелінійних щурах-самцях масою 150-170 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. З метою попередження впливу добових ритмів на досліджувані показники досліди проводили в один і той час доби. Всі експерименти здійснювали згідно з правилами Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних дослідженнях та інших наукових цілях (Страсбург, 1986 р.). Опромінення здійснювали на рентгенівській установці РУМ-17 в дозі 1,0 Гр за умов: фільтри 0,5 мм Cu та 1 мм Al, шкірно-фокусна відстань 50 см, напруга 200 кВ, сила струму 5 мА, потужність дози 0,17 Гр/хв. Тварин декапітували через 30 хв та 3 години після дії променевого чинника. Лімфоїдні клітини з тимусу та селезінки виділяли згідно з [3]. Активність каспази-8 та каспази-3 визначали за допомогою набору для визначення активності каспаз (Caspase Colorimetric Protease Assay Sampler Kit, BioSource, USA). Екстинцію проб вимірювали на спектрофотометричному рідері фірми Termo Labsystems Opsys MR (США) із програмним забезпеченням Dynex Revelation Quicklink. ТБК-активні продукти визначали відповідно до методу [4], їх вміст розраховували на основі значення молярного коефіцієнту екстинкції комплексу малонового діальдегіду з 2-тіобарбітуровою кислотою. Статистичну обробку одержаних результатів здійснювали на основі t-критерію Стюдента, використовуючи програму Microsoft Excel.

Результати та їх обговорення. Відповідно до сучасних уявлень, протеїнази не лише безпосередні виконавці програми клітинної загибелі, а й потенційно регуляторні молекули, які через ініціацію каскаду внутрішньоклітинних реакцій та його регуляцію на різних рівнях в кінцевому результаті обумовлюють реалізацію одного з двох альтернативних сценаріїв – клітинної деструкції шляхом апоптозу чи некрозу або виживання клітини.

Беручи до уваги роль протеолітичних каскадів у підтриманні рівноваги між загибеллю та проліферацією клітин, ідентифікація протеїназ, задіяних у апоптозі, та детальне дослідження механізмів їх активації є досить актуальним, оскільки дозволить краще зрозуміти молекулярні основи клітинної загибелі та сприятиме пошуку ефективних засобів її направленої корекції. Враховуючи викладене, ми досліджували внесок основної ініціаторної каспази залежного від рецепторів сигнального шляху – каспази-8 у індукцію апоптозу лімфоцитів тимусу та селезінки щурів у відповідь на дію променевого чинника.

Відповідно до результатів, представлених на рис.1 Б, загальне опромінення тварин в дозі 1,0 Гр призводить до значних змін активності досліджуваної ініціаторної каспази. Так, через 30 хв після дії рентгенівського випромінювання у лімфоїдних клітинах тимусу спостерігається зростання активності каспази-8 у 1,5 раза, що може вказувати на залучення опосередкованого рецепторами шляху активації апоптогенного каскаду.

Показане нами зростання активності ферменту у ранні строки після опромінення можна пояснити належністю тимоцитів до клітин I типу (Т-клітини, В лімфобластоподібні клітини лінії SKW 6,4 та клітини Т лімфоми лінії H9, клітини мезенхіми), характерною особливістю яких є високий ступінь утворення DISC комплексів та, відповідно, рекрутування і активація молекул прокаспаз-8 у відповідь на олігомеризацію поверхневих рецепторів [5]. Слід зазначити, що для клітин даного типу кількість молекул активованої каспази-8 є достатньою як для незалежної від мітохондрій безпосередньої активації ряду ефекторних каспаз, так і для додаткової активізації мітохондріального шляху реалізації апоптозу.

Зв'язок між рецептор-опосередкованим апоптогенним сигнальним каскадом та мітохондріями здійснюється за допомогою проапоптичного білка Bid, гідроліз якого каспазою-8 обумовлює транслокацію C-кінцевого фрагменту tBid, що містить BH3-домен, до мітохондрій та індукцію як самостійно, так і за участі білків Bax і Bak, вивільнення з міжмембранного простору мітохондрій проапоптичних чинників з подальшим утворенням апотосоми і активацією ефекторних каспаз [6].

Оскільки каспаза-3, завдяки розщепленню ряду визначальних для підтримання клітинного гомеостазу білків, розглядається як одна з основних ефекторних молекул виконавчої стадії у багатьох моделях апоптозу, наступним нашим завданням було дослідити активність даної каспази за апоптозу, індукованого дією іонізуючої радіації.

Нашими експериментальними дослідженнями встановлено зростання активності каспази-3 у 1,26 раза через 30 хв після опромінення, що корелює із відповідними змінами активності каспази-8 і може бути пояснено саме активацією останньої, субстратом якої, окрім інших клітинних білків, є і каспаза-3.

На третю годину після дії на щурів рентгенівського випромінювання в дозі 1,0 Гр спостерігається подальше зростання активності обох досліджуваних ферментів. Так, активність каспази-8 і каспази-3 зростала відповідно у 1,57 та 2,8 раза (рис. 1).

Одержані нами результати узгоджується з даними інших авторів. Так, в роботах Coelho D. et al та Gong B. et al [7, 8] продемонстровано активацію каспази-3 лише через дві години після дії променевого чинника у дозі 10 Гр; при цьому прояв максимальної активності ферменту припадав на четверту годину після опромінення. Автори відзначили кореляцію між апоптотичними змінами, виявленими за типовими морфологічними ознаками, та підвищенням активності каспази-3 і порушенням її субклітинної локалізації.

Дані щодо активації каспази-8 можна пояснити з позицій описаної в літературі концепції, згідно з якою дія променевого чинника обумовлює залежне від часу посилення експресії поверхневих Fas рецепторів [9]. Зростання кількості рецепторів розглядається як додатковий чинник, що спрямовує пошкоджені лімфоцити на шлях загибелі за механізмом апоптозу, оскільки при цьому підвищується ймовірність їх взаємодії з клітинами, що несуть Fas ліганди.

Значне зростання активності каспази-3, в свою чергу, може бути наслідком подальшої активації каспази-8 або пов'язано із залученням мітохондріальної ланки апоптозу, яка на сьогодні вважається провідною під час реалізації клітинної загибелі, обумовленої надходженням проапоптогенних сигналів зсередини клітини, зокрема, внаслідок дії ДНК-пошкоджуючих агентів чи розвитку оксидативного стресу.

Особливо цей процес характерний для клітин із нестабільним геномом, до яких належать і тимоцити. Дія іонізуючої радіації є додатковим фактором, який викликає дестабілізацію ДНК, що на фоні зниженої ефективності функціонування систем репарації призводить до накопичення певного рівня нерепарованих одно- і дволанцюгових розривів ДНК та ініціації шляхів індукції апоптозу, що зв'язують ядерний компартмент з мітохондріальним.

Мітохондрії (залежно від типу клітин, тривалості та інтенсивності дії стрес-агентів), з одного боку забезпечують ампліфікацію проапоптотичних сигналів, з іншого – здійснюють їх конвергенцію у загальну ефекторну фазу

апоптозу. Подібна функція мітохондрій тісно пов'язана із станом мітохондріальної мембрани та утриманням у міжмембранному просторі ряду проапоптотичних чинників, зокрема, цитохрому с. Його вивільнення у цитозоль, обумовлене або неспецифічним розривом зовнішньої мембрани внаслідок набрякання мітохондрій, або через утворення у мембрані специфічних пор, призводить до активації каспази-9, яка далі за каскадним механізмом активує прокаспазу-3.

Результати визначення активності ініціаторної та ефекторної каспаз у лімфоїдних клітинах селезінки дещо відрізняються від аналогічних результатів, одержаних для тимоцитів. Виявлені відмінності частково можна пояснити різним ступенем диференціювання, різною метаболічною активністю обох типів досліджуваних клітин. Так, популяція лімфоцитів тимусу представлена переважно "незрілими" клітинами (до 90-95%), в той час як серед лімфоцитів селезінки лише близько 15-20% клітин є "незрілими".

Згідно з одержаними нами результатами (рис. 2 Б) через 30 хв після дії на тварин променевого чинника в дозі 1,0 Гр у лімфоїдних клітинах селезінки спостерігається зростання у 1,15 раза активності каспази-8, тоді як на третю годину після опромінення активність ферменту знижувалася у 2 рази порівняно з контролем.

Аналізуючи дещо різну спрямованість значень активності каспази-8 у обох досліджуваних типах клітин, потрібно враховувати, що лімфоцити тимусу і селезінки різняться репертуаром поверхневих рецепторів, що може впливати на динаміку залучення рецептор-опосередкованого шляху проведення апоптогенного сигналу.

Тимоцити, залежно від стадії розвитку, експресують, окрім TCR, ряд інших рецепторів, що належать переважно до суперродини TNF рецепторів – Fas, TNFR1, DR3, DR5. Типовою ознакою даних рецепторів є наявність у цитоплазматичному регіоні молекули еволюційно консервативного мотиву – домену смерті DD (близько 60-80 амінокислотних залишків), який через взаємодію з відповідними адаптерами забезпечує трансдукцію позаклітинних сигналів до каспази-8, -10 [10].

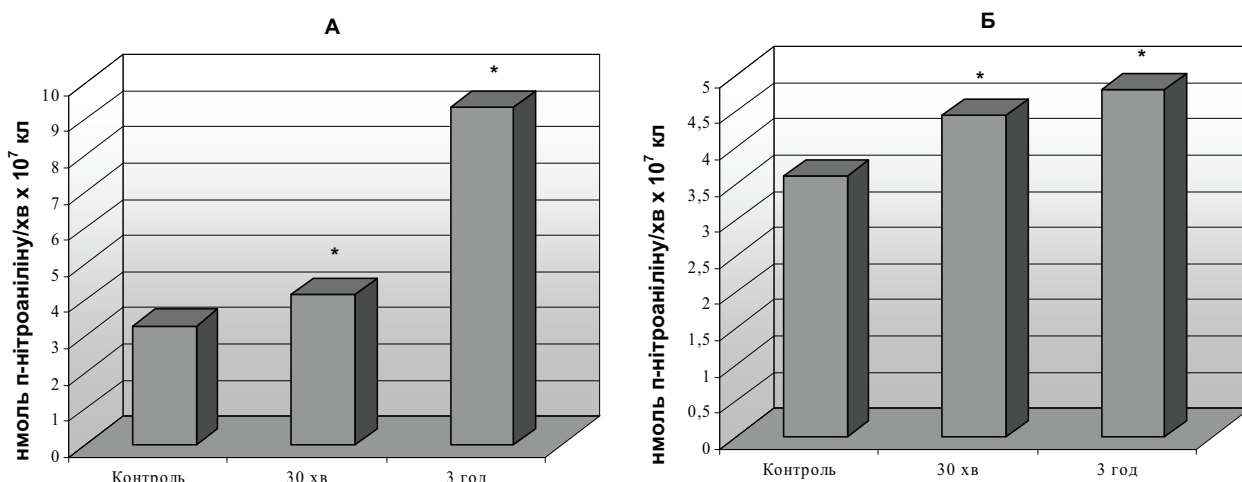


Рис.1. Активність каспази-3 (А) і каспази-8 (Б) у лімфоцитах тимусу щурів за дії іонізуючої радіації в дозі 1,0 Гр

* – достовірно відносно контролю,
P ≤ 0,05

Для лімфоцитів селезінки характерний дещо нижчий рівень експресії Fas рецепторів, виключення становить популяція "незрілих" клітин, що локалізуються у зародкових центрах селезінки. Особливістю функціонування

Fas рецепторів у В-клітинах є можливість їх регуляції за допомогою інших поверхневих рецепторів (BCR, CD40 та ін.), що обумовлює рецептор-специфічне варіювання чутливості клітин до Fas-індукованого апоптозу. Так,

наприклад, експресія Fas і, відповідно, чутливість клітин до апоптозу, значно зростає під час активації В-лімфоцитів, зокрема, їх обробки поліклональними активаторами ліпополісахаридами, стимуляції рецепторів CD40 та інше. Дещо відмінна ситуація спостерігається при проведенні активаційного сигналу через

BCR – їх олігомеризація після дії анти-Ig антитіл та певних специфічних антигенів викликає активацію В-лімфоцитів, але в даному випадку чутливість до Fas-опосередкованого апоптозу значно знижується, що пов'язують з явищем "Fas-резистентності" [11, 12].

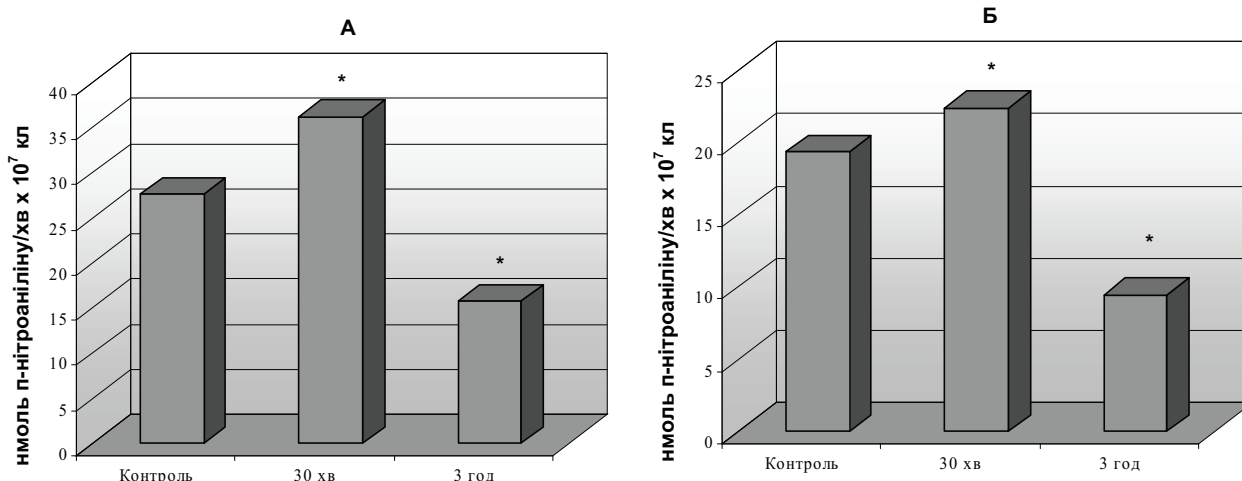


Рис.2. Активність каспази-3 (А) і каспази-8 (Б) у лімфоцитах селезінки щурів за дії іонізуючої радіації в дозі 1,0 Гр

* – достовірно відносно контролю,
P ≤ 0,05

Показане нами зростання активності каспази-8 у ранні строки (30 хв) після дії іонізуючої радіації вказує на залучення пов'язаного з поверхневими рецепторами шляху надходження апоптотичного сигналу. Оскільки більшість лімфоцитів селезінки мають низький рівень експресії Fas рецепторів, а радіаційна індукція експресії Fas рецепторів потребує деякого часу, вагома роль під час ініціації апоптотичної загибелі в даних умовах належить BCR рецепторам. Залежно від ступеня олігомеризації їх позаклітинних ділянок можливі два варіанти проведення сигналу загибелі, спільною ланкою яких є зниження трансмембранного потенціалу мітохондрій, вивільнення проапоптотичних чинників та послідовна активація каспази-9 і каспази-3. Один із шляхів (при недостатньому ступені олігомеризації рецепторів) включає незалежні від активації каспаз механізми зниження трансмембранного потенціалу мітохондрій. Характерною рисою іншого шляху, навпаки, є залежність від каспази-8 порушення цілісності мітохондріальної мембрани.

Значне зниження активності каспази-8 у лімфоцитах селезінки через три години після опромінення частково можна пояснити саме з позицій описаного вище явища Fas-резистентності, оскільки його індукція та розвиток спостерігається не відразу, а впродовж декількох годин, під час яких відбувається активація синтезу антиапоптотичних білків родини Bcl-2, зокрема, Bcl-X_L та синтез конкуруючих з каспазою-8 за сайти зв'язування з адаптером FADD молекул FLIP.

На основі аналізу літературних джерел можна припустити, що рівень експресії Fas рецепторів є одним із факторів, які можуть впливати на чутливість клітин до Fas-опосередкованого апоптозу. Оскільки серед попу-

ляції тимоцитів, значно більше клітин, що містять Fas, ніж серед лімфоцитів селезінки, різна динаміка змін активності каспази-8 у обох типах досліджуваних клітин та більш виражена активація даного ферменту (через 30 хв після опромінення) у тимоцитах можуть бути пов'язані із різною кількістю рецепторів, що утворюють кластери, а отже із різною кількістю молекул прокаспаз-8, залучених до DISC комплексів.

Додатковим чинником, що сприяє збільшенню ступеня кластеризації доменів рецепторів може бути їх просторове зближення, внаслідок порушення фізико-хімічних характеристик мембран. Як відомо, однією з ранніх подій, що розвиваються у відповідь на дію іонізуючого випромінювання, є посилення утворення активних кисневих метаболітів, стимуляція каскаду вільнорадикальних процесів, що прямо чи опосередковано призводить до ураження ліпідної компоненти мембран, порушення співвідношення кількості ненасичених жирних кислот у молекулах ліпідів, а отже і до змін структурно-функціональних властивостей мембран, зокрема, підвищення її текучості.

Опосередковано про радіаційно-обумовлене порушення ліпідного складу мембран свідчить накопичення продуктів перекисного окиснення ліпідів, зокрема, малонового діальдегіду. Відповідно до даних літератури та наших власних експериментальних досліджень (рис.3) у тимоцитах щурів у ранній післярадіаційний період вміст вторинних продуктів ПОЛ зростав у 1,38 раза (30 хв після опромінення) та у 1,25 раза (три години після опромінення), в той час як у спленоцитах відповідно у 1,16 та 1,2 раза.

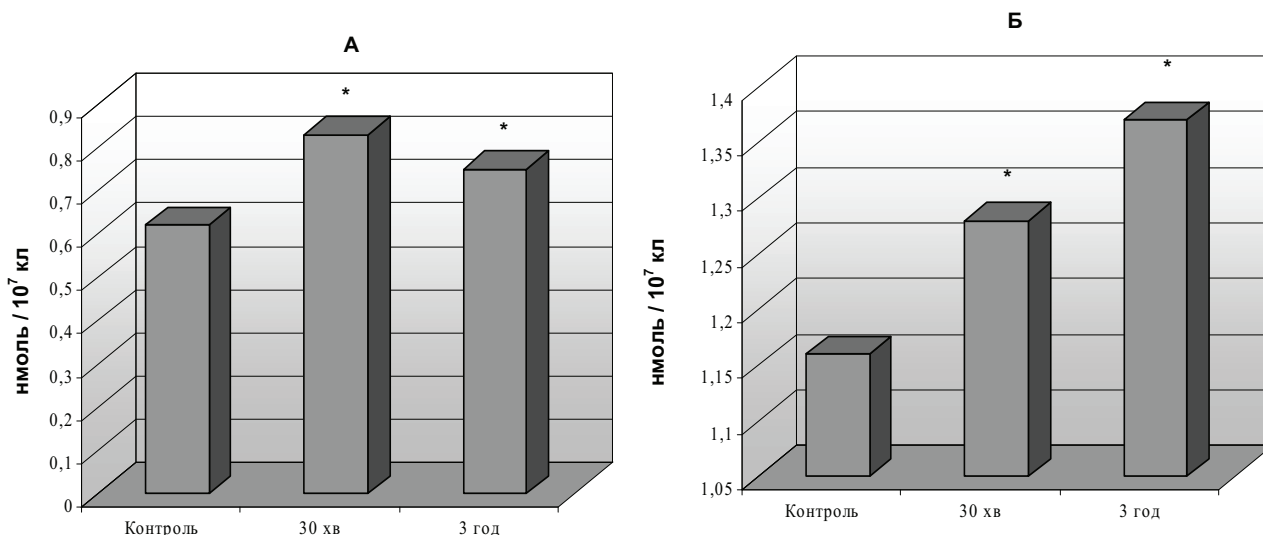


Рис.3. Вміст ТБК-активних продуктів у тимоцитах (А) спленоцитах (Б) щурів за дії іонізуючої радіації в дозі 1,0 Гр
* – достовірно відносно контролю, P ≤ 0,05

Таким чином, вищий ступінь активації каспази-8 у тимоцитах, порівняно із спленоцитами, частково можна пояснити не тільки більшою кількістю Fas рецепторів, представлених на поверхні клітин, а й можливістю просторового зближення груп даних рецепторів, внаслідок підвищення текучості мембран [13, 14].

Одержані нами результати стосовно радіаційно-індукованих змін активності каспази-3 у лімфоцитах селезінки повністю узгоджуються з відповідними змінами активності каспази-8 і не суперечать даним літератури. Так, Hallan E. et al [15] встановили, що за γ-опромінення В-лімфоцитів в дозі 6,0 Гр зростання активності каспази-3 відбувається лише через 8 та 24 години.

Отже, зміни активності регуляторних та ефекторних компонентів каскаду каспаз за дії променевого чинника призводять до реалізації загибелі досліджуваних клітинних популяцій лімфоїдних органів шляхом апоптозу.

1. Rehemtulla A., Hamilton C.A., Chinnaiyan A.M. Dixit V.M. // J. Biol. Chem. – 1997. – Vol.272. – P. 25783-25786.
2. Aragane Y., Kulms D., Metzke D., Wilkes G., Poppelmann B., Luger T.A., Schwarz T. // J. Cell. Biol. – 1998. – Vol.140. – P.171-182.
3. Лимфоциты: Методы / За ред. Клаус Д. – Москва: Мир, 1990. – 395 с.
4. Гаврилов В.П., Гаврилова А.Р., Майорова И.Г. // Вopr. мед. химии. – 1987. – №1. – С.118-122.
5. Carsten Scaffidi C., Schmitz I., Zha J. // J. Biol. Chem. – 1999. – Vol.274. – P. 22532-22538.
6. Reap Elizabeth, Roof Kevin, Maynor Kenrick, Borrero Michelle, Booker Jessica and Cohen Philip // Immunology. – 1997. – Vol. 94. – P. 5750-5755.
7. Coelho D., Holl V., Weltin D., Lacournerie T., Magnenet P., Dufour P., Bischoff P. // Br. J. Cancer. – 2000. – Vol. 83(5). – P.642-649.
8. Gong B., Endlich B., Sharma Y., Chen Q., Abraham S., Macklis R.M., Almasan A. // Neurocritical Car. – 2005. – Vol.3, №1. – P. 71-76(6).
9. Booker J.K., Reap E.A. // J. Immunol.-1998. – Vol.161. – P.4536-4541.
10. Sophie Roy, Donald W. Nicholson // J. Exp. Med. – 2000. – Vol.192, №8. – P.21-25.
11. Mizuno T., Zhong X., Rothstein T. L. // Apoptosis. – 2003. – Vol.8, №5. – P.451-460.
12. Tumang J.R., Negm R.S., Solt L.A., Schneider T.J. // J. Immunol.-2002. – Vol.168. – P. 2712-2719.
13. Walid Elyassaki, Shiyong Wu // Photochemistry and Photobiology. – 2006. – Vol.82(3). – P.787-792.
14. Bo Bang, Robert Gniadecki, Jørgen K. Larsen, Ole Baadsgaard, Lone Skov // Experimental Dermatology. – 2003. – Vol.2, №6. – P.791 – 798.
15. Hallan E., Blomhoff H.K., Smeland E.B., Lomo J. // Scand. J. Immunol. – 1997. – Vol. 46(6). – P.601-608.

Надійшла до редколегії 23.03.10

УДК: 612.112.95:618.11-006.6]:615.37

О. Скачкова, Ю. Швець, канд. біол. наук,
Н. Храмовська, канд. біол. наук

ОСОБЛИВОСТІ МІГРАЦІЇ ДЕНДРИТНИХ КЛІТИН У МИШЕЙ ЛІНІЇ СВА

Досліджено особливості міграції дендритних клітин у інтактних мишей лінії СВА при різних шляхах введення цих клітин в організм. Показано, що через 20 годин після введення більшість дендритних клітин зосереджується при внутрішньошкірному шляху введення – у лімфовузлах середостіння, брижі і тканини печінки, при інтраперитонеальному і внутрішньовенному шляхах введення – у лімфовузлах брижі, при підшкірному шляху введення – у лімфовузлах брижі, а також тканині печінки і легенів.

Migration features of dendritic cells in intact CBA mice were investigated dependent on the route of their injection. It was shown that 20 hours after injection dendritic cells were detected in hepatic tissue and mediastinal and mesenteric lymph nodes at intracutaneous route of administration. Intraperitoneal and intravenous dendritic cell injection results in cells accumulation in mediastinal lymph nodes. Dendritic cells were detected in hepatic and lung tissue and mesenteric lymph nodes after intracutaneous administration.

Вступ. Дендритні клітини (ДК) є найефективнішими антигенпрезентуючими клітинами. Знаходячись у будь-яких тканинах in vivo ДК поглинають антигени із мікрооточення, процесують їх та презентують у комплексі з молекулами МНС. Для взаємодії зі специфічними лімфоцитами вони мігрують у вторинні лімфоїдні органи, де стимулюють розвиток первинної та вторинної імунної відповіді [1, 3]. Отже, оскільки ДК здатні ініціювати розвиток імунної відповіді, саме вони є найбільш перс-

пективними претендентами для використання у складі протипухлинних вакцин. Проте, незважаючи на багаторічний досвід використання ДК-вакцин в експерименті та клінічних дослідженнях, все ще залишається ряд невирішених питань, наприклад, щодо шляхів та кількості введення ДК. Шлях введення ДК у макроорганізм визначає особливості подальших напрямків міграції цих клітин у периферичні лімфоїдні органи і подальший розвиток певних ефекторних механізмів імунної відпо-

віді. Сьогодні отримано багато даних щодо природних шляхів міграції ДК у периферичні лімфоїдні органи після поглинання антигену [7]. Проте, залишається невирішеним питання щодо міграції зрілих ДК, отриманих і "навантажених" антигеном *in vitro*, а потім введених в організм в якості вакцинного препарату. Отже, метою нашого дослідження було вивчити шляхи міграції зрілих ДК, навантажених пухлинним антигеном (ПА), в експерименті з використанням мишей лінії СВА при різних шляхах введення цих клітин в організм тварин. Використаний нами експериментальний підхід можливо екстраполювати на клінічну ситуацію за участю онкологічних хворих, яким вводять аутологічні протипухлинні вакцини на основі ДК.

Об'єкт і методи дослідження. В експерименті були використані 30 мишей лінії СВА (самки вагою 19-22 г, віком 1,5-2 місяці) розведення віварію Національного інституту раку. Для експериментальних досліджень в якості джерела ДК були використані спленцити сингенних інтактних мишей. ДК отримували з дотриманням правил асептики за наступною методикою. Тканину селезінки подрібнювали в середовищі RPMI 1640 та фільтрували крізь нейлоновий фільтр для отримання однорідної клітинної суспензії. Клітини в концентрації 5×10^6 /мл інкубували при 37 °C та 5 % CO₂ протягом 24 годин в повному середовищі RPMI-1640 з додаванням 10 % ембріональної телячої сироватки, 200 мМ/л глютаміну, 100 од/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину та 25 мМ/л 5-меркаптоетанолу. Клітини, які не прикріпилися до пластику, концентрували та центрифугували 15 хв при 1000 об/хв в градієнті щільності 14,5 % метризаміду. Більш ніж 70 % інтерфазних клітин за морфологічними ознаками відносяться до ДК. Потім ДК фарбували (5(6)-карбоксифлюоресцеїндацетат-сукцинілмідилефіром (КФДА) "Sigma" в концентрації 0,625 мкг/мл середовища RPMI-1640 без білку). Цей барвник з'єднується з білками в цитоплазмі клітини і не впливає на її життєздатність. Клітини зберігали забарвлення протягом доби. Далі ДК навантажували пухлинним антигеном (ПА). Для цього клітини інкубували в концентрації 1×10^6 /мл в повному поживному середовищі RPMI-1640 протягом 4 годин при 37 °C в атмосфері 5 % CO₂ в присутності пухлинних клітин (співвідно-

шення 1 ДК : 3 пухлинні клітини). Далі ДК відмивали та вводили в кількості $7,5 \times 10^5$ /миша за різними шляхами, а саме: інтраперитонеально, внутрішньовенно, внутрішньошкірно, підшкірно.

Через 20 годин після введення ДК тварин девіталізували та забирали наступні органи: лімфовузли (середостіння, пахові, брижі), печінку, селезінку, легені, тимус.

За допомогою проточного цитофлюориметра FACSCalibur ("Becton Dickinson", США) визначали відсоток та середню інтенсивність флюоресценції (Mean) клітин в органах, що світяться в зеленій області флюоресценції, тобто пофарбованих КФДА. Дослідження проводились за допомогою програмного забезпечення CellQuest-PRO для комп'ютерів Макінтош для придбання та аналізу даних [4].

Результати та їх обговорення. Відомо, що для терапевтичного застосування використовуються зрілі ДК, оскільки тільки вони здатні презентувати пухлиноасоційовані антигени "наївним" або праймованим Т-лімфоцитам, викликаючи їх активацію і стимулюючи розвиток, відповідно, первинної та вторинної протипухлинної імунної відповіді [2, 3, 4]. Разом з тим відомо, що міграційна активність ДК знаходиться в оберненій залежності від ступеню зрілості клітин, тобто найбільш високу активність мають незрілі ДК, а найменшу – зрілі [6]. Тому, головним завданням дослідження було встановити місце локалізації ДК, навантажених ПА, у лімфоїдних органах інтактних тварин через 20 годин після введення цих клітин різними шляхами: внутрішньошкірним, інтраперитонеальним, підшкірним, внутрішньовенним.

Як видно з табл. 1, у інтактних тварин спостерігається висока міграційна активність ДК, навантажених ПА, при будь-якому шляху введення клітин. Проте, при кожному шляху введення ДК спостерігаються певні особливості накопичення ДК у периферичних лімфоїдних органах. Наприклад при інтраперитонеальному і підшкірному шляху введення більшість мічених КФДА ДК спостерігали у лімфовузлах брижі. Невелику кількість введених клітин також виявляли у лімфовузлах середостіння, тканині легень і печінки. Цікавим є той факт, що тільки при цих шляхах введення мічені клітини виявляли також у тканині тимуса.

Таблиця 1. Розподіл введених ДК за органами в залежності від шляхів введення (через 20 годин після введення)

Шлях введення	Середня інтенсивність флюоресценції (Mean)						
	лімфовузли			Тимус	Селезінка	Легені	Печінка
	середостіння	пахові	брижі				
Внутрішньо-шкірно	12,73±2,77	0,57±0,29	4,95±0,64	0,32±0,17	0,50±0,29	1,12±0,39	11,08±2,17
Інтрапери-тонеально	3,50±0,91	0,65±0,43	7,56±1,77	1,58±0,63	0,30±0,17	2,74±0,27	4,44±2,22
Підшкірно	3,95±0,41	0,28±0,19	6,03±1,09	1,41±0,51	0,69±0,45	4,18±0,13	17,42±9,34
Внутрішньо-венно	4,18±1,28	0,76±0,33	14,19±1,82	0,52±0,27	2,04±0,96	0,74±0,74	6,30±6,30

При внутрішньошкірному шляху введення через 20 годин після введення більшість мічених КФДА ДК виявляли у лімфовузлах середостіння, дещо меншу кількість клітин – лімфовузлах брижі та тканині печінки, невелику кількість мічених клітин – у тканині легень.

При внутрішньовенному введенні більшість ДК через 20 годин після введення спостерігали у лімфовузлах брижі і невелику кількість у лімфовузлах середостіння та тканині печінки. Крім того, невелику кількість введених ДК виявляли у тканині селезінки, що є цілком зрозумілим, оскільки цей лімфоїдний орган контролює гематогенні шляхи поширення антигенів в організмі.

Висновки. Показано, що ДК через 20 годин після введення будь-яким способом інтактним мишам лінії СВА накопичуються у лімфовузлах брижі. Невелику кількість мічених ДК спостерігали у лімфовузлах середостіння та тканині печінки. При внутрішньошкірному,

підшкірному і інтраперитонеальному шляхах введення невелику кількість мічених КФДА ДК спостерігали у тканині легень, а при внутрішньовенному шляху введення – у тканині селезінки. Отже, отримані нами дані можуть бути корисними для обґрунтування способів застосування вакцин на основі ДК у хворих із злоякісними новоутвореннями, оскільки ефективність цього методу багато в чому залежить від його раціонального використання.

1. Балдуева І.А. Вакцины на основе дендритных клеток в лечении злокачественных опухолей/ V Российская онкологическая конференция: Матер.наук.конф., Москва 27-29 ноября 2001 г. 2. Верещагин Е.И., Хоценко О.М., Душкин М.И. Энтеральные вакцины, индуцирующие развитие толерантности к вводимому антигену // Цитокины и воспаление. – 2008. – №2. – С. 25-29. 3. Вершигора А.Ю., Пастер Е.У., Колибо Д.В. та ін. Иммунология / За заг. ред. Е.У. Пастер. – К: Вища школа, 2005. – 599 с. 4. Пашенков М.В., Пинегин Б.В. Основные свойства дендритных клеток // Иммунология. – 2001. – № 4 – С.7-15. 5. Применение проточ-

ной цитометрії для оцінки функціональної активності імунної системи людини. – М. 2001. – 53 с. 6. Dogniaux S., Amigorena S., Lind M. et al Cognate CD4+ T-cell dendritic cell interactions induce migration of immature dendritic cells through dissolution of their podosomes // Blood. – 2008. – Vol. 111, №7. – P.3579-3590. 7. Randolph G.J., Angeli V., Swartz M.A.

Dendritic cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels // Nature Reviews Immunology. – 2005. – Vol. 5. – P.617-628.

Надійшла до редколегії 26.03.10

УДК 577.352.3

І. Гринюк, канд. біол. наук

ВПЛИВ H_2O_2 ТА Ca^{2+} НА НАБУХАННЯ МІТОХОНДРІЙ ТИМОЦИТІВ

Досліджено вплив перексиду водню та кальцію на набухання мітохондрій тимоцитів. Встановлено, що додавання до середовища інкубації мітохондрій 0,1 мМ H_2O_2 та Ca^{2+} (50 мкМ) викликало посилення неселективної проникності мітохондріальної мембрани. Показано, що за умови внесення до середовища інкубації мітохондрій 50 мкМ $CaCl_2$ спостерігалось більш значне, порівняно з викликанням H_2O_2 , зниження світлорозсіювання суспензії мітохондрій. Окрім того, кальцій був ефективнішим у індукції цього процесу та посилював викликане перексидом водню набухання мітохондрій.

Influence of hydrogen peroxide and calcium on thymocytes mitochondrial swelling was investigated. Addition into incubation medium of mitochondria 0,1 mM H_2O_2 and Ca^{2+} (50 μ M) caused increase nonselective mitochondrial membrane permeability. It was shown, that under condition of addition 50 μ M $CaCl_2$ into mitochondrial incubation medium were observed more significant, compared with caused H_2O_2 , decreasing of light scattering suspensions of mitochondria. In addition, calcium was more effective in an induction of this process and increased wick was caused by hydrogen peroxide mitochondrial swelling.

Вступ. Останнім часом набухання мітохондрій та відкриття неселективних мембранних пор приділяється значна увага, оскільки ці процеси супроводжуються виходом апоптогенних факторів із мітохондрій у цитозоль, що є центральним моментом індукції апоптозу. Апоптоз є основним механізмом підтримання гомеостазу тканин як за фізіологічних так і патологічних умов та реалізується внаслідок прямої чи опосередкованої дії апоптогенних чинників, таких як ксенобіотики, різні види випромінювань, індуктори окисного стресу на мітохондрії [1 – 6].

Як було показано раніше [4] з використанням флюоресцентного барвника Хехст 33342 через 3 год після додавання до суспензії тимоцитів перексиду водню у концентрації 0,1 мМ виявлялися морфологічні ознаки апоптичної загибелі – конденсація хроматину, фрагментація ядра та поява апоптичних тілець. Фактори, які можуть активувати процес апоптозу, містяться як у міжмембранному просторі, так і у матриксі мітохондрій, а необхідною умовою їх виходу є відкриття неселективних пор у внутрішній мембрані мітохондрій. Важливу роль у активації цього процесу відіграють активні форми кисню (АФК) та Ca^{2+} [7, 8, 9]. Під дією як АФК, так і іонів кальцію підвищується проникність мітохондріальної мембрани та відбувається вивільнення у цитозоль білків міжмембранного простору мітохондрій (цитохрому с, флавопротеїну АІФ, ендонуклеази G, білків Smac/Diablo та Omi/HtrA2), які можуть активувати ядерні ендонуклеази і протеїнази та запускати програму загибелі клітин. Проте механізм, за яким відбувається зміна проникності мітохондріальної мембрани на даний час залишається недостатньо з'ясованим.

У зв'язку з цим метою роботи було дослідити в умовах *in vitro* вплив перексиду водню, як індуктора окисного стресу та іонів Ca^{2+} на неспецифічну проникність мітохондріальної мембрани, яку оцінювали за зниженням світлорозсіювання суспензії мітохондрій, зумовленого їх набуханням.

Матеріали та методи. Тимоцити отримували з тимусу щурів лінії Вістар вагою 120-150 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію.

Тимус (200 – 300 мг) перетирали через чотири шари нейлонової сітки у буфер такого складу (мМ): Na_2HPO_4 – 3, KCl – 5, NaCl – 120, $CaCl_2$ – 1, глюкоза – 10, $MgSO_4$ – 1, $NaHCO_3$ – 4, HEPES – 10, рН 7,4. Загальний об'єм доводили до 10 мл. Отриману суспензію клітин відмивали (600 г, 7 хв) у тому ж буфері. Надосадову рідину зливали, а осад ресуспендували до концентрації $2-5 \times 10^8$ кл/мл. Кількість тимоцитів підраховували за допомогою світло-

вого мікроскопу Biolam "ЛОМО" Р12 у камері Горяєва з використанням 0,4 % розчину трипанового синього.

Для отримання мітохондріальної фракції суспензію клітин (10^8 клітин) гомогенізували у 10-кратному об'ємі буферу (мМ): сахароза – 250, KCl – 50, KH_2PO_4 – 2,5, $MgCl_2$ – 2, HEPES – 10 (рН 7,4) у щільно притертому скляному гомогенізаторі Поттера за підібраних нами умов, описаних у [10]. Отриману суспензію осаджували (1500g, 10 хв), осад видаляли, а надосадову центрифугували за умов: 15000 g, 10 хв при $+4^\circ C$. Осад ресуспендували в 10 мл того ж буферу та центрифугували за тих же умов, процедуру повторювали двічі. Осад використовували як фракцію мітохондрій.

Набухання мітохондрій оцінювали за зміною світлорозсіювання суспензії, що містила мМ: сахароза – 150, KCl – 50, KH_2PO_4 – 2, сукцинат -1, тріс – 5 (рН 7,4) та 2 – 3 мг білка мітохондріальної фракції. Реєстрацію світлорозсіювання, яку здійснювали у термостатованій кюветі (t $30^\circ C$) на спектрофотометрі КФК-3 (СПСР) при довжині хвилі 520 нм [11], розпочинали у момент внесення мітохондрій у пробу. Безперервне розмішування суспензії забезпечувалось магнітною мішалкою. Запис розпочинали у момент внесення мітохондрій у середовище інкубації об'ємом – 3 мл, що містило сукцинат. Пероксид водню (0,1 мМ) або $CaCl_2$ (50 мкМ) вносили у пробу через 1 хв після початку інкубації.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили загальноприйнятими методами з використанням t-критерія Стюдента.

Результати та їх обговорення. Набухання мітохондрій – це збільшення об'єму матриксу під дією надлишкового осмотичного тиску всередині мітохондрій, який перевищує осмотичний тиск середовища. Кінетику цього процесу оцінювали за зниженням світлорозсіювання суспензії мітохондрій при 520 нм [11]. За зміною величини E_{520} було розраховано відносні зміни об'єму та швидкість набухання мітохондрій за їх інкубації у контролі та за додавання 0,1 мМ H_2O_2 або 50 мкМ $CaCl_2$ (табл.).

За інкубації ізольованих мітохондрій тимоцитів упродовж 3 хв спостерігалось незначне зниження світлорозсіювання суспензії, відносна швидкість набухання становила $0,01 \pm 0,001$ од.екст./хв/мг білка.

Додавання H_2O_2 до середовища інкубації мітохондрій призводило до поступового зниження світлорозсіювання суспензії до $0,33$ од.екст./мг білка, величини відносного об'єму мітохондрій та швидкості набухання становили відповідно $0,095 \pm 0,002$ од.екст./мг білка та $0,075 \pm 0,003$ од.екст./ хв· мг білка.

Таблиця 1. Зміни об'єму мітохондрій тимоцитів за умов додавання перексиду водню чи кальцію ($M \pm m$, $n = 6$)

Чинник	Світлопоглинання E_{520} , од.екст./мг білка		Відносні зміни об'єму мітохондрій ΔE_{520} , од.екст./мг білка	Відносна швидкість набухання мітохондрій, од.екст./хв мг білка
	Початкове	Кінцеве		
Контроль	$0,425 \pm 0,005$	$0,405 \pm 0,004$	$0,02 \pm 0,001$	$0,008 \pm 0,001$
$0,1 \text{ mM H}_2\text{O}_2$	$0,425 \pm 0,005$	$0,33 \pm 0,004$	$0,095 \pm 0,002^*$	$0,075 \pm 0,003^*$
50 мкМ CaCl_2	$0,425 \pm 0,005$	$0,26 \pm 0,003$	$0,165 \pm 0,003^*$	$0,145 \pm 0,003^*$

* $P < 0,05$, порівняно з контролем

За умови внесення у середовище інкубації мітохондрій 50 мкМ CaCl_2 спостерігалось більш значне, порівняно з викликаним H_2O_2 , зниження світлорозсіювання суспензії мітохондрій. Відносний об'єм мітохондрій збільшувався у 1,7 рази, а швидкість набухання – у 1,9 рази порівняно з показниками за дії H_2O_2 . Характерною рисою Ca^{2+} -залежного набухання мітохондрій є також скорочення часу, необхідного для досягнення максимальної амплітуди.

Отже, перексид водню та CaCl_2 посилюють неспецифічну проникність внутрішньої мітохондріальної мембрани. Для того, щоб з'ясувати, чи діють обидва чинники за однаковими механізмами, ми провели експериме-

нти, у яких здійснювали послідовне внесення H_2O_2 та CaCl_2 у середовище інкубації мітохондрій.

Як видно з даних, представлених на рис. 1, А, додавання CaCl_2 до мітохондрій, що були попередньо інкубовані з H_2O_2 , призводило до значного прискорення набухання мітохондрій та зростання його максимальної амплітуди. У випадку додавання H_2O_2 до мітохондрій, що були попередньо інкубовані з CaCl_2 , спостерігалось менш значне посилення набухання мітохондрій (рис. 1, Б).

Отже, індукована дією H_2O_2 неспецифічна проникність внутрішньої мітохондріальної мембрани посилюється за присутності іонів Ca^{2+} , а максимальний ефект набухання спостерігається за поєднання дії обох чинників.

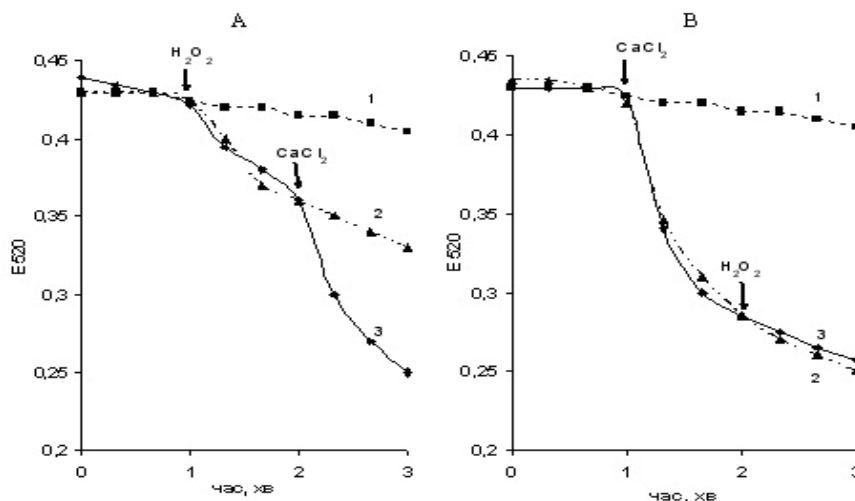


Рис. 1. Зміна світлорозсіювання суспензії ізолюваних мітохондрій тимоцитів у контролі (1), після додавання $0,1 \text{ mM H}_2\text{O}_2$ (2) та 50 мкМ CaCl_2 (3)

Виявлений вплив H_2O_2 на структурний стан мітохондріальної мембрани слід пов'язувати насамперед з його перетворенням на високореакційний гідроксил-радикал $\cdot\text{OH}$ у присутності Fe^{2+} , та посиленням процесів неферментативного вільнорадикального переокиснення. Відомо, що за фізіологічних умов вміст заліза у мітохондріях, окрім гемового та того, що входить до складу FeS білків, становить приблизно $1,7 \text{ нмоль/мг білка}$ – це залізо зв'язане у складі низькомолекулярних комплексів з АДФ, ГТФ, АТФ та цитратом [12, 13].

Найбільш вірогідним білком, залученим до формування неселективної пори за умов окисного стресу вважається вбудований у внутрішню мітохондріальну мембрану АДФ/АТФ антипортер, який містить 4 тіолові групи цистеїна, що легко окиснюються. Зміна конформації АДФ/АТФ антипортера за таких умов сприяє утворенню неселективної мітохондріальної пори [12].

Припускають, що під впливом продуктів вільнорадикального переокиснення порушуються бар'єрні властивості ліпідного бішару мембран, зокрема посилюється проникність мембран для іонів H^+/OH^- , внаслідок чого зростає продукція супероксид-аніону у ході одноелектронного відновлення O_2 у дихальному ланцюгу та фор-

мується замкнене коло процесів вільнорадикального переокиснення [14, 15].

Викликані додаванням CaCl_2 більш різке падіння світлорозсіювання суспензії мітохондрій та посилення індукованого перексидом водню набухання, можна пояснити залученням Ca^{2+} до декількох механізмів ушкодження мітохондріальних мембран [15]. На відміну від мілімолярних концентрацій катіону, які викликають утворення пори у результаті зв'язування зі специфічними Ca^{2+} -зв'язуючими центрами, мікромолярні концентрації Ca^{2+} самі по собі не можуть індукувати цей процес. Відкриття мітохондріальної пори за низьких концентрацій Ca^{2+} відбувається у результаті певних процесів, які супроводжуються окисненням субстратів у дихальному ланцюгу мітохондрій [16].

Так, перевантаження мітохондрій іонами кальцію призводить до інгібування I комплексу дихального ланцюга мітохондрій, за рахунок чого відбувається посилене утворення АФК [14], з наступним окисненням ендогенних піридинових нуклеотидів та тіолових груп білків мітохондріальних мембран. Такі процеси сприяють утворенню пор у внутрішній мітохондріальній мембрані. Показано також, що Ca^{2+} безпосередньо може впливати

на кінетику пероксидного окиснення ліпідів внаслідок конкуренції з іонами Fe^{2+} на поверхні мембран [12].

З іншого боку, іони кальцію активують фосфоліпазу A_2 , яка знаходиться на внутрішній мембрані мітохондрій та здійснює гідроліз фосфоліпідів. Цей фермент активується іонами кальцію, які містяться не у мітохондріальному матриксі, а поза мітохондріями. У нормі мітохондрії поглинають кальцій, видаляючи його із середовища, і тим самим активуюча дія Ca^{2+} запобігається. Внаслідок посилення активності фосфоліпази A_2 у мітохондріях підвищується вміст жирних кислот, які, як відомо, посилюють мембранну провідність та проникність для катіонів. Окрім того, жирні кислоти діють як "роз'єднуючі" дихального ланцюга, викликають набухання органел та зміну неспецифічної проникності мітохондріальних мембран [12]. В свою чергу продукт фосфоліпазного гідролізу – арахідонова кислота посилює утворення H_2O_2 мітохондріями шляхом взаємодії з I комплексом електрон-транспортного ланцюга [17]. У літературі є дані, що АФК та внутрішньомітохондріальний кальцій можуть діяти сумісно, індукуючи проникність внутрішньої мітохондріальної мембрани [15].

Висновки. Таким чином, результати експериментів, проведених нами на ізольованих мітохондріях тимоцитів, показують що під впливом H_2O_2 та CaCl_2 відбувається зниження світлорозсіювання суспензії, а отже набухання мітохондрій. Таким чином, за умов проникнення пероксиду водню у внутрішньоклітинний простір та підвищення концентрації вільного цитозольного Ca^{2+} у тимоцитах зростає вірогідність вивільнення апоптотичних факторів із мітохондрій у цитозоль, які реалізують програму загибелі клітини.

1. Maniati E., Potter P., Rogers N.J., Morley B.J. Control of apoptosis in autoimmunity // J Pathol. – 2008. – Vol. 214. – P. 190-198. 2. Brini M. Ca^{2+} signalling in mitochondria: mechanism and role in physiology and pathology

// Cell. Calcium. – 2003. – Vol. 34, № 4 – 5. – P. 399-405. 3. Santos N.A., Catão C.S., Martins N.M., Curti C., Bianchi M.L., Santos A.C. Cisplatin-induced nephrotoxicity is associated with oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria // Arch Toxicol. – 2007. – Vol. 81(7). – P. 495-504. 4. Гринюк І.І., Корнійчук Г.М., Капралов О.О., Матишевська О.П. Зміни структурного стану хроматину у тимоцитах на ранньому етапі апоптозу за індукції пероксидом водню та радіацією // Український біохімічний журнал. – 2004. – № 5. – С. 90 – 95. 5. Robertson J. D., Enoksson M., Suomela M., Zhivotovsky B., et al. Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome c release during etoposide-induced apoptosis // J. Biol. Chem. – 2002. – Vol. 277. – P. 29803 – 29809. 6. Pandey B.N., Mishra K.P. Modification of thymocytes membrane radiooxidative damage and apoptosis by eugenol // J. Environ Pathol. Toxicol. Oncol. – 2004. – Vol. 23, № 2. – P. 117 – 122. 7. Baumgartner H. K., Gerasimenko J. V., Thorne C., et al. Calcium Elevation in Mitochondria is the Main Ca^{2+} Requirement for Mitochondrial Permeability Transition Pore (mPTP) Opening // J. Biol. Chem. – 2009. – Vol. 284. – P. 20796 – 20803. 8. Гребиник Д. М., Гринюк І. І., Матишевська О. П. Исследование кальциевого гомеостаза в тимоцитах при апоптозе. II. Аккумуляция Ca^{2+} митохондриями и эндоплазматическим ретикуломом // Укр. біохім. журн. – 2005. – Т. 77, № 2. – С. 78 – 81. 9. Orrenius S., Zhivotovsky B., Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. – 2003. – Vol. 4, № 7. – P. 552-65. 10. Борисов С.І., Гринюк І.І., Ковальова В.А. та ін. Отримання та характеристика препарату ядер лімфоцитів тимуса і селезінки шурів // Вісник Київського університету. Серія "Біологія". – 1999. – Вип.29. – С. 12 – 14. 11. Olenov V.I., Suslova T.B., et al. Comparative study of different types of swelling of rat liver mitochondria // Studia Biophysica. – 1976. – Vol.2. – P. 147 – 161. 12. Владимиров Ю.А. Нарушение барьерных свойств внутренней и наружной мембран митохондрий, некроз и апоптоз // Биологические мембраны. – 2002. – Т.19, № 5. – С. 356 – 377. 13. Halliwell B., Gutteridge J.M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview // Methods Enzymol. – 1990. – Vol. 186. – P. 1-85. 14. Brookes P.S., Yoon Y., Robotham J.L., et al. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle // Am. J. Physiol. Cell Physiol. – 2004. – Vol. 287. – P. 817 – 833. 15. Гордеева А.В., Звягильская Р.А., Лабас Ю.А. Взаимосвязь между активными формами кислорода и кальцием в живых клетках // Биохимия. – 2003. – Т.68, вып. 10. – С.1318 – 1332. 16. Апопова О.В., Сагач В.Ф. Индукция митохондриальной поры под действием Ca^{2+} в миокарде крыс // Украинский биохимический журнал. – 2004. – Т. 76, № 1. – С. 48 -55. 17. Nethery D., Callahan L.A., Stofan D., Mattera R., DiMarco A., Supinski G. PLA_2 dependence of diaphragm mitochondrial formation of reactive oxygen species // J. Appl. Physiol. – 2000. – Vol. 89. – P. 72 – 80.

Надійшла до редакції 31.05.10

УДК 574.5; 572.1/4

В. Гнатюк, асп., В. Гаврилюк, канд. с/г наук,
М. Мусієнко, д-р біол. наук

СТАН РЕКРЕАЦІЙНОЇ ЗОНИ НПП "ПОДІЛЬСЬКІ ТОВТРИ" ЗА РАДІОНУКЛІДНИМ ЗАБРУДНЕННЯМ, ЯК ОДНОГО З ЧИННИКІВ ЕКОЛОГІЧНОГО СТАНУ ПАРКУ

У статті подано особливості радіонуклідного забруднення рекреаційної зони НПП "Подільські Товтри", проаналізовано рівень іонізуючого випромінювання на території парку у розрізі окремих сільських рад Городоцького, Червоноградського та Кам'янець-Подільського районів та показано щільність забруднення ґрунтів в точках особого контролю.

The features of radionuclide contamination of recreational area of NPP "Podil'ski Tovtri" are given in the article, the level of ionizing radiation is analysed on territory of park in the cut of separate village soviets of Gorodokskyi, Chervonohradskyi and Kam'ianets'-Podil's'kyi of districts and the closeness of contamination of soils is shown in points of special control.

Вступ.

Зростання антропогенного навантаження та глобальне забруднення екосистем і біосфери в цілому призводить до суттєвих змін їх параметричних і кодових (інформаційних) характеристик і спонукає біосистеми, які входять до їх складу, до істотних структурно-функційних перебудов у нових умовах трансформованого середовища їх існування, що вимагає від них низки відповідних адаптивних реакцій різного рівня і складності. Саме тому проблема забруднення природного середовища є однією з центральних у сучасній екології та природоохоронній діяльності. Наріжним каменем усього комплексу проблем цієї царини є кількісна оцінка стану (структурно-функціонального благополуччя) біологічних і екологічних систем, діагностика їх "норми" і "патології". При цьому вкрай актуальним залишається оцінка негативного впливу на біо- і еко- системи як окремих нега-

тивних чинників, їх груп, так і усього їх комплексу в цілому. Останнім часом насамперед дуже гостро стоїть проблема комплексної оцінки стану середовища. Особливо нагального вирішення потребує проблема прогнозування стану екосистем у зв'язку з екологічною оцінкою впливу антропогенних факторів [1].

Практичне застосування енергії атомного ядра було важливим етапом науково-технічного прогресу, однак воно спричинило нові складні екологічні проблеми. Випробування атомної зброї, вибухи атомних бомб над японськими містами Хіросімою та Нагасакі, аварія на Чорнобильській АЕС та інші радіоактивні аварії, розробки радіоактивних руд, поховання радіоактивних відходів тощо змінюють природний радіаційний фон та забруднюють біосферу радіоактивними речовинами.

Проникнення радіоактивних ізотопів у довкілля супроводжується підвищенням природного рівня радіоак-

тивності, призводить до погіршення здоров'я населення, а інколи і до генетичних порушень. З метою контролю радіаційної ситуації на певних територіях, створений радіаційний моніторинг, тобто система спостереження, попередження, оцінювання та прогнозування радіаційного стану довкілля [3].

Слід зазначити, що іонізуюче випромінювання, про існування якого людство дізналося тільки на межі XX століття завдяки відкриттю А. Бекереля та дослідженням П. Кюрі і М. Кюрі, впливає на нашу планету з самого початку її існування. Все живе і неживе на Землі піддавалося і піддається випромінюванню, що надходить з космічного простору і обумовлене природними радіонуклідами земної кори, розсіяними у ґрунтах, породах, що знаходяться у продуктах харчування, повітрі, воді, а також в середині самих організмів [4].

В даний час до природного фону випромінювання Землі почало додаватися випромінювання, обумовлене діяльністю людини. Широке проникнення джерел іонізуючого випромінювання у сферу повсякденного життя і діяльності людини, висока біологічна ефективність випромінювання і її гігієнічне значення обумовлюють необхідність гігієнічної регламентації радіаційного фактору навколишнього середовища з метою забезпечення протипроменевої безпеки населення [5].

Необхідно пам'ятати, що всі види радіоактивного випромінювання (рис 1.) супроводжуються звільненням різної кількості енергії і високою проникною здатністю, відтак вони мають різний вплив на живі організми та екосистеми в цілому [6].

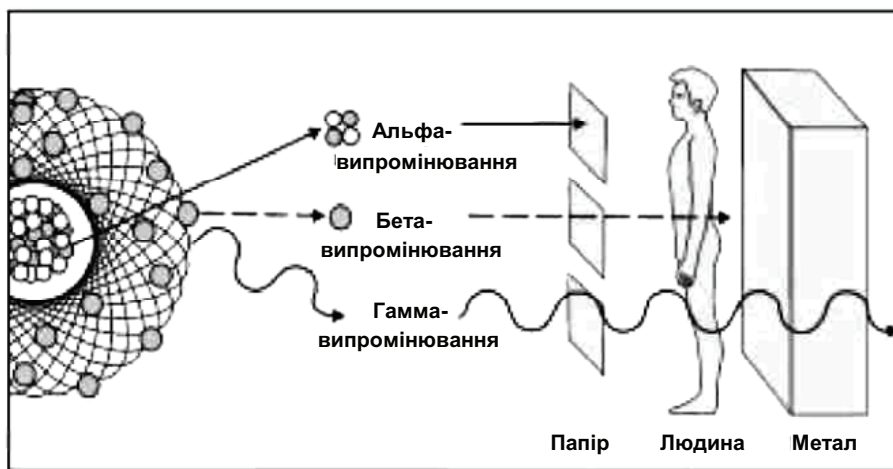


Рис. 1. Проникна здатність іонізуючого випромінювання

Також велику роль в опроміненні всього живого в екосистемі відіграє не лише кількість іонізуючого випромінювання, поглиненого тілом, а й якість цього випромінювання. Якісна характеристика випромінювання визначається показником лінійної щільності іонізуючого потоку. Вважається, що щільність бета-, гамма- і рентгенівського випромінювання є однаковою, умовно вона приймається за одиницю. Тоді показник щільності повільних нейтронів дорівнює 5, звичайних нейтронів – 10, а α -частинок та надшвидких нейтронів – 20. Перераховану в такий спосіб дозу опромінення називають *еквівалентною дозою*. Її у системі СІ вимірюють у *зівертах* (Зв) [7].

Саме тому необхідно систематично проводити спостереження за станом оточуючого природного середовища які повинні включати спостереження за джерелами впливу (в тому числі джерелами забруднення), за факторами впливу (забрудненнями, випромінюваннями і т.п.), за станом елементів біосфери, за зміною їх структурних і функціональних показників [8], тобто впровадження системи моніторингу навколишнього середовища.

Система моніторингу навколишнього середовища проводиться на трьох рівнях: локальному – на території окремих об'єктів (підприємство, місто, ділянка ландшафту); регіональному – у межах адміністративно-територіальних формувань, на територіях економічних і природних регіонів; національному – на рівні держави. Залежно від призначення здійснюються загальний, оперативний та фоновий (науковий) моніторинг навколишнього природного середовища [9].

Об'єктом моніторингових досліджень радіаційного стану, стала рекреаційна зона національного природного парку "Подільські Товтри", одного з найбільш унікальних

природних об'єктів, де збереглися рідкісні і реліктові рослини, а також геологічні пам'ятки, на території України.

Парк заснований в 1996 році. Розташований він у межах Городецького, Кам'янець-Подільського та Чемеровецького районів Хмельницької області на площі 261316,0 га (12,5% території області), призначений для збереження, відтворення та раціонального використання природних ландшафтів Поділля з типовими та унікальними природними та історико-культурними комплексами. Згідно з функціональним зонуванням, територія парку розподілена на заповідну зону, площею 1603,8 га, зону регульованої рекреації – 11452,2 га, зону стаціонарної рекреації – 173,5 га та господарську зону, площею 248086,5 га.

За площею національний парк "Подільські Товтри" є найбільшим у Європі. У світі деякими аналогами можуть служити схожі за зовнішніми геологічними ознаками скелясті гряди у Великій Британії та США. Ідеальним аналогом може бути Великий Бар'єрний риф, який знаходиться на північному та східному узбережжі Австралії [12].

Мета роботи полягала у проведенні моніторингових досліджень стану рекреаційної зони парку та аналізі отриманих результатів, адже на території НПП "Подільські Товтри" розташована 21 стаціонарна рекреаційна установа (санаторії, профілакторії, турбази, будинки відпочинку тощо), близько 160 промислових підприємств, колективні та індивідуальні сільські господарства.

Після Чорнобильської катастрофи Хмельниччина потрапила до західного сліду забруднення, частина території Чемеровецького і Кам'янець-Подільського районів національного природного парку "Подільські Товтри" було віднесено до четвертої зони забруднення.

В 1999р. статус "четвертої" зони забруднення було знято. Нагадаємо, що четверта зона є зоною посиленого радіоекологічного контролю – це територія з щільністю забруднення ґрунту понад доаварійний рівень ізотопами цезію від 1,0 до 5,0 Кі/км², або стронцію від 0,02 до 0,15 Кі/км², або плутонію від 0,005 до 0,01 Кі/км² за умови, що розрахункова ефективна еквівалентна доза опромінення людини з урахуванням коефіцієнтів міграції радіонуклідів у рослини та інших факторів перевищує 0,5 мЗв (0,05 бер) за рік понад дозу, яку вона одержувала у доаварійний період. Хмельниччина потрапила до територій західного сліду забруднення. Загальний радіаційний стан території області – у межах природних показників. Гамма-фон на постах спостереження областного центру з гідрометеорології становив 7-23 мкр/год. Вміст радіонуклідів в атмосферних випадіннях становив 4.2-5.5 Бк/м2, в аерозолях – 8-31х10-5 Бк/м3. Радіонукліди цезію – 137 у пробах води Дністра становили 0.007-0,05 Бк/л. [9].

Угіддя парку було забруднено ізотопами ¹³⁷Cs та ⁹⁰Sr, з періодом напіврозпаду до 30 років. Цезій (¹³⁷Cs) є хімічним аналогом калію, а стронцій (⁹⁰Sr) – кальцію і тому вони активно приймають участь в процесах біологічної міграції. Цезій накопичується у м'язах і швидко виводиться із організму, стронцій накопичується в кістковій тканині і повільно виводиться з організму.

Методологія проведення досліджень базувалася на вибірковому дозиметричному контролі окремих пунктів на території рекреаційної зони парку, проводився за

допомогою вимірів на них гамма-фону в повітрі на відстані 1 м від поверхні, і гамма-фону поверхні ґрунту, на відстані 3-5 см від нього. Дозиметричний контроль проводився за допомогою дозиметра-радіометра MKS-05 "TERRA" ECOTEST. Діапазони вимірів дозиметра-радіометра MKS-05 "TERRA" ECOTEST: (Вимір потужності еквівалентної дози (ПЕД), гамма- і рентгенівського випромінювань, вимір еквівалентної дози (ЕД) гамма- і рентгенівського випромінювань, вимір поверхневої щільності потоку бета-частинок, вимір часу накопичення еквівалентної дози).

Відбір ґрунтових зразків проводився із орного і підорного горизонтів з максимальним значенням гамма-випромінювання на території рекреаційної зони парку в місцях особого контролю. Вага проби ґрунту 2 кг. Рослинні зразки відбирались в фазу технічної стиглості з тих площ, що і ґрунтові зразки. Вага зразків складає: для трав, зернових і зернобобових культур – 2 кг, для картоплі і коренеплодів – 6 кг [11].

Масштаб топографічної основи для проведення гамма-зйомки становить 261316,0 га, тобто уся територія НПП зокрема територія рекреації. Для отримання достовірності даних, гама-зйомка проводилася на окремих локальних пунктах території сільських рад де визначалася середньо-статистичне значення ПЕД. В ході виконаних нами досліджень в період 2007-2009 р.р. ми отримали наступні данні (Табл. 1).

Таблиця 1. Рівень іонізуючого випромінювання (мкРн/год) на території НПП "Подільські Товтри" у розрізі окремих сільських рад (Городоцького, Чемеровецького та Кам'янець-Подільського районів)

№ п/п	Сільська рада	Рівень іонізуючого випромінювання (мкРн/год)		
		2007	2008	2009
	Городоцький район			
1	Іванковецька	16,6	16,5	16,4
2	Кам'янська	13,7	12,6	12,5
3	Великокарабчівська	11,5	10,5	10,7
4	Сатанівська	18,7	18,5	18,6
	Чемеровецький район			
1	Андріївська	10,5	10,4	10,6
2	Бережанська	8,5	9,0	8,8
3	Більська	7,4	7,4	7,3
4	Вишнівчицька	5,5	5,4	5,3
5	Велика-Зелена	27,8	27,7	27,6
6	Вільховецька	7,3	7,4	7,2
7	Голенищівська	8,0	7,7	7,6
8	Гуківська	8,4	8,5	8,4
9	Гусятинська	8,73	8,7	8,6
10	Жабинецька	7,04	7,1	7,0
11	Жердянська	8,2	8,2	8,1
12	Залучанська	6,7	6,6	6,5
13	Зарічанська	8,7	8,6	8,5
14	Іванковецька	9,8	10,0	9,7
15	Кормильчанська	8,2	8,2	8,12
16	Кочубіївська	8,7	8,6	8,5
17	Красноставська	8,0	7,5	7,8
18	Кугаєвецька	7,9	7,8	7,7
19	Кутковецька	8,02	8,0	7,9
20	Летавська	9,0	8,9	8,8
21	П'ятничанська	7,2	7,05	7,1
22	Почапинецька	12,9	12,7	12,8
23	Пукляківська	8,6	8,5	8,3
24	Свіршківська	7,8	7,6	7,7
25	Слобідко-Смотрицька	6,9	6,7	6,8
26	сmt. Закупне	7,7	7,6	7,5
27	сmt.Чемерівці	19,0	19,2	19,1
28	Сокиринська	5,9	5,8	5,7
29	Степанівська	8,7	8,6	8,4
30	Хропотівська	11,6	11,6	11,4
31	Циківська	15,5	15,45	15,4
32	Чорнянська	7,7	7,6	7,7

Закінчення табл. 1

№ п/п	Сільська рада	Рівень іонізуючого випромінювання (мкРн/год)		
		2007	2008	2009
33	Шидловецька	20,5	20,1	20,0
34	Юрковецька	13,9	13,7	13,8
35	Ямпільчецька	14,7	14,6	14,5
Кам'янець – Подільський район				
1	Абрикосівка	8,5	8,4	8,3
2	Великозаліська	7,5	7,4	7,3
3	Врублівецька	8,9	8,8	8,7
4	Голосківська	8,5	8,3	8,2
5	Гринчуцька	8,7	8,5	8,6
6	Грушківська	10,3	10,1	10,2
7	Гуменецька	15,6	15,4	15,5
8	Дерев'янська	10,7	10,5	10,6
9	Довжоцька	11,8	11,5	11,4
10	Думанівська	8,4	8,3	8,2
11	Жванецька	7,4	7,3	7,2
12	Завальська	8,5	8,3	8,4
13	Заліська – Друга	8,6	8,4	8,6
14	Зіньковецька	8,5	8,2	8,1
15	Кадіївецька	7,3	7,1	7,2
16	Калачківська	7,6	7,4	7,5
17	Кам'янська	8,6	8,5	8,3
18	Кидайгородська	7,3	7,4	7,2
19	Княжпільська	10,5	10,5	10,3
20	Колибаєвська	8,7	8,5	8,6
21	Колодіївська	9,1	9,2	9,1
22	Кульчіївська	8,5	8,4	8,3
23	Ластовецька	8,6	8,7	8,5
24	Нігинська	14,0	13,9	13,7
25	Орининська	8,4	8,3	8,4
26	Панівецька	13,0	12,9	12,8
27	Підпилип'янська	11,5	11,0	11,2
28	Подільська	7,4	7,4	7,4
29	Приворотська	9,4	9,5	9,3
30	Рихтівська	6,6	6,5	6,6
31	Рудська	7,5	7,3	7,2
32	Слобідсько-Кульчіївецька	10,3	10,2	10,3
33	Слобідсько-Рихтівська	9,4	9,5	9,1
34	Сокільська	8,6	8,6	8,5
35	Староушівська	8,1	8,2	8,1
36	Супруньковецька	7,5	7,4	7,3
37	Устянська	8,4	8,3	8,2
38	Ходорівська	7,1	7,1	7,0
39	Чорнокозинецька	28,2	28,5	28,4
40	Шустівська	29,5	29,4	29,3

За даними вимірювань, на більшості території рекреаційної зони парку зберігається допустима норма іонізуючого випромінювання – 0,05-0,15 мкЗ/год; більшу увагу привертає до себе територія, яка раніше була віднесена до 4 зони забруднення, зокрема Шустівської, Чорнокозинецької, Великої-Зеленої, Шидлівецької, Нововолодимирівської сільських рад яка безпосередньо попадає у точки накладання радіаційної і рекреаційної зон, де потужність еквівалентної дози дещо підвищена порівняно з іншими територіями парку – 0,23-0,29 мкЗ/год.

Для оцінки і контролю радіоактивного забруднення ґрунтів і продукції рослинництва Хмельницьким центром "ОБЛДЕРЖРОДЮЧІСТЬ" було закладено 67 контрольних ділянок в області, з них 10 ділянок знаходились на території НПП Подільські Товтри, розміром 100 x 100 м кожна. Всі вони входять в систему моніторингу довкілля області та України, розташовані рівномірно по всій території на типових для Хмельниччини ґрунтах і займають всі ґрунтово-кліматичні зони (Рис. 1).

На контрольних майданчиках відібрано 46 зразків ґрунту і 43 зразки рослин. Проведено 92 аналізи ґрунту спектрометричним методом на цезій-137 на спектрометрі АМА-ОЗФ, на стронцій-90 – на РІ-БГ. Також проведено 89 аналізів рослин на вміст стронцію-90 і цезію-137 на бета-спектрометрі СЕБ-01.

Було відібрано 12 зразків ґрунту з орного та підорного горизонтів і 11 зразків рослин і рослинної продукції. Проведено 24 аналізи ґрунту і 58 аналізів рослин на вміст стронцію-90 та цезію-137; 6 вимірів сумарної бета-активності орного шару ґрунту.

Для проведення аналізів і фізичних вимірювань використовувались наступні прилади: АМА-ОЗ-Ф, СЕГ-05, СЕБ-01, СРП-6801, КРК-1, РІ-БГ.

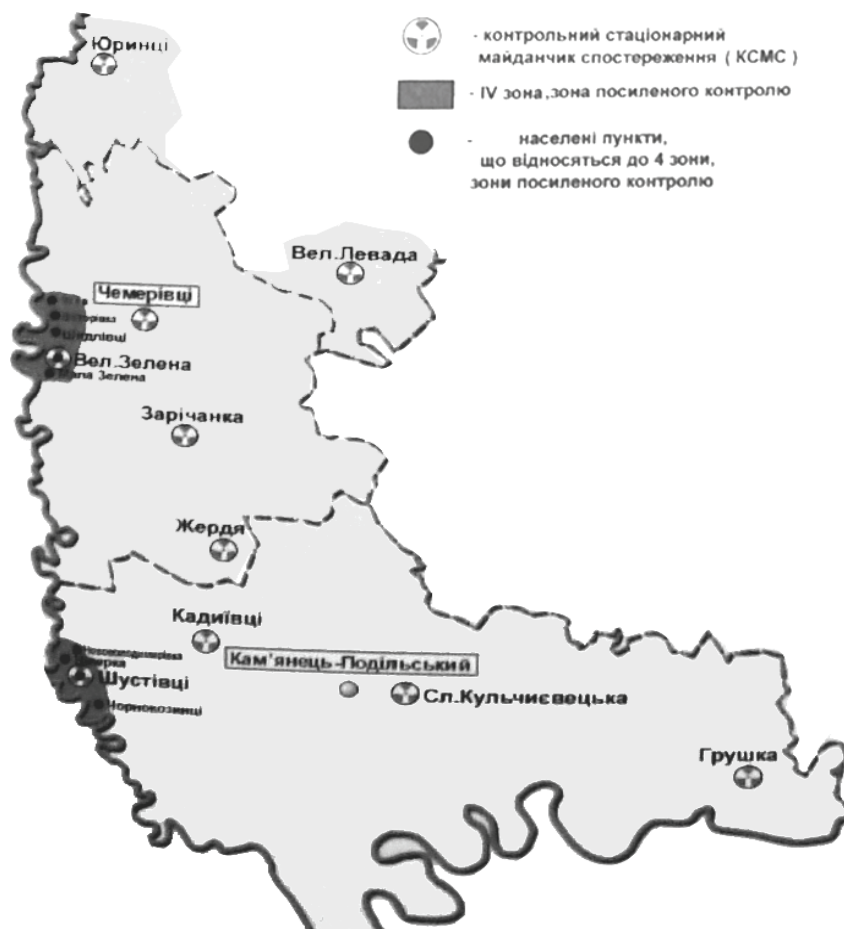


Рис. 1. Карта-схема розташування контрольних стаціонарних майданчиків спостереження за станом радіоактивного забруднення ґрунтів та рослин на території НПП "Подільські Товтри" Хмельницького відділення "ОБЛДЕРЖРОДУЧІСТЬ"

Дослідження показали низький рівень забруднення ґрунтів і сільськогосподарської продукції як по стронцію-90 так і по цезію-137: Радіоактивність ґрунтів складала:

$^{90}\text{Sr} = 1,0-3,2 \text{ Бк/кг};$

$^{137}\text{Cs} = 3,0-11,6 \text{ Бк/кг}.$

Радіоактивність рослин як в основній так і в побічній продукції не висока:

$^{90}\text{Sr} = 0,35-1,12 \text{ Бк/кг};$

$^{137}\text{Cs} = 0,32-3,0 \text{ Бк/кг}.$

Це говорить, про невисоку акумуляцію даних радіонуклідів в продукції рослинництва.

Щільність забруднення ґрунтів (Табл. 2) контрольних ділянок зони агрохімічної паспортизації стабільно низька і коливається в межах: $^{90}\text{Sr} = 90 - 0,01-0,02 \text{ Кі/км}^2$; $^{137}\text{Cs} = 0,02-0,09 \text{ Кі/км}^2$.

Потужність дози гамма-випромінювання (експозиційна доза) становила від 5-11 мкР/год на дерново-опідзолених супіщаних ґрунтах до 14 МкР/год на чорноземах, сірих та темно-сірих ґрунтах, що дорівнює природньому фону. В зоні посиленого контролю радіаційний гамма-фон підвищений і становив 22-23 МкР/год [2].

Щільність забруднення ґрунтів по НПП Подільські Товтри – Кі/км^2
за даними контрольних стаціонарних майданчиків лабораторії радіологічних досліджень
Хмельницького центру "ОБЛДЕРЖРОДУЧІСТЬ"

№	Райони, населені пункти	Тип ґрунту	Забрудник	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
1.	Кам'янець-Подільський р-н ксп "Мукшанський" с. Сл. Кульчинецька	Сірі опідзолені	Sr – 90	0,06	0,02	0,06	0,05	0,04	0,04	0,03	0,04	0,04
			Cs – 137	0,55	0,37	0,47	0,47	0,46	0,46	0,45	0,46	0,46
2.	ксп ім. "Суворова" с. Грушка	Сірі опідзолені	Sr – 90	0,03	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
			Cs – 137	0,12	0,11	0,12	0,11	0,09	0,09	0,10	0,09	0,09
3.	ксп "Перемога" с. Шустівці	Сірі опідзолені	Sr – 90	0,15	0,15	0,1	0,12	0,13	0,08	0,082	0,08	0,08
			Cs – 137	1,78	1,78	1,83	1,9	2,2	1,71	1,8	1,83	1,8
4.	Чемеровецький р-н ксп "Надія" с. Велика-Зелена	Чорн. опідзол.	Sr – 90	0,17	0,13	0,11	0,11	0,12	0,07	0,059	0,058	0,057
			Cs – 137	2,3	2,1	2,14	2,0	1,9	1,8	1,7	1,8	1,7
5.	ксп "Україна" снт Чемерівці	Чорн. опідзол.	Sr – 90	0,01	0,02	0,02	0,04	0,04	0,04	0,03	0,04	0,04
			Cs – 137	0,19	0,18	0,2	0,15	0,15	0,17	0,15	0,16	0,15
6.	ксп "Жердянське" с. Жердя	Чорн. гл.	Sr – 90	0,02	0,01	0,03	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02
			Cs – 137	0,14	0,09	0,08	0,07	0,07	0,08	0,07	0,075	0,07

За даними досліджень встановлено низький рівень забруднення ґрунтів та рослин, а також сільськогосподарської продукції, як по стронцію-90 так і по цезію-137: по ^{90}Sr = 1,0-3,2 Бк/кг; ^{137}Cs = 3,0-11,6 Бк/кг. Щільність забруднення ґрунтів (сірі опідзолені, чорн. опідзол, чорн. глинясті) становить: по ^{137}Cs = 0,002 – 1,83 – Кі/км² (максимальна щільність забруднення припадає на територію с. Шустівці та с. Велика-Зелена); ^{90}Sr = 0,1 – 0,15 – Кі/км² (максимальна щільність забруднення припадає на територію с. Велика-Зелена, смт Чемерівці).

Висновки.

1. На більшості території, зокрема і рекреаційної зони, зберігається допустима норма ПЕД – 0,05-0,15 мкЗ/год; більшу увагу привертає до себе територія, яка раніше була віднесена до 4 зони забруднення, зокрема Шустівської, Чернокозинської, Великої-Зеленої, Шидлівської, Нововолодимирівської сільських рад яка безпосередньо попадає у точки накладання радіаційної і рекреаційної зон, де потужність еквівалентної дози дещо підвищена порівняно з іншими територіями парку – 0,23-0,29 мкЗ/год.

2. Встановлено низький рівень забруднення ґрунтів та рослин, а також сільськогосподарської продукції, як по стронцію-90 так і по цезію-137: по ^{90}Sr = 1,0-3,2 Бк/кг; ^{137}Cs = 3,0-11,6 Бк/кг. Щільність забруднення ґрунтів (сірі опідзолені, чорн. опідзол, чорн. глинясті) становить: по ^{137}Cs = 0,002 – 1,83 – Кі/км² (максимальна щільність забруднення припадає на територію с. Шустівці та с. Велика-Зелена); ^{90}Sr = 0,1 – 0,15 – Кі/км² (максимальна щільність забруднення припадає на територію с. Велика-Зелена, смт Чемерівці).

3. Враховуючи наявність на території Шустівської, Чернокозинської, Великої-Зеленої, Шидлівської, Нововолодимирівської сільських рад які безпосередньо

падають у точки накладання радіаційної і рекреаційної зон, недоцільно використовувати під забудови мережі установ лікування та відпочинку згідно проекту організації використання території національного природного парку "Подільські Товтри".

4. Дослідження території рекреаційної зони національного природного парку "Подільські Товтри", яка попала в зону особого контролю, де накладаються зони радіаційного забруднення та рекреації, слід і надалі продовжувати для детальнішої оцінки стану екосистем та розробки рекомендацій щодо подальшого використання території рекреаційної зони національного природного парку "Подільські Товтри", що при нерозумному використанні може призвести до значного порушення екосистем.

1. Гандзюра В.П., Грубіянюк В.В. Концепція шкодочинності в екології. – Київ-Тернопіль: Вид-во ТНПУ ім. В. Гнатюка, 2008. – 144 с. 2. Звіт Хмельницького центру "ОБЛДЕРЖРОДЮЧІСТЬ" про проведення науково-дослідних та проектно-технологічних робіт у 2006 р. – Кам'янець-Подільський 2007. 3. Клименко М.О., Прищеп А.М., Вознюк Н.М. Моніторинг довкілля. Київ: Видавничий центр "Академія". – 2006. – С. 265-270. 4. Москалев Ю.И. Отдаленные последствия воздействия ионизирующих излучений. – М.: Медицина, 1991. – 464с. 5. Кузин А.М. Природный радиоактивный фон и его значение для биосферы Земли. – М.: Наука, 1991. – 116 с. 6. Передерий В.А., Ткач Г.М. Источники и биологические эффекты ионизирующего излучения. 1988. – 254 с. 7. Корзун В.Н., Недоуров С.И. Радиация – захист населення. – К: Наукова думка, 1995. – 112 с. 8. Охрана окружающей природной среды / Под ред. Г.В. Дуганова. – К.: В. ш., 1988. – 305 с. 9. Рутинський М.Й. Метризація екологічних станів ландшафтних систем / За ред. проф.С.І.Кукурудзи. – Львів: Фенікс, 2002. – 244 с. 10. Яблоков А.В. Миф о безопасности малых доз радиации: Атомная мифология. – М.: Центр экологической политики России, ООО "Проект-Ф", 2002. – 145 с. 11. Методические указания по определению содержания стронция-90 и цезия 137 в почвах и растениях. М. – 1986 г. 12. <http://www.kp.km.ua/~tovtry/ua/index.html> – офіційний сайт Національного природного парку "Подільські Товтри".

Надійшла до редколегії 31.05.10

Наукове видання



ВІСНИК

КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ПРОБЛЕМИ РЕГУЛЯЦІЇ ФІЗІОЛОГІЧНИХ ФУНКЦІЙ

Випуск 13

Друкується за авторською редакцією

Оригінал-макет виготовлено Видавничо-поліграфічним центром "Київський університет"

Автори опублікованих матеріалів несуть повну відповідальність за підбір, точність наведених фактів, цитат, економіко-статистичних даних, власних імен та інших відомостей. Редколегія залишає за собою право скорочувати та редагувати подані матеріали. Рукописи та дискети не повертаються.



Підписано до друку 02.09.10. Формат 60x84^{1/8}. Вид. № 4. Гарнітура Arial. Папір офсетний.
Друк офсетний. Наклад 300. Ум. друк. арк. 7,2. Обл.-вид. арк. 10,0. Зам. № 210-5319.

Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет"
01601, Київ, б-р Т. Шевченка, 14, кімн. 43
☎ (38044) 239 32 22; (38044) 239 31 72; (38044) 239 31 58; факс (38044) 239 31 28
e-mail: vpc@univ.kiev.ua