ВІСНИК
КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ISSN 1728-2624

ПРОБЛЕМИ РЕГУЛЯЦІЇ ФІЗІОЛОГІЧНИХ ФУНКЦІЙ 14/2011

Засновано 1958 року

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.

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 КВ № 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, б-р Т.Шевченка, 14, кімн. 43 ☎ (38044) 239 31 72, 239 32 22; факс 239 31 28

ЗМІСТ

CONTENTS

УДК 612.35+591.132.5

Л. Карбовська, канд. біол. наук,
З. Горенко, канд. біол. наук,
В. Бабан, інж., С. Весельський, д-р біол. наук

ВМІСТ ЛІПІДНИХ КОМПОНЕНТІВ В ЖОВЧІ ЩУРІВ ПІД ВПЛИВОМ ОКСИТОЦИНУ

В гострих спробах на щурах з канюльованою жовчною протокою вивчали зміни рівня холерезу і ліпідного складу жовчі. Встановлено, що екзогенний окситоцин в дозах 5,0 та 10,0 Од/кг маси тіла тварини практично не змінює як об'єм секретованої жовчі, так і її ліпідний склад, збільшуючи незначною мірою виділення з секретом ефірів холестеролу та зменшуючи вміст вільних жирних кислот і тригліцеридів в жовчі.

We studied changes of the level of choleresis and chemical composition of the bile in acute experiments on the rats with biliary duct cannulated. We have shown that exogenous Oxytocin at the doses 5.0 and 10.0 unit/kg body weight don't changes volume of bile secretion and lipid composition of the bile. Oxytocin insignificantly increases secretion of cholesterol esters and reduces free fatty acids and triglycerides content in the bile.

Вступ. Окситоцин (ОТ) – перший нейрогіпофізарний гормон, що був синтезований в біологічно активній формі, структурну формулу якого вдалось повністю визначити. ОТ разом з іншим гормоном нейрогіпофізу – вазопресином, був виявлений у 1895 році Олівером та Шафером, які продемонстрували його вплив на кров'яний тиск [1, 2]. Починаючи з 1950-х років кількість досліджень, що проводились з метою вивчення впливу ОТ на фізіологічні функції організму значно збільшилась. Поява специфічних агоністів та антагоністів ОТ рецепторів дозволила пояснити особливу роль ОТ у регуляції фізіологічних процесів організму. За сучасними уявленнями великі нейросекреторні клітини паравентрикулярних та супраоптичних ядер синтезують ОТ у вигляді великої молекули препро-окситоцину нейрофізину I, в подальшому комплекс розщеплюється з утворенням ОТ, котрий секретується в кров задньою часткою гіпофізу. Дія ОТ реалізується шляхом взаємодії з окситоциновим рецептором (ОТР). ОТР відносяться до групи окситоцин-вазопресинових рецепторів, що включає ОТР, вазопресинові рецептори V1-α, V1-β та V2, що відносяться до надродини рецепторів, пов'язаних з G-білком [3]. Система ОТ-ОТР, крім репродукції, бере участь в регуляції розслаблення серця і судин, поведінкових функцій, зумовлених дією нервової системи, а саме статева поведінка, поведінка в суспільстві, формування материнських почуттів, пам'яті, прийом рідини та їжі [4, 5].

Значний інтерес викликають дослідження ролі ОТ в регуляції функцій печінки. Впродовж останніх років були отримані дані про вплив ОТ на енергетичні процеси в тканині печінки, кровопостачання залози. Разом з тим, в літературі практично відсутні експериментальні роботи, присвячені дослідженню жовчоутворювальної функції печінки під впливом ОТ. Поодинокі суперечливі повідомлення з цього приводу не дозволяють скласти певну думку про значення ОТ в нейро-гуморальних механізмах регуляції рівня холерезу і якісного складу жовчі.

Об'єкт та методи досліджень. Гострі експерименти проводили під тіопенталовим наркозом (5 мг/100 г маси тіла тварини, внутрішньоочеревинно) на білих щурах-самцях масою 180-250 г з канюльованою загальною жовчною протокою. Перед дослідом тварини голодували впродовж 18 годин з вільним доступом до води. Впродовж 3 годин досліду збирали 6 півгодинних проб жовчі, враховуючи її об'єм в мікролітрах. У кожній пробі отриманої жовчі тонкошаровою хроматографією визначали кількісний і якісний вміст ліпідної фракції секрету (фосфоліпідів – ФЛ, холестерину – ХС, його ефірів – ЕХС, вільних жирних кислот – ВЖрК, тригліцеридів – ТГ) [6]. Тваринам дослідної групи вводили окситоцин ("Sigma", США) внутрішньопортально в дозах 5 і 10 Од/кг маси тіла тварини, розчинений у фізіологічному розчині (з розрахунку об'єму 0,1 мл/100 г маси тіла тварини). Контролем для цих досліджень слугували спроби із внутрішньопортальним введенням тваринам такого ж об'єму фізіологічного розчину.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою пакету прикладних програм Statistika 6.0, використовуючи t-критерій Стьюдента, оскільки дані мали нормальний розподіл при перевірці їх за тестом Шапіро-Уілка. Статистично значущими вважались відмінності між контролем та дослідом при $p<0,05$.

Результати та їх обговорення. Як відомо, печінка є важливим центром біохімічної трансформації речовин, які потрапляють в кров з травного тракту та іншими шляхами, тобто вона забезпечує необхідний для організму людини і тварин рівень білкового, вуглеводного, ліпідного, пігментного та інших видів метаболізму. Слід відмітити, що печінка відіграє важливу роль в обміні ліпідів, зокрема в ній розщеплюється близько 60% усіх жирних кислот організму, синтезуються і трансформуються фосфоліпіди, утворюються з вуглеводів тригліцериди.

Печінка є основним місцем синтезу і етерифікації холестеролу в організмі. Частина синтезованого в печінці холестеролу виділяється печінкою у складі жовчі, решта надходить в кров через лімфу [7], а також трансформується в жовчні кислоти. Холестерол мало розчинний у воді, його розчинність залежить від концентрації ліпідів та співвідношення молярних концентрацій жовчних кислот (головним чином ХК, ДХК та ХДХК) і фосфоліпідів (головним чином лецитину). Якщо концентрація цих компонентів в жовчі нижча за критичний рівень, або вміст холестеролу зростає, то створюються сприятливі умови для кристалізації і випадання його в осад, що призводить до утворенням конкрементів. Наші досліди показали, що екзогенний окситоцин, застосований у дозах 5 і 10 Од/кг маси тіла тварини незначно змінював вміст ліпідів в жовчі щурів. При цьому аналіз змін солюбілізуючих властивостей жовчі за співвідношенням вмісту в ній сумарних жовчних кислот та холестеролу (холато/холестероловий коефіцієнт) показав, що окситоцин у застосованих нами дозах практично не впливає на цей показник [табл.1].

Таблиця **1. Зміни холато/холестеролового коефіцієнту під впливом окситоцину (M±m; n=24)**

	Час, хв	Контроль	Окситоцин 5 Од/кг	Окситоцин 10 Од/кг
Сумарні жовчні кислоти, мг%	30	447,88 ± 6,93	443,55 ± 7,39	457,98 ± 4,74
	60	439,45 ± 6,90	449,33 ± 7,77	462,30 ± 4,74*
	90	425,30 ± 5,46	431,93 ± 8,62	455,85 ± 4,90**
	120	410,55 ± 6,97	417,13 ± 7,95	438,85 ± 2,54**
	150	396,45 ± 6,73	405,05 ± 9,45	421,48 ± 2,86*
	180	383,10 ± 6,46	401,68 ± 6,18	413,30 ± 4,70**
Вільний холестерол, мг%	30	28,10 ± 1,52	27,89 ± 1,29	27,43 ± 1,70
	60	27,83 ± 1,16	30,18 ± 1,63	30,13 ± 1,70
	90	26,40 ± 1,10	29,03 ± 1,34	28,08 ± 2,04
	120	25,30 ± 1,11	27,43 ± 1,29	29,25 ± 2,19
	150	24,28 ± 1,13	26,25 ± 0,86	26,15 ± 2,02
	180	23,50 ± 0,69	26,25 ± 1,02	25,68 ± 1,85
Холато/холестероловий коефіцієнт	30	15,94	15,90	16,70
	60	15,79	14,89	15,34
	90	16,11	14,88	16,23
	120	16,23	15,21	15,00
	150	16,33	15,43	16,11
	180	16,30	15,30	16,09

Примітка: * – p<0,05; ** – p<0,01 щодо контролю

Відомо, що в організмі людини і тварин холестерол присутній в усіх клітинах та тканинах. Він відіграє важливу роль у забезпеченні процесів життєдіяльності і є важливим компонентом різних біохімічних реакцій. Так, наприклад, за участю холестеролу відбувається утворення вітаміну D, стероїдних гормонів кори наднирників, жіночих та чоловічих статевих гормонів, здійснюється транспорт речовин через мембрану клітин, підтримується рівень води в клітинах. До того ж холестерол – це головний попередник при синтезі жовчних кислот в гепатоцитах. Тому, становило інтерес дослідити вплив окситоцину на секрецію холестеролу та його ефірів з жовчю.

При порівнянні вмісту ХС та ЕХС в контрольних та дослідних пробах жовчі нами показано, що окситоцин практично не змінюючи біосинтезу холестеролу, посилював його етерифікацію в клітинах печінки щурів. Оскільки за коефіцієнтом етерифікації можна судити про рівень утворення вільного холестеролу та його ефірів, було доцільно дослідити зміни цього показника під впливом застосованих нами доз окситоцину [Табл.2].

Таблиця **2. Вплив окситоцину на коефіцієнт етерифікації холестеролу у жовчі щурів (M±m; n=24)**

	Час, хв	Контроль	Окситоцин 5 Од/кг	Окситоцин 10 Од/кг
Вільний холестерол, мг%	30	28,10 ± 1,51	27,87 ± 1,29	27,43 ± 1,70
	60	27,82 ± 1,16	30,17 ± 1,62	30,13 ± 1,70
	90	26,40 ± 1,10	29,02 ± 1,33	28,01 ± 2,04
	120	25,30 ± 1,10	27,42 ± 1,29	29,25 ± 2,19
	150	24,70 ± 1,10	26,25 ± 0,85	26,15 ± 2,02
	180	24,27 ± 1,12	26,25 ± 1,02	25,68 ± 1,85
Ефіри холестеролу, мг%	30	2,50 ± 0,29	2,60 ± 0,26	2,43 ± 0,35
	60	2,57 ± 0,21	2,82 ± 0,28	2,68 ± 0,30
	90	2,57 ± 0,26	2,70 ± 0,26	2,93 ± 0,32
	120	2,27 ± 0,23	2,60 ± 0,31	2,73 ± 0,26
	150	2,02 ± 0,21	2,40 ± 0,31	2,53 ± 0,26
	180	1,90 ± 0,27	2,37 ± 0,26	2,48 ± 0,23
Коефіцієнт етерифікації	30	11,24	10,72	11,29
	60	10,82	10,70	11,24
	90	10,27	10,75	9,56
	120	11,14	10,55	10,71
	150	12,01	10,93	10,34
	180	12,37	11,08	10,35

З'ясувалось, що коефіцієнт етерифікації після застосування окситоцину, як і у контрольних дослідах, зменшувався впродовж всього періоду спостереження. Однак, після гормонального навантаження організму щурів значення даного показника були меншими від контрольних. Це вказує на те, що окситоцин змінює співвідношення вільного холестеролу та його ефірів на користь останніх, шляхом активації тих ферментних систем, котрі відповідають за етерифікацію холестеролу в клітинах печінки.

Результати наших дослідів показали, що концентрація фосфоліпідів під впливом окситоцину в дозі 5 Од/кг маси тіла тварини впродовж досліду різко зростає на другій півгодинній пробі, але вже до кінця експерименту цей показник зменшується, хоча й лишається вищим у порівнянні з контрольними значеннями. Так, у першому півгодинному відрізку часу концентрація таких лишилась незміненою щодо контролю; в другій пробі – зросла на 8,3%; в третій – на 5,3%; в четвертій – на 12,3%; в п'ятій на 8,3% і в шостій на – 7,7%. Проте ці зміни виявились статистично невірогідними (p<0,05) щодо відповідних показників у контролі. Окситоцин в дозах 5 та 10 Од/кг маси тіла тварини призводив до зменшення вмісту вільних жирних кислот в жовчі, хоча статистично значущими такі зміни не були. Значення концентрацій та дебітів тригліцеридів під впливом ОТ у зазначених дозах впродовж досліду також зменшувались, однак статистично вірогідних змін щодо показників у контролі при цьому не виявилось.

Отже, результати наших досліджень свідчать, що нейрогіпофізарний гормон окситоцин, введений щурам внутрішньопортально в дозах 5 та 10 Од/кг маси тіла тварини практично не впливає на рівень жовчоутворення і ліпідний склад жовчі, справляючи незначний стимулюючий вплив на виділення з секретом ефірів холестеролу та зменшуючи вміст вільних жирних кислот і тригліцеридів.

1. Kiss A., Mikkelsen J.D. Oxytocin – anatomy and functional assigments:a minireview // Endocrine regulation. – 2005. – Vol.39 (3). – P.97-105. 2.Brownstein M.J. Biosynthesis of vasopressin and oxytocin // Annual Review of Physiology. – 1983. – Vol.45 (10). – P.129-135. 3. Gimpl G., Fahrenholz F. et al. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation // Physiol.Rev. – 2001. – Vol.81, №2. – P.629–683.4.Bussolati G., Cassoni P. Editorial: the oxytocin/oxytocin receptor system-expect the unexpected // Endocrinology. – 2001. – Vol.142, №4. – P.1377–1379.5.Shojo H., Kaneko Y. et al. Characterization and expression of oxytocin and the oxytocin receptor // Mol.Genet.Metab. – 2000. – Vol.71, №4. – P.552–558.6.Патент 99031324 Україна, МБИ А61 В5/14. Спосіб підготовки проб біорідин для визначення вмісту речовин ліпідної природи: Пат. 99031324 Україна, МБИ А61 В5/14 / С.П. Весельський, П.С. Лященко, С.І. Костенко, З.А. Горенко, Л.Ф. Куровська. – №33564А; Заявл. 05.10.1999; Опубл. 15.02.2001; Бюл. №1.7.Ганиткевич Я.В., Карбач Я.И. Исследование желчи. Биохимические и биофизические методы. – К.: Вища школа, 1985. – 136 с.

Надійшла до редколегії 05.11.10

УДК 577.112.384+612.817+612.821.8+612.323+612.811.3

Т. Фалалєєва, канд. біол. наук

ВПЛИВ 10-, 20- ТА 30-ТИ ДЕННОГО ВВЕДЕННЯ МОНОНАТРІЙ ГЛУТАМАТУ НА ШЛУНКОВУ СЕКРЕЦІЮ СОЛЯНОЇ КИСЛОТИ У ЩУРІВ

Вивчали вплив тривалого введення мононатрій глутамату на базальну шлункову секрецію кислоти у щурів. Встановлено, що 10 , 20-, 30-ти денне введення мононатрій глутамату в дозах 15 і 30 мг/кг (відповідає 1 і 2 г / середньостатистичну людину) призводить до збільшення секреції соляної кислоти.

Зроблено висновок, що стимулюючий вплив мононатрій глутамату на базальну секрецію соляної кислоти в шлунку може бути причиною патогенезу ряду кислотозалежних захворювань. По-друге, максимальні добові дози мононатрій глутамату, як і інших харчових добавок, мають бути переглянуті з урахуванням їх впливу на секреторний потенціал шлунку.

The influence of prolonged administration of monosodium glutamate (MSG) on basal gastric acid secretion in rats. Found that 10 -, 20 -, 30-days feeding by MSG in doses 15 to 30 mg/kg (equivalent to 1 and 2 g / average person) leads increased secretion of hydrochloric acid.

It is concluded that the stimulating effect of MSG on the basal secretion of hydrochloric acid in the stomach may be involved in the pathogenesis of a number of acid-dependent diseases. Secondly, the maximum dose of MSG should be reconsidered taking into account its influence on the secretory capacity of the stomach.

Вступ. Серед харчових добавок особливе місце належить посилювачам смаку (аромату), які використовуються для посилення і/або модифікації натурального смаку і/або аромату харчових продуктів. В чистому вигляді ці речовини не мають ні смаку, ні запаху, але посилюють смак любої страви. В наш час у всьому світі самий відомий посилювач смаку, аромату та замінник солі – мононатрію глутамат Е 621 – натрієва сіль глутамінової амінокислоти (синоніми: глутамат натрію, глютамінат натрію, глутамінат натрію; англ. Monosodium glutamate, скорочено MSG).

В Україні мононатрій глутамат (Е621), так само як і глутамат калію (Е622), кальцію (Е623), амонію (Е624), магнію (Е625), а також сама глутамінова кислота (Е620) дозволені до застосування – до 10 грамів речовини на кілограм продукту, а в приправах і пряноща допустима концентрація ще вище. Проте, до роздрібного продажу не допускаються глутамат магнію та амонію. Все це регулюється Санітарними нормами і правилами. Більше того, і сама кислота, і її солі визнані безпечними у всьому світі, в тому числі і Всесвітньою організацією охорони здоров'я [4].

У зв'язку з тим, що тяжко знайти консерви, напівфабрикати або готові продукти виготовлені промисловим шляхом, в яких би не було мононатрій глутамату. У ресторанах швидкого харчування без посилювача смаку не обходиться не один рецепт. При цьому допустимі норми можуть бути значно перевищені, що призводить до захворювань травного тракту. Лікарі такі захворювання об'єднали терміном "синдром китайського ресторану", симптомами якого є різкий біль у шлунку та грудях, почервоніння обличчя, підвищена температура тіла [4, 9, 10]. Механізм виникнення даних хвороб недостатньо досліджений, що потребує детального дослідження цього питання.

Так як мононатрій глутамат використовується в більшості сучасних харчових технологій як харчова добавка і кількість його вживання практично неконтрольований процес, це обумовлює більш детальне вивчення впливу даної харчової добавки на організм людини, перш за все на секреторну функцію шлунка, тому що шлунок є найбільш уразливим відділом травного тракту, в який попадає їжа багата на глутамат натрію та глутамінову кислоту.

Отже, метою даної роботи було вивчення впливу тривалого введення мононатрій глутамату на шлункову секрецію соляної кислоти у щурів.

Матеріали та методи досліджень. Експерименти виконано на щурах з дотриманням рекомендацій Європейською конвенції та національного законодавства про проведення медико-біологічних досліджень. Тварин утримували в умовах акредитованого віварію згідно зі "Стандартними правилами по упорядкуванню, устаткуванню та утриманню експериментальних біологічних клінік (віваріїв)". Прилади, що використовувалися для наукових досліджень, підлягали метрологічному контролю.

Дослідження проведені на 63 білих нелінійних щурах – самцях масою 145-180 г, які були розділені на 9 груп по 7 тварин у кожній. Вивчали вплив 10-ти, 20-ти та 30-ти денного введення мононатрій глутамату в дозах 15 та 30 мг/кг (1 раз на добу, перорально), що відповідало 1 та 2 г / середньостатистичну людину. Вибір даних доз обумовлений тим, що за даними літератури 1 г / середньостатистичну людину глутамату натрію не справляє негативного впливу на організм людини [5], тоді як 3 г / середньостатистичну людину може бути небезпечними для здоров'я [10]. Мононатрій глутамат розчиняли у 0,5 мл питної водопровідної дехлорованої води кімнатної температури. Щурам контрольних груп вводили упродовж 10-, 20-, 30-ти днів плацебо, а саме

0,5 мл питної водопровідної дехлорованої води кімнатної температури.

Схема експериментів була наступною:

1 група – щури, яким протягом 10 днів вводили питну водопровідну дехлоровану воду, слугували контролем для груп щурів, яким глутамат натрію вводили упродовж 10 днів;

2 група – щури, яким протягом 20 днів вводили питну водопровідну дехлоровану воду, слугували контролем для груп щурів, яким глутамат натрію вводили упродовж 20 днів;

3 група – щури, яким протягом 30 днів вводили питну водопровідну дехлоровану воду, слугували контролем для груп щурів, яким глутамат натрію вводили упродовж 30 днів;

4 група – щури, яким протягом 10 днів вводили мононатрій глутамат в дозі 15 мг/кг;

5 група – щури, яким протягом 20 днів вводили мононатрій глутамат в дозі 15 мг/кг;

6 група – щури, яким протягом 30 днів вводили мононатрій глутамат в дозі 15 мг/кг;

7 група – щури, яким протягом 10 днів вводили мононатрій глутамат в дозі 30 мг/кг;

8 група – щури, яким протягом 20 днів вводили мононатрій глутамат в дозі 30 мг/кг;

9 група – щури, яким протягом 30 днів вводили мононатрій глутамат в дозі 30 мг/кг.

Через добу після останнього введення щурам води або глутамату натрію в умовах гострого експерименту досліджували базальну шлункову секрецію соляної кислоти методом перфузії ізольованого шлунку за Гхошем та Шільдом [6]. Щурів наркотизували уретаном (Sigma Chemichal Co, St. Louis, USA) в дозі 1,15 г/кг маси тіла (внутрішньочеревинно (в/о)). У зібраних 10-ти хвилинних пробах електротитрометрично визначали загальну кислотність перфузату за допомогою іономіра ЭВ-74 з використанням 0,01 N розчину гідроокису натрію (NaOH). Кількість NaOH, що йшла на титрування перфузату в 10-ти хвилинній пробі, дорівнювала дебіту соляної кислоти, що виділялася в шлунку за даний період часу. Після цього обчислювали дебіт кислоти, що виділився впродовж досліду (120 хвилин) у мкмоль. Після завершення дослідів щурів умертвляли за допомогою летальної дози уретану (3 г/кг, в/о).

У зв'язку з невеликим об'ємом вибірки, для перевірки розподілу на нормальність було застосовано W тест Шапіро-Вілка. Імовірність похибки першого роду α > 0,05. Оскільки наші дані виявилися нормально розподілені ми розраховували середнє значення (M), похибку середнього (m). Порівняння вибірок проводилося за допомогою t-критерію Стьюдента. Для наших даних ми приймали рівень значущості p<0,05.

Результати та їх обговорення. В результаті проведених досліджень було встановлено, що між показниками дебіту кислоти у щурів 1, 2, 3 груп, яким перорально упродовж 10-, 20-, 30-ти днів вводили 0,5 мл води статистично значущих змін не було. Тому результати досліджень, отримані на щурах 3-х груп, були об'єднані в одну контрольну групу. Дебіт соляної кислоти базальної секреції у щурів контрольної групи складав 16,1±3,1 мкмоль/120 хв (n=21).

10-ти денне введення мононатрій глутамату в дозі 15 мг/кг не впливало на базальну шлункову секрецію кислоти у щурів. Подовження тривалості його введення до 20-ти днів збільшувало дебіт соляної кислоти до 31,9±5,9 мкмоль/120 хв (n=7), що було на 98% (p<0,05) більше відповідного показника в контролі. Після 30-ти денного введення мононатрій глутамату в дозі 15 мг/кг дебіт кислоти становив 30,5±2,2 мкмоль/120 хв (n=7), що на 89% (p<0,05) перевищувало контрольні показники (рис. 1). Таким чином, стимулюючий ефект мононатрій глутамату на секреторну спроможність на 20 і 30 дні був приблизно однаковим.

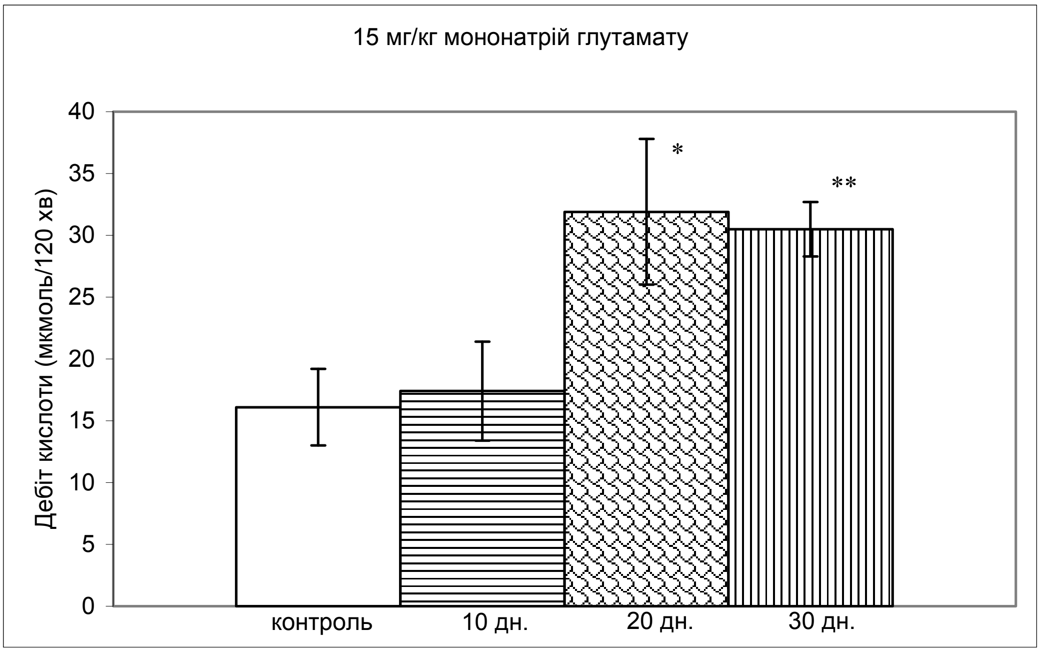


Рис. 1. Вплив тривалого введення мононатрій глутамату в дозі 15 мг/кг (1 раз на добу, перорально) на базальну шлункову секрецію у щурів (M±m): * – p<0,05, ** – p<0,01 у порівнянні з контролем

Збільшення щоденної дози харчової добавки вдвічі (30 мг/кг) справляло значно сильніший вплив на секрецію соляної кислоти в шлунку щурів, ніж доза 15 мг/кг. Так, вже на 10-тий день після введення мононатрій глутамату в дозі 30 мг/кг спостерігалось збільшення секреції кислоти шлунком щурів до 29,1± 10,8 мкмоль/120 хв (n=7), а саме на 81% (p<0,05). При 20-ти денному введенні харчової добавки дебіт базальної кислоти в шлунку зростав до 72,8±11,9 мкмоль/120 хв (n=7), або на 352% (p<0,01). Щоденне введення мононатрій глутамату впродовж 30-ти днів в дозі 30 мг/кг приводило до збільшення дебіту кислоти до 57,0±7,6 мкмоль/120 хв (n=7), або на 254% (p<0,05) відповідно з контролем (рис. 2). Між показниками дебіту базальної шлункової секреції кислоти після 20-ти та 30-ти денного введення мононатрій глутамату в дозі 30 мг/кг статистично значущої різниці не було.

Отже, довготривале введення мононатрій глутамату призводить до суттєвого збільшення базальної секреції соляної кислоти в шлунку щурів, а гіперацидність шлункового соку є фактором ризику розвитку кислотозалежних захворювань шлунково-кишкового тракту, наприклад виразкової хвороби шлунка та дванадцятипалої кишки [1].

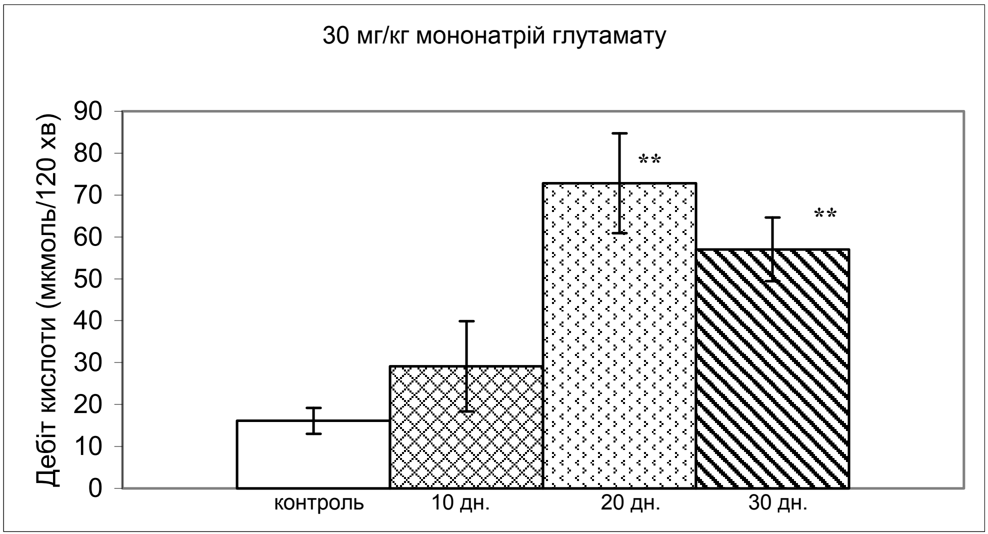


Рис. 2. Вплив тривалого введення мононатрій глутамату в дозі 30 мг/кг (1 раз на добу, перорально) на базальну шлункову секрецію у щурів (M+m): ** – p<0,01 у порівнянні з контролем

Таким чином, одержані дані ставлять під сумнів загальноприйняте твердження, що використання харчової добавки глутамату натрію в розумних межах (1 г на добу / середньостатистичну людину) є безпечним [4, 7, 8]. Нами показано, що щоденне введення мононатрій глутамату щурам в дозі 15 мг/кг (1 г / середньостатистичну людину) впродовж 20-ти та 30-ти днів приводить до збільшення секреції соляної кислоти (рис.1) майже в два рази.

Ствердження, що прийом глутамату натрію у кількості 3 грами на день може бути небезпечним для здоров'я людини [5, 10] не підтверджується нашими експериментальними дослідженнями, що свідчать що й менша доза препарату (2 г на добу / середньостатистичну людину) є також небезпечною для функціонування секреторного апарату шлунка. Так, введення щурам в дозі 30 мг/кг мононатрій глутамату (2 г на добу / середньостатистичну людину) впродовж 20-ти та 30-ти днів приводило до надмірного збільшення секреції соляної кислоти в середньому в п'ять разів (рис. 2).

Таким чином, основний збуджуючий медіатор центральної нервової системи глутамат натрію, який за нормальних умов залучений у регуляцію секреторної функції шлунка [2] і не призводить до порушення секреторного апарату, при тривалому екзогенному введенні викликає гіперсекрецію соляної кислоти.

Для інтерпретації одержаних результатів на людину, слід взяти до уваги той факт, що вік щурів набагато менший ніж у людини та метаболічні процеси проходять набагато швидше. Більшість дослідників вважають, що 10 днів життя щурів, відповідають 3 місяцям людини, 20 днів та 30 днів відповідно 6 і 9 місяцям [8]. Тобто, щоб у людини спостерігалися такі зміни секреторного апарату як у щурів, то людині необхідно щоденно споживати харчову добавку мононатрій глутамат 6-9 місяців.

Отже, встановлена нами властивість мононатрій глутамату, при системному споживанні, патологічно надмірно збільшувати секрецію соляної кислоти в шлунку, слід враховувати кожній людині при формуванні щоденного раціону, адже, в наш час ця речовина широко використовується в багатьох харчових виробництвах і користується великою популярністю в світі, а посилення базальної секреції може бути причиною патогенезу багатьох кислотозалежних захворювань (гастроезофагальна рефлюксна хвороба, гастрит, виразкова хвороба). Виразкова хвороба шлунка та дванадцятипалої кишки залишається найпоширенішим захворюванням органів травлення [1], а в останні десятиріччя простежується тенденція до неухильного зростання кількості хворих на виразкову хворобу, що пов'язано з порушенням режиму та характеру харчування, зловживанням грубою й гострою їжею, неконтрольованим застосування харчових добавок, а саме глутамату натрію.

Висновки: Щоденне введення мононатрій глутамату натрію щурам в дозі 15 та 30 мг/кг (1 та 2 грами на середньо статистичну людину) впродовж 20-ти та 30-ти днів викликає гіперсекрецію соляної кислоти, що може бути причиною патогенезу кислотозалежних захворювань. Максимальні добові дози даної харчової добавки мають бути переглянуті з урахуванням їх впливу на секреторний потенціал шлунку.

1. Передерий В.Г. Современные представления о лечении язвенной болезни с точки зрения принципов доказательной медицины / В.Г. Передерий, С.М. Ткач, О.В. Швец // Соврем. гастроэнтерол. – 2002. – №3. – С. 18-20. 2. Фалалєєва Т.М., Берегова Т.В., Штанова Л.Я. Глутаматні рецептори та їх роль у регуляції секреції кислоти в шлунку (огляд літератури) / Т.М. Фалалєєва, Т.В. Берегова, Л.Я. Штанова // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2007. – Т. 2, № 37. – С. 53-59. 3. Cutler R.G. Peroxide-producing potential of tissues: inverse correlation with longevity of mammalian species / R.G. Cutler // Proc Natl Acad Sci USA. – 1985. – Vol. 82, № 14. – P. 4798-4802. 4. Freeman M. Reconsidering the effects of monosodium glutamate: a literature review / M. Freeman // J Am Acad Nurse Pract. – 2006. – Vol. 18, № 10. – P. 482-

486. 5. Geha R. Review of alleged reactions to monosodium glutamate and outcome of a multicenter double-blind placebo-controlled study / R. Geha, A. Beiser, C. Ren et al. // J. Nutr. – 2000. – Vol. 130. – P. 1058-1062. 6. Ghosh M.H. Continuous recording of acid gastric secretion in the rat / M.H. Ghosh, H.O. Shild // Br. J. Pharmac. Chemother. – 1958. – Vol. 13. – P.54 – 61. 7. Jinap S, Hajeb P. Glutamate. Its applications in food and contribution to health / S. Jinap, P. Hajeb // Appetite. – 2010. – Vol. 55, № 1. – P. 1-10. 8. Nakamura E. Physiological Roles of Dietary Free Glutamate in Gastrointestinal Functions / E. Nakamura, K. Toric, H. Uneyama // Biol. Pharm. Bull. – 2008. – Vol. 31, № 10. – P. 1841–1843. 9. Williams A.N. Monosodium glutamate 'allergy': menace or myth? / A.N. Williams, K.M. Woessner // Clin Exp Allergy. – 2009. – 39, № 5. – P. 640-646. 10. Yang W.H. The monosodium glutamate symptom complex: assessment in a double-blind, placebo-controlled, randomized study / W.H. Yang, M.A. Drouin, M. Herbert et al. // J Allergy Clin Immunol. – 1997. – 99. – P. 757-762.

Надійшла до редколегії 28.01.11

УДК 619:615.37:616-097.3:63

С. Шаповалов, канд. біол. наук, М. Долгая, канд. біол. наук,
Т. Преображенська, канд. біол. наук

ПРОФІЛАКТИКА ЗАЛІЗОДЕФІЦИТНИХ АНЕМІЙ В РАННЬОМУ ПОСТНАТАЛЬНОМУ ОНТОГЕНЕЗІ ПОРОСЯТ ЗА УМОВ УВЕДЕННЯ КОМПЛЕКСНИХ ОРГАНІЧНИХ СПОЛУК ЕСЕНЦІЙНИХ МІКРОЕЛЕМЕНТІВ

Розглянуто питання використання препаратів, які створені на основі композицій сполук мікроелементів, і які є ефективною альтернативою існуючим традиційним підходам щодо профілактики залізодефіцитних анемій в організмі поросят і виникнення в них системних захворювань. Наведено дані про вплив мікроелементвмісної композиції "Біотам" на показники крові поросят раннього віку. Встановлено, що досліджувана мікроелементна композиція сприяє підвищенню рівня гемоглобіну в крові тварин дослідної групи.

A question is considered the uses of preparations, which are created on the basis of composition of microelements, and which are an effective alternative existent traditional approaches in relation to the prophylaxis of iron-deficient anemia in the organism of piglings and origin in them of system diseases. Information is resulted about influence of microelements composition "Biotam" on the indexes of blood.

Вступ. У новонароджених поросят загальна кількість Феруму, депонована у тканинах тварини не перевищує 50 мг, з цієї кількості на утворення еритроцитів щодня витрачається до 7 мг Феруму. Єдиним природнім джерелом надходження цього елемента у період вигодовування є молоко матері, з яким всмоктується близько 1 мг Феруму на добу. Як наслідок, на 5 – 7 добу життя запаси депонованого в тканинах Феруму вичерпуються і настає його дефіцит, що збільшує ризик розвитку залізодефіцитної анемії (ЗДА) [1, 4].

Як відомо, основним засобом для лікування ЗДА поросят у ранньому постнатальному онтогенезі дотепер залишаються мінеральні препарати Феруму [1, 2, 6]. Але при всій очевидній клінічній ефективності монотерапії ферумвмісними препаратами даний спосіб профілактики або лікування ЗДА не можна вважати ідеальним.

Хоча використання препаратів Феруму, як правило, призводить до збільшення загального його вмісту в тканинах поросят і у результаті до нормалізації рівня гемоглобіну крові й кількості еритроцитів, однак даний вид лікування виявляється малоефективним при розвитку загальноанемічних розладів, які суттєво порушують протікання обмінних процесів у поросят з ЗДА й найчастіше є провідними у клінічній картині захворювання [5, 9, 10].

Основою традиційних залізовмісних препаратів є неорганічні сполуки Феруму, що мають порівняно низьку засвоюваність, у результаті чого значно збільшується час контакту препаратів Феруму із слизовою оболонкою травного тракту. А це, у свою чергу, нерідко супроводжується важкими диспепсичними розладами, викликаними токсичною дією сполук Феруму неорганічної природи на шлунково-кишковий епітелій [3, 7].

Крім того, монотерапія препаратами Феруму не враховує можливих ускладнень, до яких призводить хронічна тканинна гіпоксія, та як наслідок, різка активація вільнорадикальних процесів і порушення окисного гомеостазу на тлі зниження антиоксидантного захисту організму [8]. З цього випливає необхідність додаткової антиоксидантної терапії у поросят періоду раннього постнатального онтогенезу, особливо, якщо прийняти до уваги відому здатність іонів Феруму у високих концентраціях виявляти прооксидантні властивості. Таким чином, враховуючи наведені недоліки та ускладнення при монотерапії залізовмісними препаратами дана стратегія лікування не може вважатись задовільною, що змушує шукати нові підходи до лікування ЗДА у поросят.

У багатьох роботах було показано, що патогенетична сутність латентного дефіциту Феруму полягає у виснаженні його транспортних і органних запасів [1, 3, 6, 10]. ЗДА є крайнім ступенем дефіциту Феруму в організмі, коли, поряд зі змінами параметрів феррокінетики й зниженням кількості гемоглобіну, формуються морфофункціональні порушення з боку ряду органів і систем. Останнє визначається біологічною роллю Феруму, що є необхідним компонентом залізовмісних і залізозалежних ферментів (гемоглобін, міоглобін, каталаза, пероксидаза, система цитохромів, дегідрогенази й ін.), що забезпечують нормальне функціонування клітин, стаціонарний рівень ліпоперекисів, антиоксидантного захисту й у цілому фізіологічний статус організму [4, 7].

Проблемам діагностики, патогенезу, лікування й профілактики ЗДА присвячена значна кількість робіт, однак ведення сучасного тваринництва вимагає відходу від традиційних і пошук нових доступних економічних і технологічних засобів, що забезпечують своєчасну комплексну профілактику хвороб молодняку тварин.

Усунути недоліки та ускладнення, які мають місце при монотерапії залізовмісними сполуками можливо при використанні перспективних комбінацій препаратів Феруму з іншими мікроелементами, вітамінами, антиоксидантами, які дозволяють підвищити ефективність лікування й знизити кількість побічних ефектів [2]. Тому метою нашого дослідження було вивчення ефективності профілактики ЗДА у поросят за умов введення композицій органічних сполук есенційних мікроелементів.

Об'єкт та методи досліджень. Для проведення експерименту було сформовано 2 групи клінічно здорових поросят за принципом пар-аналогів (вік, маса, стать) по 6 особин у кожній. Всі групи перебували на грудному відгодовуванні в однакових умовах утримання. Тварин дослідних груп фарбували стійким червоним барвником та щоденно вводили на 2, 7, 21 та 30-ту добу препарат "Біотам", з розрахунку 20 мг на 1 кг маси тіла. Препарат містить мікроелементи у формі комплексів металів Zn^{2+}, Cu^{2+}, Co^{2+}, Cr^{3+}, Fe^{3+}, Mn^{2+} з N-2,3-диметілфенілантраніловою (мефенаміновою) кислотою. Вміст мікроелементів в 1 грамі препарату становив: Zn^{2+} – 17 мг, Cu^{2+} – 3,7 мг, Co^{2+} – 0,35 мг, Cr^{3+} – 0,3 мг, Fe^{3+} – 14,5 мг, Mn^{2+} – 4 мг, N-2,3-диметилфенілантранілової кислоти – 412 мг, глюконату кальцію – 180 мг, крохмаль, цукор, аеросил до 1 г. Природа і мольне співвідношення мікроелементів, які входять до композиції, відповідають їх складу у металовмісних ферментах.

На 1, 7 та 14-ту добу проводили забір крові безпосередньо із серця, відібрану кров стабілізували гепарином. На 35-ту добу тварин було забито. Таким чином дослідній групі було додатково введено сукупно протягом досліду 500 мг препарату на кожну тварину.

Вміст гемоглобіну (Hb), кількість еритроцитів, гематокритне число (Ht), визначали на гематологічному аналізаторі "Sysmex" (Японія). Морфологічні зміни еритроцитів: величину середнього об'єму та діаметру, гістограми їхнього розподілу, визначали на електроцитоаналізаторі ЕЦА-02 (Україна). Також визначали середній об'єм еритроциту (MCV – Mean Corpuscular Volume), середній вміст гемоглобіну в еритроциті (MCH – Mean Corpuscular Hemoglobin), середню концентрацію гемоглобіну в еритроциті (MCHC – Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration). Концентрацію мікроелементів визначали на атомно-абсорбційному спектрофотометрі AAS -30 (Карл Цейс, Німеччина).

Результати та їх обговорення. Результати досліджень клінічних показників периферичної крові представлені в таблиці 1.

***Таблиця* 1. Показники крові поросят контрольної (К) групи та групи з уведення препарату "Біотам" (Д)**

Показники	Групи	Терміни відбирання крові, доба			
		1	7	14	35
Hb гемоглобін, г/л	1 (К)	114,7±1,35	90,01±2,18	92,6±1,46	100,4±2,16
	2 (Д)	116,0±1,28	109,8±0,98*	118,4±3,54*	121,5±4,88*
RBC еритроцити, Т/л	1 (К)	5,18±0,04	4,34±0,02	4,23±0,01	4,61±0,04
	2 (Д)	5,11±0,03	4,72±0,03*	4,61±0,07	4,75±0,08
Ht гематокритне число	1 (К)	25,20±0,48	21,20±1,88	23,66±1,76	24,66±0,76
	2 (Д)	25,20±1,39	22,80±1,50	25,33±1,45	27,33±1,45
MCV об'єм еритроцитів, мкм^3, (fl)	1 (К)	62,34±2,25	59,55±0,09	64,00±0,05	65,34±0,04
	2 (Д)	62,28±1,74	67,20±0,07*	74,01±0,04*	76,25±0,01*
D діаметр еритроцитів, мк^1	1 (К)	54,32±0,98	54,20±0,08	55,64±0,08	58,7±0,09
	2 (Д)	54,10±0,75	55,10±0,07	56,18±0,05	60,11±0,09
Розподіл за об'ємом, $\sigma \cdot Z^{-1} \cdot 100\%$	1 (К)	22,80±0,04	20,16±0,04	17,14±0,07	20,54±0,07
	2 (Д)	21,75±0,02	21,60±0,07	19,48±0,08	22,15±0,08*
Розподіл за діаметром, $\sigma \cdot Z^{-1} \cdot 100\%$	1 (К)	7,35±0,09	7,18±0,03	7,16±0,07	9,54±0,09
	2 (Д)	7,11±0,07	9,64±0,04*	9,08±0,02*	11,06±0,08*
MCH, Середній вміст гемоглобіну в еритроциті, пг	1 (К)	22,00± 0,03	20,73±0,93	21,90±0,43	21,67±0,14
	2 (Д)	22,70±1,22	23,26±1,04	25,68±1,00 *	25,57±1,14
MCHC середня концентрація гемоглобіну в еритроцитах, г/л	1 (К)	240,32±4,68	260,31±11,4	270,18±6,49	270,65±10,1
	2 (Д)	248,35±4,12	285,35±5,70	296,31±5,47	305,87±12,3*
MCV/ MCHC	1 (К)	0,25±0,001	0,22±0,002	0,23±0,003	0,24±0,001
	2 (Д)	0,25±0,01	0,23±0,001	0,25±0,004	0,25±0,007*

Примітка * – P ≤ 0,05 відносно контрольної групи

Показано, що протягом 30 діб в контрольній групі спостерігається динаміка зниження основних гематологічних показників: концентрації гемоглобіну, вмісту еритроцитів та гематокриту. Особливо виражене зниження відбувається на 14-ту добу дослідження. Так рівень гемоглобіну був меншим на 14%, 24%, 14%, а концентрація еритроцитів на 11%, 28%, 11% на 7, 14 та 35-ту добу відповідно, у порівнянні з першим днем постнатального онтогенезу.

Ці величини дають змогу оцінити ступінь вираженості анемії. У клінічній практиці використовують різні розрахункові величини, що відображають фізико-хімічні властивості еритроцитів, та дозволяють кількісно характеризувати важливі показники стану еритроцитів. Їх обчислюють, виходячи з величини гематокриту, концентрації гемоглобіну, кількості еритроцитів. Однією з таких величин є MCV – середній корпускулярний об'єм – середня величина об'єму еритроцитів, вимірювана у фемтолітрах (fl) або мкм^3. За нашими даними MCV був в межах 60-76, що менше ніж 80 fl. На підставі значень MCV можливо диференціювати дану анемію, як анемію мікроцитарного типу. На нашу думку, цей критерій не є достовірним при великій кількості еритроцитів зі зміненою формою.

Наступним діагностичним показником був середній вміст гемоглобіну в еритроциті (MCH). Цей показник відбиває абсолютний вміст гемоглобіну в одному еритроциті, виражений у піктограмах (пг), його визначали шляхом розподілу концентрації гемоглобіну на число еритроцитів в однаковому об'ємі крові. Це інформативний показник дефіциту Феруму в організмі або незасвоєння Феруму еритробластами й порушення синтезу гему. Показано зниження MCH на 7 добу на 6 % та нівелювання цього показника на 14 та 35-ту добу. На основі цих даних можна припустити, що на 7-му добу спостерігається розвиток гіпохромної та мікроцитарної анемії.

Однак більшість дослідників співвідносять з середнім корпускулярним об'ємом еритроцитів (MCV) середню концентрацію гемоглобіну в еритроциті (MCHC) та на підставі цих показників розрізняють різні види анемій. За нашими даними це співвідношення було таким: 0,25; 0,22; 0,23; 0,24 на 1, 7, 14 та 35-ту добу, відповідно. Тобто зниження середнього вмісту гемоглобіну в еритроциті (гіпохромія) спостерігається внаслідок зменшення обсягу еритроцитів (мікроцити) або зниження вмісту гемоглобіну в нормальному за об'ємом еритроциті. Слід зазначити, що зміни морфометричного складу еритроцитів вказують на неоднорідність популяції еритроцитів периферичної крові з переважанням на 7-у і 14-у добу мікроформ. Про це свідчать дані розподілу еритроцитів за об'ємом та діаметром (максимуми гістограм розподілу).

Проаналізувавши показники, як окремо, так і в їх співвідношеннях можна зробити висновок, що в даному досліді у поросят у ранньому постнатальному онтогенезі розвивається гіпохромна, мікроцитарна анемія, яка має більш гострі прояви на 7-му добу та залишається вираженою до 35-ї доби.

Введення мікроелементної композиції у дослідній групі призводило до збільшення концентрації гемоглобіну на 7-у добу на 18 %, на 14-ту добу на 21 %, а на

35-ту добу на 17 %, рівень еритроцитів був більшим на 8 % на 7 та 14-ту добу, а на 35-ту добу він був більшим лише на 3% відносно поросят контрольної групи. Збільшення гематокриту спостерігалося протягом досліду на 7-9 %. Щодо об'єму еритроцитів, показано збільшення протягом досліду на 14%, в той же час їх діаметр збільшувався лише на 1,5-2%. Відзначалось зменшення гістограм розподілу еритроцитів за об'ємом в дослідній групі з 7-ї по 35-ту добу майже в 2 рази. Рівень МСН – середнього вмісту гемоглобіну в еритроциті збільшувався в дослідній групі на 11%, 15% на 7 та 14, 35-ту добу, відповідно. Середня концентрація гемоглобіну в еритроцитах МСНС була вищою від 8 до 12%, а співвідношення середнього вмісту гемоглобіну в еритроциті та середньої концентрації гемоглобіну в еритроциті MCV/МСНС була на 4-8% вищою у порівнянні з контролем.

Особливої уваги заслуговують дослідження вмісту Феруму та інших мікроелементів в цільній крові 35-ти денних поросят.

***Таблиця* 2. Вміст мікроелементів в крові 35-ти денних поросят**

Показник	Контроль	Дослід
Ферум, мг	14,28±5,24	33,18±3,18*
Купрум, мкг	196,21±5,12	234,17±10,25*
Цинк, мкг	383,06±10,25	480,35±17,26*
Манган, мкг	9,25±1,38	12,54±1,25*
Кобальт, мкг	2,18±0,19	2,95±0,65

Примітка *- P ≤ 0,05 відносно контрольної групи

Дані, наведені у таблиці 2 свідчать про те, що введення додаткової кількості мікроелементів забезпечує більш високе їх накопичення в крові. Так, рівень загального Феруму крові був вірогідно (P ≤ 0,05) вищим на 54%, рівень Купруму на 16%, рівень Цинку на 20%, рівень Мангану та Кобальту на 26%. Отже, введення додаткової кількості мікроелементів сприяло підвищенню концентрації їх у крові протягом дослідного періоду.

Висновки. Показано розвиток мікроцитарної гіпохромної анемії у поросят у ранньому постнатальному онтогенезі та ефективність її профілактики при використанні композиції есенційних мікроелементів – поліядерних комплексів – синергістів, які виявляють біокоординаційний ефект. Зроблено висновок, що збалансована по пропорції суміш мікроелементів у формі органічних комплексів у невеликих кількостях краще засвоюється організмом та виявляє розширений фармакологічний спектр дії. Рекомендовано використання препаратів, які створені на основі композицій сполук мікроелементів, як ефективна альтернатива існуючим традиційним підходам щодо профілактики залізодефіцитних анемій в організмі поросят і виникнення в них системних захворювань.

1. Алеев Э.Х. Использование ферроплекса для стимуляции продуктивных функций свиней. Автореферат дисс. канд. биол. н. Казань, 1996.-20с. 2. Иванов А.В. Фармако – токсикологические свойства и эффективность применения "Янтарос плюс" и природных минералов в животноводстве. Автореферат дисс. Доктора биол.н. Казань, 2000. 37с. 3. Казаков Х.Ш. Хелаты экзогенных металлов с биогенными соединениями как стимуляторы иммунодинамических функций живого организма. В сб.: Профилактика и лечение заболеваний сельскохозяйственных животных. Одесса, 1972. с.379-383 с. 4. Николадзе М.Г. Диагностика и профилактика анемии и иммунной недостаточности у поросят. Автореферат диссертации кандидата вет.наук. Витебск, 2002. 19 с. 5. Николадзе М.Г., Карпуть И.М. Клиническое значение определения количества сидероцитов в периферической крови при алиментарной анемии поросят. В сб.: Теоретические и практические аспекты возникновения и развития болезней животных и защита их здоровья в современных условиях. Материалы меж.конф., посвященной 30-летию ВНИИ патологии, фармакологии и терапии. 3-4 октября 2000. С.145-149. 6. Сытько В.Н. Состояние обменных процессов у свиноматок и поросят, содержащихся в условиях промышленных комплексов зоны Южного Урала. Автореф. дисс. док. вет. н. Казань, 1990. 31с. №20. 2001 г. 45. 7. Хазипов Н.З., Логинов Г.П., Метлякова М.Ю., Елисеева Э.С. Феррокомп-3 эффективное средство для профилактики анемии поросят. В сб.: Незаразные болезни животных. Материалы международной научной конференции, посвященной 70-летию образования зооинженерного факультета. (30-31 мая 2000г). Казань, 2000.- С.127. 8. Дворецкий Л. И. Железодефицитные анемии. Москва., "Ньюдиамед", 1998, с. 37. 9. Conrad M. E. Iron Overloading Disorders and Iron Regulation. Seminars in Hematology. W.B. Saunders Company. 1998, v 35, n1, 1-4. Wharton B.A. Iron Deficiency in Children: Detection and Prevention. Review. British Journal of Hematology 1999, 106, 270–280.

Надійшла до редколегії 15.07.10

УДК 577.125.8

К. Дворщенко, канд. біол. наук, С. Сенін, асп.,
О. Берник, асп., Ю. Степанов, канд. біол. наук

ОКИСНО-АНТИОКСИДАНТНИЙ БАЛАНС У СЛИЗОВІЙ ОБОЛОНЦІ ШЛУНКА ТА СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ТРИВАЛОЇ ГІПОХЛОРГІДРІЇ

Показано, що в умовах тривалого гіпоацидного стану у клітинах слизової оболонки шлунка та сироватці крові відбувається зсув окисно-антиоксидантної рівноваги у бік інтенсифікації процесів вільнорадикального окиснення ліпідів.

The results of the study had shown that the long-term hypoacidity state led to a shift in the oxidative-antioxidant balance in the gastric mucosa cells and serum and intensified the processes of free-radical oxidation of lipids.

Вступ. За даними літератури канцерогенез шлунково-кишкового тракту може бути асоційований зі зниженням кислотності шлункового соку [11, 12]. Встановлено, що за умов тривалої гіпохлоргідрії в крові підвищується рівень гастрину, який є потенційним кофактором у розвитку аденокарциноми та інших типів пухлин шлунка, зокрема нейроендокринних (карциноїдів) [9, 13, 14]. Дані про патогенез раку шлунка, асоційованого з гіпоацидністю, є достатньо обмеженими. Тому дослідження можливих молекулярних механізмів шлункового канцерогенезу є актуальним питанням клінічної біохімії.

При розвитку патологічного стану шлунка змінюються біохімічні процеси у слизовій оболонці. Неспецифічною ланкою пошкодження тканин є порушення окисно-антиоксидантного балансу, показники якого можуть бути використані в якості допоміжних маркерів розвитку патологічного процесу.

Тому метою роботи було дослідити окисно-антиоксидантний баланс у слизовій оболонці шлунка та сироватці крові щурів за умов тривалого пригнічення секреції соляної кислоти.

Об'єкт та методи досліджень. Досліди проводили на білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях. Гіпоацидний стан моделювали внутрішньочеревним введенням 14 мг/кг омепразолу (виробництва Sigma, USA), 1 раз на добу протягом 28 діб. У якості контролю використовували щурів, яким протягом 28 діб вводили внутрішньочеревно 0,2 мл води для ін'єкцій.

Вміст дієнових кон'югатів визначали в гептанізопропанольному екстракті спектрофотометричним методом, шиффових основ – флуориметричним методом [1, 2]. Вміст ТБК-активних сполук визначали по реакції з тіобарбітуровою кислотою [6]. Оцінку активності супероксидисмутази проводили з використанням нітросинього тетразолію [7], каталази – за зменшенням кількості H_2O_2 у розчині після иінкубації за оптимальних умов [3]. 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. Процеси перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) у досліджуваних органах щурів оцінювали за вмістом первинних продуктів ліпідної пероксидації – дієнових кон'югатів, проміжних продуктів ПОЛ – ТБК-активних сполук та кінцевих продуктів ПОЛ – шиффових основ.

Вміст дієнових кон'югатів є біохімічним показником кількості первинних продуктів ПОЛ, утворюваних за участі активних форм кисню (АФК) та вільних радикалів $L^{\cdot}$, $LO^{\cdot}$ та $LOO^{\cdot}$. Вторинні продукти ліпідної пероксидації, утворювані у ході реакцій ланцюгового переокиснення, також проявляють високу реакційну здатність. Так, ТБК-активні сполуки (малоновий діальдегід та його похідні) викликають модифікацію білків та зміни у ліпідному шарі мембрани. Внаслідок окисної полімеризації модифікованих ліпідів і білків та їх зшивок утворюються кінцеві продукти ПОЛ – шиффові основи, які проявляють флюорисцентні властивості. Таким чином, за накопиченням дієнових кон'югатів можна оцінювати первинні ефекти окисного стресу, тоді як вміст шиффових основ відбиває ефективність нейтралізації продуктів вільнорадикального переокиснення у ліпідах [10].

Встановлено, що за умов тривалого пригнічення шлункової секреції соляної кислоти омепразолом у щурів, вміст дієнових кон'югатів збільшувався: у слизовій оболонці шлунка – в 3,5 рази, в сироватці крові – в 2,1 рази по відношенню до контрольних тварин (табл. 1). Показано, що кількість ТБК-активних сполук у досліджуваних органах щурів з гіпоацидним станом зростала. Так, у епітеліоцитах шлунка рівень проміжних продуктів ПОЛ накопичувався в 4,6 рази, а в сироватці крові – в 1,9 рази порівняно з контролем (табл. 1). Зафіксовано збільшення вмісту шиффових основ у щурів з шлунковою гіпохлоргідрією: у слизовій оболонці шлунка – в 3,1 рази, а в сироватці крові – в 2,1 рази відносно контрольних величин (табл. 1).

***Таблиця* 1. Біохімічні показники окисно-антиоксидантної системи у органах щурів за умов тривалої гіпоацидності, (M ± m, n=10)**

Орган / *Досліджуваний* **параметр**	Слизова оболонка шлунка		Сироватка крові	
	Контроль	Омепразол	Контроль	Омепразол
Дієнові кон'югати, нМоль х мг білка$^{-1}$	258,45 ± 21,73	905,32 ± 84,92*	59,36 ± 5,72	124,61 ± 10,97*
ТБК-активні сполуки, нМоль х мг білка$^{-1}$	44,21 ± 4,35	202,65 ± 18,71*	15,31 ± 1,51	28,72 ± 2,59*
Шиффові основи, ум. од. х мг білка$^{-1}$	6,51 ± 0,63	19,89 ± 1,92*	1,94 ± 0,18	3,97 ± 0,39*
Супероксиддисмутаза, ум. од. х хв$^{-1}$ х мг білка$^{-1}$	0,15 ± 0,01	0,82 ± 0,07*	0,11 ± 0,01	0,05 ± 0,005*
Каталаза, нМоль х хв$^{-1}$ х мг білка$^{-1}$	6,28 ± 0,54	7,93 ± 0,72*	2,34 ± 0,21	7,29 ± 0,71*

Примітка: *- $p \le 0,05$ порівняно з контролем.

Важливим параметром, від якого залежить концентрація вільних радикалів у клітинах, є сумісна робота супероксиддимутази та каталази – ферментів першої лінії антиоксидантного захисту, які своєчасно інактивують АФК як в нормі, так і при виникненні патологічних станів. Супероксиддисмутаза каталізує дисмутацію аніон-радикалу кисню в пероксид водню, а каталаза здійснює розщеплення пероксиду водню до води. Послідовна робота цього ферментативного ланцюга антиоксидантної системи забезпечує підтримку стаціонарного рівня концентрації вільних радикалів.

При оцінці антиоксидантної системи у слизовій оболонці шлунка та сироватці крові щурів з тривалої шлунковою гіпохлоргідрією зафіксовані різнонаправлені зміни активності супероксиддимутази. Встановлено, що у епітеліоцитах шлунка супероксиддимутазна активність зростала в 5,5 рази, а в сироватці крові навпаки її активність знижувалась – в 2,2 рази порівняно з контролем (табл. 1). Показано, що активність каталази у слизовій оболонці шлунка та сироватці крові у тварин з гіпоацидним станом змінювалась однонаправлено. Цей показник збільшувався у епітеліоцитах шлунка – в 1,3 рази, а в сироватці крові – в 3,1 рази відносно контрольних щурів (табл. 1).

Отримані дані свідчать, що за умов тривалої шлункової гіпохлоргідрії у епітеліоцитах шлунка та сироватці крові порушується окисно-антиоксидантна рівновага: посилюється продукція АФК, про що вказують зміни супероксиддисмутазної і каталазної активностей та накопичення продуктів ліпідної пероксидації.

Збільшення вмісту продуктів ПОЛ у сироватці крові може відбуватись у зв'язку з їх надлишковим накопиченням та виходом з еритроцитів або з інших органів, таких як печінка та нирки за умов порушення їх функціонального стану. Також зростання інтенсивності ліпідної пероксидації може призводити до порушення ліпідтранспортуючих функцій крові, оскільки основна кількість ліпідів сироватки крові представлена у складі ліпопротеїнів. В зв'язку з тим, що найбільш легкоокиснювальними ліпопротеїдами крові є ліпопротеїни низької щільності та ліпопротеїни дуже низької щільності, можуть порушуватись процеси транспорту тригліцеридів та холестерину у крові до місць їх утилізації [8]. Зниження активності супероксиддисмутази у сироватці крові у тварин з гіпоацидним станом та зростання продуктів ПОЛ може призвести до суттєвих пошкоджень як ендотеліальних клітин судин, так і клітин інших органів, оскільки баланс між активністю вільнорадикальних процесів і роботою антиоксидантної системи крові відображає стан окисно-відновного гомеостазу на рівні всього організму.

У слизовій оболонці шлунка рівень зростання вмісту продуктів ПОЛ є вищим, ніж у сироватці крові, що може бути пов'язано з порушенням в механізмі антирадикального захисту клітин: збільшення активності супероксиддисмутази на фоні майже незміненої активності каталази. Продуктом дії супероксиддисмутази є пероксид водню, який є джерелом виникнення гідроксильного радикалу – найбільш реакційноздатного з активних кисневих метаболітів, що утворюються в біологічних системах. Він, в свою чергу, посилює процеси вільнорадикального окиснення біомолекул, що призводить до накопичення токсичних продуктів та пошкодженню молекул, мембран, тканин, органів і в кінцевому рахунку організму в цілому [10]. Зокрема, накопичення продуктів ПОЛ є одним з факторів пошкодження ДНК епітеліальних клітин генеративної зони слизової оболонки шлунка, що сприяє утворенню генетичних мутацій. Крім того надмірна генерація АФК в тканині на фоні виснаження резервів антиоксидантної системи може порушувати процеси апоптозу, зокрема впливати на функціональний стан редокс-чутливих систем його внутрішньоклітинної регуляції [5]. Це також може бути допоміжним фактором розвитку диспластичних процесів у слизовій оболонці шлунка.

Висновки. Таким чином, згідно отриманих результатів експериментальних досліджень встановлено, що при довготривалому пригніченні секреції соляної кислоти у слизовій оболонці шлунка та сироватці крові щурів відбувається зсув окисно-антиоксидантної рівноваги у бік інтенсифікації процесів вільнорадикального окиснення ліпідів, що свідчить про розвиток окисного стресу.

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. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. – 1988. – Вып. 1. – С. 16-18. 4. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. – М.: Информполиграф, 2002. – 305 с. 5. Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Кайгородова Е.В., Часовских Н.Ю., Старикова Е.Г. Митогенактивированные протеинкиназы JNK и p38 – редокс-зависимые молекулярные мишени нарушения апоптоза при окислительном стрессе // Успехи физиол. наук. – 2009. – Т. 40, №2. – С. 3-11. 6. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 66-68. 7. Чевари С., Чаба И., Секей Й. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // Лабораторное дело. – 1985. – Вып. 11. – С. 678–681. 8. Balkan J., Kanbagli O., Mehmetcik G., et al. Increased lipid peroxidation in serum and low-density lipoproteins associated with aging in humans // Int. J. Vitam. Nutr. Res. – 2002. – Vol. 72(5). – P. 315 – 320. 9. 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. 10. Guéraud F., Atalay M., Bresgen N., Cipak A., Eckl P.M., Huc L., Jouanin I., Siems W., Uchida K. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products // Free Radic. Res. – 2010. – Vol. 44, №10. – P. 1098-1124. 11. Jensen R.T. Consequences of long-term proton pump blockade: insights from studies of patients with gastrinomas // Basic & Clin. Pharmacol. & Toxicol. – 2006. – Vol. 98. – P. 4-19. 12. Kuipers E.J. Proton pump inhibitors and gastric neoplasia // Gut. – 2006. – Vol. 55(9). – P. – 1217-1221. 13. Waldum H., Gustafsson B., Fossmark R., Qvigstad G. Antiulcer drugs and gastric cancer // Dig. Dis. Sci. – 2005. – Vol. 50. – P. S39–S44. 14. Watson S.A., Grabowska A.M., El-Zaatari M. & Takhar A. Gastrin – active participant or bystander in gastric carcinogenesis? // Nature Reviews Cancer – 2006. – Vol. 6. – P. 936-946.

Надійшла до редколегії 18.02.11

УДК 577.112.7

Н. Липова, асп., Д. Мінченко, наук. співроб.,
Я. Гармаш, інж. І кат., О. Мінченко, проф.

ДОБОВА ДИНАМІКА ЕКСПРЕСІЇ МРНК 6-ФОСФОФРУКТО-2-КІНАЗИ/ФРУКТОЗО-2,6-БІСФОСФАТАЗИ-2 ТА ЇЇ СПЛАЙС-ВАРІАНТІВ У РІЗНИХ ТКАНИНАХ ЩУРІВ

6-фосфофрукто-2-кіназа/фруктозо-2,6-бісфосфатаза-2 (PFKFB-2) є ключовим ензимом регуляції метаболізму глюкози і гліколізу, зокрема, в серцевому м'язі, головному мозку, легенях, сім'яниках та нирках. Протікання більшості біохімічних та фізіологічних процесів в організмі має циркадіальний характер і контролюється системою циркадіального годинника, молекулярними компонентами якого є циркадіальні фактори, що регулюють також і метаболізм глюкози. Встановлено, що рівень експресії мРНК PFKFB-2 по-різному змінюється у головному мозку, сім'яниках, серці і легенях щурів протягом доби: починаючи з шостої години ранку збільшується у сім'яниках, істотно не змінюється у головному мозку, але знижується у серці та легенях. О 18-й годині спостерігається зниження рівня експресії мРНК PFKFB-2 у сім'яниках і головному мозку та ще більш виражене – у серці і легенях, а о 22-й годині – зберігався майже на тому ж рівні у сім'яниках і серці та підвищувався до рівня 6-ї години у головному мозку і легенях. Рівень експресії мРНК досліджуваних альтернативних сплайс-варіантів PFKFB-2 змінювався протягом доби подібно до основного варіанту PFKFB-2. Результати даної роботи свідчать про наявність тканиноспецифічних циклічних змін в рівнях експресії мРНК PFKFB-2 та її сплайс-варіантів, чим можливо і визначається циркадіальний характер регуляції метаболізму глюкози у досліджуваних тканинах.

6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB-2) is a key regulatory enzyme of glucose metabolism and glycolysis in part in the brain, heart muscle, lung, testis and kidney. Most of biochemical and physiological processes of an organism proceed in a circadian manner and are controlled by the circadian clock. Circadian factors are molecular components of circadian clock system and also regulate the glucose metabolism. It has been shown that expression levels of PFKFB-2 mRNA are changed during day in the brain, heart, testis and lungs in different manner. Thus, the level of PFKFB-2 mRNA expression is increased in the testis, did not change significantly in the brain, but is decreased in the heart and lungs from 6:00 during first part of day time. The level of PFKFB-2 mRNA expression is decreased at 18:00 as compared to 6:00 in the testis and brain and more strongly in the lung and heart, but kept at the same level at 22:00 in the testis and heart. However, at 22:00 in the brain and lungs it is returned to the level which was observed at 6:00. The level of the expression of PFKFB-2 alternative splice variants mRNA is changed during the day like basic PFKFB-2 variant. The results of this work convincingly show the existence of tissue specific cyclic changes in the levels of expression of PFKFB-2 mRNA which is possibly determined circadian character of glucose metabolism regulation in the tested tissues.

Вступ. 6-фосфофрукто-2-кіназа/фруктозо-2,6-бісфосфатаза-2 (PFKFB-2) є ключовим ензимом регуляції метаболізму глюкози і гліколізу, зокрема, у головному мозку, серцевому м'язі, легенях, сім'яниках та нирках. Протягом останніх років детально досліджуються молекулярні основи сигнальних систем, що визначають вищі рівні регуляції найбільш важливих метаболічних процесів, зокрема регуляторні системи, та циклічний характер протікання основних процесів життєдіяльності та поведінки організмів протягом доби, в тому числі й обміну вуглеводів у клітинах різних організмів. Циклічний характер їх протікання генерується на молекулярному рівні циркадіальним годинником, компонентами якого є група взаємопов'язаних між собою регуляторних та транскрипційних факторів BMal1 і Clock, групи Period та криптохромів, синтез яких кодується циркадіальними генами і функція яких контролюється казеїнкіназами-1 епсілон та дельта [1 – 6]. Циркадіальний годинник присутній у кожній клітині організму, але його функція перебуває під контролем центрального годинника, що локалізується у певних структурах головного мозку [2]. Основні циркадіальні гени кодують синтез транскрипційних факторів для регуляції експресії великої групи генів сигнальної мережі і є ключовими регуляторами метаболізму як в нормі, так і за багатьох патологічних станів.

Більшість метаболічних процесів в організмі, в тому числі і обмін глюкози, мають циклічний характер і контролюються циркадіальними факторами [7 – 10]. Відомо, що при деяких захворюваннях спостерігаються порушення регуляції експресії ряду циркадіальних генів, які можуть бути причетні і до виникнення та прогресії злоякісних пухлин, а також до ожиріння та цукрового діабету [11 – 14]. Циркадіальні гени щоденно і ритмічно змінюють протікання різноманітних процесів в організмі, що є наслідком щоденних ритмічних змін в експресії самих циркадіальних генів і що контролюється, головним чином, світловими променями як на рівні гіпоталамусу, так і в кожній клітині організму [1, 2].

Було встановлено, що регуляція метаболізму факторами циркадіального годинника включає в себе постійний взаємозв'язок між регулюючою системою і метаболічними шляхами [8, 9]. Більше того, для циркадіальних факторів у ссавців характерне явище зворотного зв'язку в механізмах регуляції: казеїнкіназа-1епсилон зв'язується з Per2, а потім з Cry1 та комплексом Clock:BMal1, створюючи негативну регуляторну петлю, що є надзвичайно важливим для точної і чіткої робити циркадіального годинника [4, 5, 15, 16].

На даний час встановлено, що сон і циркадіальні ритми мають сильний вплив на енергетичний обмін і їх порушення є важливим компонентом механізмів поширення епідемій ожиріння та цукрового діабету [8, 17]. Ці патології взаємно доповнюють одна одну, оскільки ожиріння суттєво ускладнює протікання цукрового діабету. Система циркадіального годинника відіграє фундаментальну роль в енергетичному обміні як на функціональному рівні, так і на молекулярному. Було також показано, що за цукрового діабету істотно порушується експресія важливих ензимів регуляції метаболізму глюкози, PFKFB-3 та PFKFB-2 [18, 19]. Не зважаючи на те, що ці дослідження ще тільки починаються, вони є надзвичайно важливим концептуальним та експериментальним підґрунтям для розуміння фундаментальних молекулярних основ метаболічних захворювань [8, 17].

Метою даного дослідження було вивчення у різних тканинах щурів добової динаміки експресії мРНК PFKFB-2 та її альтернативних сплайс-варіантів, які є молекулярними компонентами системи контролю метаболізму глюкози в організмі і порушення яких призводить до розвитку низки патологічних станів.

Матеріали і методи досліджень. Досліди проводили на щурах-самцях лінії Wistar, вагою 220 – 240 грамів згідно з загальноприйнятими правилам роботи з лабораторними тваринами. Для дослідження добової динаміки експресії мРНК PFKFB-2 щурам давали наркоз і забивали о 6, 10, 14, 18 та 22 годині (по три тварини у кожній групі). Для виділення РНК брали легені, головний мозок, сім'яники та серце, заморожували їх у рідкому азоті і використовували для виділення РНК, які виділяли з допомогою реагенту Трізол (Trizol; Invitrogen, США) згідно протоколу виробника, як описано раніше [20]. Осад РНК із легень, головного мозку, сім'яників та серця щурів розчиняли у воді, що не містить домішок рибонуклеаз, і використовували як матрицю для синтезу комплементарних ДНК (кДНК). Реакцію зворотної транскрипції РНК проводили за допомогою набору SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, США) та оліго(dT) праймера згідно протоколу виробника.

Для дослідження експресії мРНК PFKFB-2 та альтернативних сплайс-варіантів було використано метод кількісної полімеразної ланцюгової реакції кДНК, отриманих шляхом зворотної транскрипції матричних РНК. Для ампліфікації кДНК PFKFB-2 та бета-актину, як контрольного гена, використовували ABsolute qPCR SYBR Green Mix (Thermo Scientific, Великобританія) та специфічні для мРНК PFKFB-2 щура та її альтернативних сплайс-варіантів пари праймерів (Sigma, США).

Для проведення ампліфікації кДНК PFKFB-2 брали 1 мкл продукту реакції зворотної транскрипції, що відповідало 20 нг загальної РНК, взятої у реакцію, і такі пари праймерів: 5'- CTGACTGCATCCTTAGCTG -3' і

3'-CAAGATGGCAAGTTGGGTC -5', які відповідали нуклеотидним послідовностям 1503-1522 та 1563-1582 кДНК PFKFB-2 щура (GenBank номер NM_080477), а також 5'- CCGTGCCCTGGATATGCAAG -3' і

3'-CAAGTGTTAATCTGAACATG -5', які відповідали нуклеотидним послідовностям 1388-1407 та 1536-1555 варіанту кДНК PFKFB-2 щура (GenBank номер GQ422137).

Для дослідження експресії альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-2 використовували специфічні для кожного сплайс-варіанту пари праймерів. Для альтернативного сплайс-варіанту мРНК PFKFB-2 з делецією восьмого екзону (-125; GenBank номер GQ422137) були використані такі праймери: 5'–GCTGCCAATATTCTGGGACC –3' (прямий) та зворотний 3'–GAACAGGAGATCCAGGACCT –5'. Прямий праймер починається з 521 нуклеотидного залишку (5'–позиція), а зворотний – з 774 нуклеотидного залишку (3'–позиція). Для вивчення експресії альтернативного сплайс-варіанту мРНК PFKFB-2 з делецією восьмого екзону (-125) та вставкою між 9-м і 10-м екзонами (+20) було використано такі праймери: 5'–GATCCTGATGTCATTGCTGC –3' (прямий) та зворотний 3'– CCCAGTTTGCTCAGGCTCTGA –5', що відповідають послідовностям нуклеотидів 506 – 525 та 758 – 779 опублікованого варіанту кДНК PFKFB-2 щура (GenBank номер GQ438759).

Для ампліфікації кДНК бета-актину використовували такі праймери: прямий праймер – 5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG -3', який починається із 704-го нуклеотидного залишку (5'–позиція), та зворотний праймер – 5'- AGCACTGTGTTGGCGTACAG -3', який починається з 937-го нуклеотидного залишку (3'–позиція; GenBank номер X00351). Рівень експресії кожного із досліджуваних варіантів мРНК PFKFB-2 за кількісної полімеразної ланцюгової реакції перераховували на мРНК бета-актину.

Кількісну полімеразну ланцюгову реакцію проводили на апараті "Stratagene Mx 3000P cycler". Зміни в експресії мРНК PFKFB-2 у цих органах з 10:00 до 22:00 порівнювали з 6-ю годиною ранку, прийнятою за 100 %. Аналіз результатів кількісної полімеразної ланцюгової реакції проводили з допомогою спеціальної комп'ютерної програми "Differential expression calculator", а статистичний аналіз – в Excel програмі. Різницю між двома середніми величинами вважали достовірною при значенні $P < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. Експресію мРНК надзвичайно важливого регуляторного ензиму PFKFB-2 досліджували в серці, головному мозку, легенях та сім'яниках з 6-ї години ранку до 10-ї години вечора з інтервалом в чотири години методом кількісної полімеразної реакції комплементарних ДНК, отриманих методом зворотної транскрипції РНК, з метою виявлення можливої ритмічності їх експресії протягом дня.

Встановлено, що рівень експресії мРНК PFKFB-2 у легенях порівняно з 6-ю годиною ранку суттєво знижувався протягом першої половини досліджуваного періоду часу, а потім (о десятій годині вечора) повертався до рівня шостої години ранку (рис. 1, А).

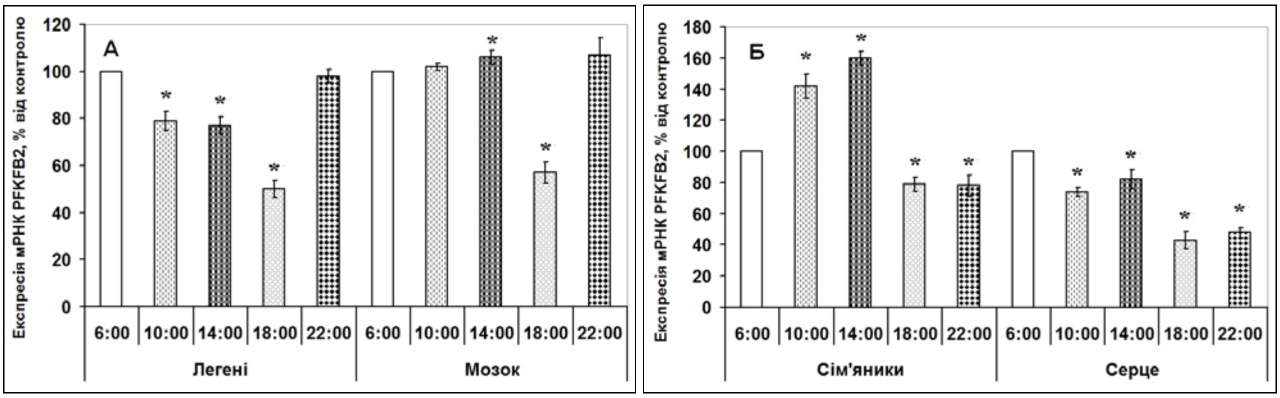


Рис. 1. Експресія мРНК 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-2 (PFKFB2) у легенях та головному мозку (А), сім'яниках та серці (Б) з 6:00 до 22:00 з інтервалом в чотири години визначена методом кількісної полімеразної реакції комплементарних ДНК. На цьому та наступних рисунках: зміни в експресії мРНК 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-2 у цих органах з 10:00 до 22:00 порівнювали з 6-ю годиною ранку, прийнятою за 100 %; n = 3; * – P < 0,05

Разом з тим, рівень експресії мРНК PFKFB-2 у головному мозку порівняно з 6-ю годиною ранку істотно не змінювався о 10:00 та 22:00, хоча невелике і короткочасне його збільшення спостерігалося о 14-й годині, а о 18:00 рівень експресії мРНК PFKFB-2 у головному мозку суттєво, майже вдвічі, знижувався (рис. 1, А).

На рис. 1, Б наведено результати дослідження експресії мРНК PFKFB-2 у сім'яниках та серцевому м'язі. Встановлено, що рівень експресії мРНК цього ензиму в сім'яниках підвищувався о 10:00 та ще більше о 14:00, але о 1-й та о 22-й годині спостерігалось зниження рівня її експресії порівняно з 6-ю годиною ранку. В той же час, у серцевому м'язі спостерігалось зниження рівня експресії мРНК PFKFB-2 починаючи з 10:00 і майже вдвічі знижувався о 18-й та 22-й годині порівняно з 6-ю годиною ранку.

Як видно із даних, представлених на рис. 2, А, рівень експресії альтернативного сплайс-варіанту мРНК PFKFB-2 з делецією восьмого екзону істотно не змінювався у головному мозку протягом досліджуваного періоду часу за винятком 18-ї години, коли спостерігалося суттєве, майже вдвічі, зниження порівняно з 6-ю годиною ранку.

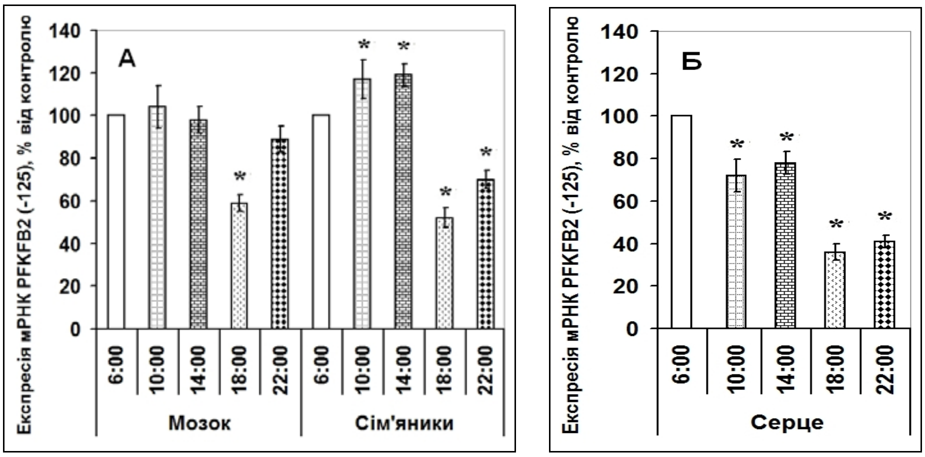


Рис. 2. Експресія альтернативного сплайс-варіанту мРНК 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-2 із делецією восьмого екзону [PFKFB2 (-125)] у головному мозку і сім'яниках (А), а також у серці (Б) з 6:00 до 22:00 з інтервалом в чотири години методом кількісної полімеразної реакції комплементарних ДНК

Було також встановлено, що рівень експресії мРНК цього альтернативного сплайс-варіанту мРНК PFKFB-2 у сім'яниках збільшувався о 10-й та 14-й годині, а потім різко знижувався і о 18-й та 22-й годині був майже вдвічі меншим порівняно з 6-ю годиною ранку (рис. 2, А). На рис. 2, Б представлено результати дослідження експресії мРНК альтернативного сплайс-варіанту мРНК PFKFB-2 з делецією восьмого екзону у серцевому м'язі. Встановлено, що рівень експресії мРНК цього сплайс-варіанту у серцевому м'язі поступово знижувався протягом всього досліджуваного періоду часу, починаючи з 10:00 і 14:00, причому о 18:00 і 22-й годині це зниження досягало максимальних величин (майже в 2,5 раза) порівняно з 6-ю годиною ранку.

Рівень експресії альтернативного сплайс-варіанту мРНК PFKFB-2, який мав делецією восьмого екзону, а також вставку між 9-м і 10-м екзонами, розміром 20 нуклеотидних залишків, у головному мозку та сім'яниках також змінювався протягом досліджуваного періоду часу: спочатку збільшувався (о 10-й та 14-й годині), а потім знижувався (о 18-й та 22-й годині) порівняно з 6-ю годиною ранку, причому зниження рівня його експресії у головному мозку було більш вираженим порівняно з сім'яниками (рис. 3).

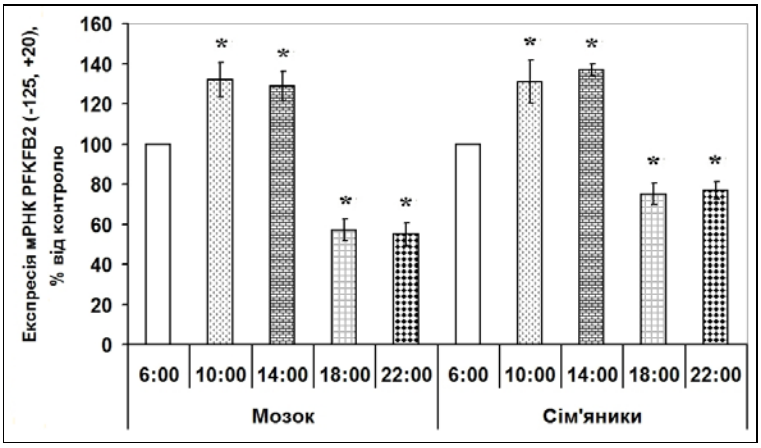


Рис. 3. Експресія альтернативного сплайс-варіанту мРНК 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-2 (PFKFB-2) із делецією восьмого екзону (-125) та вставкою між 9-м і 10-м екзонами (+20) [PFKFB2 (-125 і +20)] у головному мозку та сім'яниках з 6:00 до 22:00 з інтервалом в чотири години методом кількісної полімеразної реакції комплементарних ДНК

Таким чином, отримані результати свідчать про наявність певних тканино-специфічних добових змін у рівні експресії мРНК PFKFB-2 та її альтернативних сплайс-варіантів у щурів. Так, у легенях та серцевому м'язі порівняно з 6-ю годиною ранку спостерігається зниження рівня експресії мРНК PFKFB-2 протягом дня, але о 22-й годині у легенях відбувається повернення цього показника до рівня експресії о 6:00, а у серцевому м'язі залишається зниженим. Варто відзначити, що у серцевому м'язі рівень експресії мРНК PFKFB-2 та альтернативного сплайс-варіанту з делецією восьмого екзону змінюються протягом дня подібним чином, що мабуть вказує на важливість цього сплайс-варіанту для функціонування міокарду. Більше того, у головному мозку та сім'яниках щурів рівень експресії мРНК PFKFB-2 та її альтернативних сплайс-варіантів змінюється протягом дня по-різному, але в кожному із цих органів рівень експресії як PFKFB-2, так і її альтернативних сплайс-варіантів, змінюється синхронно і однонаправлено.

Висновки.

1. Встановлено, що рівень експресії мРНК PFKFB-2 у легенях та серцевому м'язі щурів порівняно з 6-ю годиною ранку знижується протягом дня, але о 22-й годині у легенях відбувається повернення цього показника до рівня експресії о 6:00, а у серцевому м'язі залишається зниженим.

2. Показано, що у головному мозку та сім'яниках щурів рівень експресії мРНК PFKFB-2 змінюється протягом дня порівняно з 6-ю годиною ранку по-різному: у сім'яниках спочатку збільшується, а в кінці дня та ввечері – суттєво знижується, в той час як у головному мозку збільшується лише о 14-й годині, а потім різко і короткочасно зменшується 18-й годині.

3. Встановлено, що у серцевому м'язі, головному мозку та сім'яниках рівень експресії мРНК альтернативного сплайс-варіанту PFKFB-2 з делецією восьмого екзону змінюються протягом дня подібно до основного варіанту.

4. Показано, що у сім'яниках рівень експресії мРНК альтернативного сплайс-варіанту PFKFB-2 з делецією восьмого екзону та вставкою між 9-м і 10-м екзонами змінюються протягом доби подібно до основного варіанту, а у головному мозку – спочатку збільшується, а в кінці дня та о 22:00 – суттєво знижується.

1. Gonze D., Goldbeter A. // Chaos. – 2006. – Vol. 16, N 2. – P. 026110 (1 – 11). 2. Harmer S.L., Panda S., Kay S.A. // Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. – 2001. – Vol. 17. – P. 215-253. 3. Tsinkalovsky O., Smaaland R., Rosenlund B. et al. // J. Biol. Rhythms. – 2007. – Vol. 22, N 2. – P. 140 – 150. 4. Motzkus D., Loumi S., Cadenas C. et al. // Chronobiol. Int. – 2007. – Vol. 24, N 5. – P. 783 – 792. 5. Pfeffer M., Muller C.M., Mordel J. et al. // J. Neurosci. – 2009. – Vol. 29, N 19. – P. 6114 – 6123. 6. Lee H., Chen R., Lee Y., Yoo S., Lee C. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2009. – Vol. 106, N 50. – P. 21359 – 21364. 7. Kovac J., Husse J., Oster H. // Mol. Cells. – 2009. – Vol. 28, N 2. – P. 75 – 80. 8. Turek F.W., Joshu C., Kohsaka A. et al. // Science. – 2005. – Vol. 308, N 5724. – P. 1043 – 1045. 9. Rudic R.D., McNamara P., Curtis A.M. et al. // PLoS Biol. – 2004. – Vol. 2, N 11. – P. E377. 170. Zhao B., Li L., Tumaneng K., Wang C.Y., Guan K.L. // Genes Dev. – 2010. – Vol. 24, N 1. – P. 72 – 85. 11. Chen S.T., Choo K.B., Hou M.F. et al. // Carcinogenesis. – 2005. – Vol. 26, N 7. – P. 1241 – 1246. 12. Lee C.C. // Methods Enzymol. – 2005. – Vol. 393. – P. 852 – 861. 13. Taniguchi H., Fernandez A.F., Setien F. et al. // Cancer Res. – 2009. – Vol. 69, N 21. – P. 8447 – 8454. 14. Woon P.Y., Kaisaki P.J., Braganca J. et al., Bihoreau M.T., Levy J.C., Farrall M., Gauguier D. Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (BMAL1) is associated with susceptibility to hypertension and type 2 diabetes // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2007. – Vol. 104, N 36. – P. 14412 – 14417. 15. Chen R., Schirmer A., Lee Y., Lee H. et al. // Mol. Cell. 2009. – 36, N 3. 417 – 430. 16. Sasaki M., Yoshitane H., Du N.H. et al. // J. Biol. Chem. – 2009. – Vol. 284, N 37. – P. 25149 – 25159. 17. Laposky A.D., Bass J., Kohsaka A., Turek F.W. // FEBS Lett. – 2008. – Vol. 582, N 1. – P. 142 – 151. 18. Mykhalchenko V.G., Tsuchihara K., Minchenko D.O. et al. // Biopolymers & Cell. – 2008. – 24, N 3. – P. 260 – 266. 19. Липова Н.М., Мінченко Д.О., Ратушна О.О. та інші // Укр. біохім. ж. – 2010. – 82, № 1, С. 90 – 99. 20. Minchenko O.H., Opentanova I.L., Minchenko D.O. et al. // FEBS Lett. –2004. – Vol. 576, N 1. – P. 14 – 20.

Надійшла до редколегії 20.12.10

УДК 612.821:612 82/.83
577.1

С. Федорчук, канд. біол. наук, Л.Чікіна, пров. інж.,
О. Мартинчук, пров. біол, Л. Криворучко, пров. біол.

ТЕМПЕРАТУРА ЛІВОЇ І ПРАВОЇ БАРАБАННОЇ ПЕРЕТИНКИ ПІД ЧАС ПСИХОФІЗІОЛОГІЧНОГО НАВАНТАЖЕННЯ

Досліджено зміни температури лівої і правої барабанної перетинки під час психофізіологічного навантаження у студентів. Виявлено, що психофізіологічне навантаження викликає зростання температури барабанної перетинки, більшою мірою правої ніж лівої, та зменшення асиметрії цих параметрів.

The changes of temperature of left and right eardrum during psychophysiological stress among students. Found that stress causes growth physiologycal eardrum temperature is much more right than the left, and reducing the asymmetry of these parameters.

Вступ. Натепер для визначення функціонального стану людини досліджуються як фізіологічні реакції (рухові, вегетативні, електроенцефалографічні), так і психофізіологічні характеристики [1]. Тепловий стан вважається одним із видів або модальностей функціонального стану людини, що характеризується вмістом та розподілом тепла у "ядрі" (глибоких шарах тіла людини) і "оболонці" (поверхневих шарах) та ступенем напруження механізмів терморегуляції [2]. Показником температури "ядра" тіла людини за результатами багатьох досліджень вважається температура зовнішнього слухового проходу та температура барабанної перетинки (БП) [3, 4], яка крім того використовувалась для оцінки функціонального стану краніального відділу вегетативної нервової системи [5].

Метою нашого дослідження було вивчення динаміки співвідношення температурних коливань, тобто асиметрії змін температури правої і лівої барабанної перетинки під час психофізіологічного навантаження у студентів.

Об'єкт та методи досліджень. В дослідженні як обстежені брали участь 36 осіб жіночої статі віком 18-20 років. Отримані дані склали вибірку, що не підкоряється закону нормального розподілу (помилка першого роду $\alpha < 0,01$). Статистичну обробку даних проводили за допомогою методів непараметричної статистики.

Було проведено дві серії досліджень: 1) контроль – 1.5-годинне перебування в експериментальній обстановці без виконання роботи; 2) експериментальне дослідження з психофізіологічним навантаженням.

Психофізіологічне тестування складалось з трьох етапів. Перший етап – оцінка швидкості простої сенсомоторної реакції і реакції вибору, функціонального рівня системи і коефіцієнту сили (I блок тестів), функціональної рухливості нервових процесів, реакції на рухомий об'єкт, короткочасної пам'яті [6]. Другий етап – виконання завдань на уявну ротацію простих і складних об'єктів з використанням функцій короткочасної пам'яті [7]. Третій етап – повторювання тестів першого етапу дослідження.

Вимірювання температури барабанної перетинки проводилось впродовж виконання психофізіологічних тестів і в контрольній групі (12 вимірів) за допомогою термометра з інфрачервоним випромінюванням, або "локатора випромінювань, чутливого до інфрачервоного променя", що вимірював випромінювання температури з барабанної перетинки через слуховий прохід.

Контрольну групу склали 10 осіб жіночої статі віком 18-20 років, студентки біологічного факультету.

Результати та їх обговорення. За результатами проведених досліджень температура барабанної перетинки змінювалася як в контрольній групі, так і під час психофізіологічного навантаження (таблиця 1, 2). В контрольній групі температура лівої барабанної перетинки (надалі – ТЛ) як зростала так і зменшувалася, але з меншою періодичністю, ніж температура правої БП (надалі – ТП) – достовірних змін температури правої БП зафіксовано майже удвічі більше за час проведеного спостереження (таблиця 3).

Таблиця **1. Температура правої і лівої барабанної перетинки в контрольній групі, Me [25%, 75%], n=10**

Показники	Температура правої барабанної перетинки (ТП)	Температура лівої барабанної перетинки (ТЛ)
Температура фонова I (T1)	35.60 [34.80, 36.10]	35.65 [35.30, 36.30]
Температура фонова II (T2)	35.60 [35.30, 36.40]	35.85 [35.40, 36.20]
Температура T3	35.80 [35.20, 36.10]	36.10 [35.40, 36.30]
Температура T4	35.70 [35.30, 36.00]	35.85 [35.70, 36.20]*
Температура T5	35.55 [35.30, 35.90]	35.70 [35.50, 36.00]
Температура T6	35.80 [35.50, 36.10]	36.00 [35.50, 36.20]
Температура T7	35.50 [35.30, 36.00]	35.80 [35.50, 36.10]*
Температура T8	35.80 [35.40, 36.10]	35.90 [35.80, 36.00]
Температура T9	35.70 [35.30, 35.90]	35.75 [35.40, 36.00]
Температура T10	35.75 [35.30, 36.00]	35.90 [35.50, 36.20]*
Температура T11	35.65 [35.40, 36.00]	35.75 [35.60, 36.30]*
Температура T12	35.75 [35.30, 36.20]	35.85 [35.60, 36.30]

Примітки: * – $p<0.05$, значущі різниці між відповідними показниками правої та лівої барабанної перетинки

Під час психофізіологічного тестування температура барабанної перетинки (ТЛ і ТП) зростала впродовж I і II етапів дослідження (рис.1, 2). Після виконання комплексу вправ на уявну ротацію (II етап дослідження) температурні показники значуще зменшились ($p<0.05$).

Температура ТЛ і ТП впродовж III етапу тестування майже не відрізнялась від фонової. На той час, як температура лівої БП не відрізнялась від фонової вже після 3-го тесту на уявну ротацію, тобто в кінці II етапу дослідження, температура правої БП почала зменшуватися тільки після повторного проходження психофізіологічних тестів I блоку, тобто впродовж III етапу дослідження.

При співставленні температури правої і лівої барабанної перетинки при психофізіологічному навантаженні (таблиця 2) і в контрольній групі (таблиця 1) за критерієм Мана-Вітні достовірна різниця між цими двома групами виявлена тільки для правої БП – це температурні показники після проходження III (найскладнішого) тесту на уявну ротацію (ТП9) і після повторного тестування РРО у III етапі дослідження (ТП11). В контрольній групі температура за цими показниками виявилася нижчою, ніж при психофізіологічному дослідженні.

Як зазначають деякі автори, саме при повторному тестуванні емоційні реакції могли бути повязані з задоволеністю або незадоволеністю результатами попереднього тестування і станом робочого напруження [8]. Тобто, можна припустити, що саме температура правої БП певною мірою пов'язана із емоційним станом обстежених і станом робочого напруження.

Таким чином, коливання температури БП відмічено як під час тестування, так і в контрольній групі. Але в контролі зміни температури лівої БП носили більш епізодичний характер, а правої БП – більш спонтанний характер у порівнянні з аналогічними змінами при проходженні обстеженими тестування. Більш виражена динаміка температури БП (як правої, так і лівої) спостерігалася під час психофізіологічного навантаження.

***Таблиця* 2. Температура правої і лівої барабанної перетинки у обстежених під час різних етапів психофізіологічного навантаження,Ме [25%, 75%], n=36**

Показники	Температура правої барабанної перетинки (ТП)	Температура лівої барабанної перетинки (ТЛ)
Температура фонова I (Т1)	36.10 [35.40, 36.50]	36.15 [35.60, 36.40]
Температура фонова II (Т2)	36.10 [35.70, 36.60]	36.20 [35.70, 36.55]
Температура I блоку I початкова (Т3)	36.20 [35.60, 36.55]	36.25 [35.80, 36.60]
Температура I після блоку I (Т4)	36.30 [35.80, 36.65]	36.25 [35.95, 36.70]
Температура I після тесту РРО (Т5)	36.25 [35.80, 36.50]	36.15 [35.85, 36.55]
Температура I після тестування пам'яті (Т6)	36.20 [35.80, 36.50]	36.30 [36.00, 36.55]*
Температура I після тесту на ротацію I (Т7)	36.30 [35.85, 36.50]	36.25 [35.90, 36.60]
Температура після тесту на ротацію II (Т8)	36.20 [35.70, 36.50]	36.30 [35.85, 36.60]*
Температура після тесту на ротацію III (Т9)	36.25 [35.90, 36.50]#	36.30 [35.85, 36.50]
Температура II після блоку I (Т10)	36.20 [35.70, 36.45]	36.05 [35.75, 36.40]
Температура II після тесту РРО (Т11)	36.25 [35.80, 36.50]#	36.15 [35.80, 36.30]
Температура II після тестування пам'яті (Т12)	36.30 [35.80, 36.40]	36.15 [35.70, 36.50]

Примітки: * – p<0.05, значущі різниці між відповідними показниками правої та лівої барабанної перетинки; # – p<0.05, значущі різниці між відповідними показниками при тестуванні і в контрольній групі

Щодо асиметрії вимірюваних температурних показників, слід зазначити, що як на початку тестування так і впродовж II етапу температура барабанної перетинки зліва була дещо вищою за абсолютними значеннями, ніж зправа, що співпадає з літературними даними і пояснюється анатомічним розташуванням серця [5]. Проте відмінності між температурними показниками ТЛ і ТП були значущими (таблиця 2) тільки після виконання тестування короткочасної пам'яті, тобто вкінці I етапу дослідження, і після другого тесту на уявну ротацію геометричних фігур (p<0,05).

В контрольній групі також температура лівої БП була вищою, ніж температура правої БП (таблиця 1), і ці відмінності проявились навіть в більшій мірі, ніж впродовж тестування. Тобто, при психофізіологічному навантаженні з певним емоційним напруженням ми спостерігали зменшення асиметрії температури правої і лівої барабанної перетинки.

Висновки. 1. Виявлено, що психофізіологічне навантаження з певним психоемоційним напруженням викликає зростання температури барабанної перетинки, більшою мірою правої, ніж лівої, та зменшення асиметрії цих параметрів. 2. Температура правої барабанної перетинки більшою мірою була пов'язана із емоційним станом обстежених і станом робочого напруження.

Таблиця 3. Зміни температури правої і лівої барабанної перетинки в контрольній групі за критерієм Вілкоксона

Температурні показники, що порівнювалися		Для правої барабанної перетинки (ТП), p-level	Для лівої барабанної перетинки (ТЛ), p-level
Температура Т1	Температура Т3	0.0446	-
Температура Т1	Температура Т4	-	0.0159
Температура Т1	Температура Т5	0.0414	-
Температура Т1	Температура Т6	0.0121	0.0468
Температура Т1	Температура Т8	0.0468	-
Температура Т1	Температура Т10	0.0494	-
Температура Т3	Температура Т6	0.0409	-
Температура Т4	Температура Т5	-	0.0253
Температура Т4	Температура Т9	-	0.0146
Температура Т5	Температура Т6	0.0058	-
Температура Т5	Температура Т8	0.0268	-
Температура Т6	Температура Т7	0.0238	-
Температура Т6	Температура Т9	0.0159	0.0309
Температура Т6	Температура Т11	0.0023	-

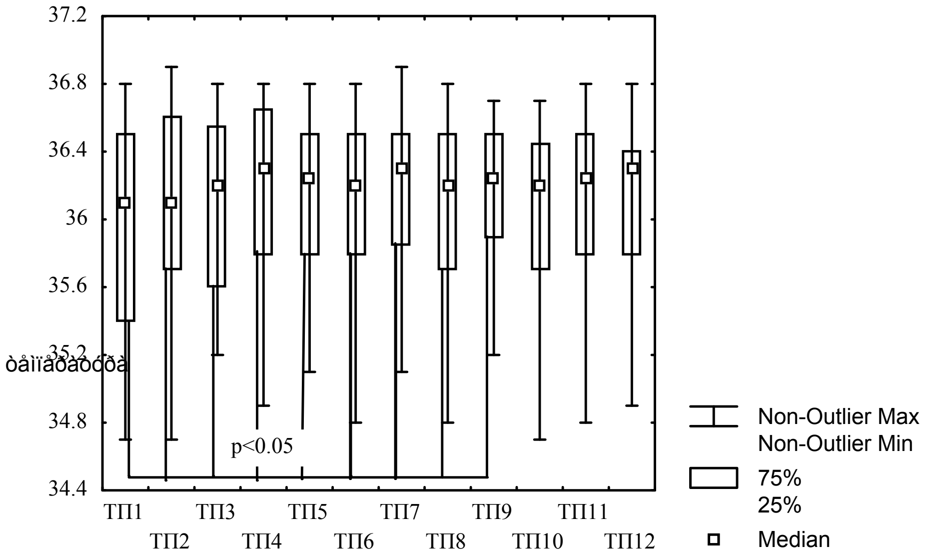


Рис. 1. Зміни температури правої барабанної перетинки під час психофізіологічного навантаження (n=36)

Примітки: ТП1 – температура фонова І; ТП2 – температура фонова ІІ; ТП3 – температура І блоку І початкова; ТП4 – температура І після блоку І; ТП5 – температура І після тесту РРО; ТП6 – температура І після тестування пам'яті; ТП7 – температура І після тесту на ротацію І; ТП8 – температура після тесту на ротацію ІІ; ТП9 – температура після тесту на ротацію ІІІ; ТП10 – температура ІІ після блоку І; ТП11 – температура ІІ після тесту РРО; ТП12 – температура ІІ після тестування пам'яті.

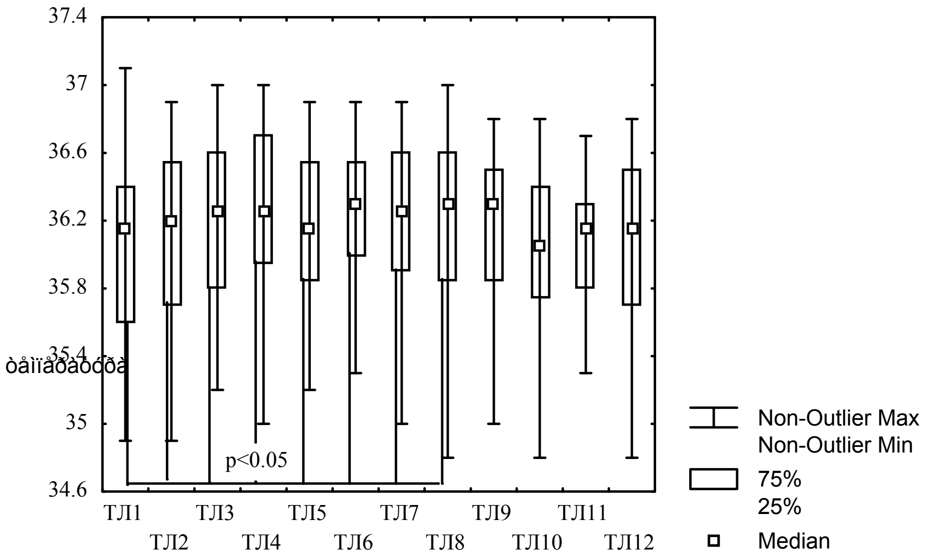


Рис. 2. Зміни температури лівої барабанної перетинки під час психофізіологічного навантаження (n=36)

Примітки: ТЛ1 – температура фонова І; ТЛ2 – температура фонова ІІ; ТЛ3 – температура І блоку І початкова; ТЛ4 – температура І після блоку І; ТЛ5 – температура І після тесту РРО; ТЛ6 – температура І після тестування пам'яті; ТЛ7 – температура І після тесту на ротацію І; ТЛ8 – температура після тесту на ротацію ІІ; ТЛ9 – температура після тесту на ротацію ІІІ; ТЛ10 – температура ІІ після блоку І; ТЛ11 – температура ІІ після тесту РРО; ТЛ12 – температура ІІ після тестування пам'яті.

1. Горго Ю.П., Чайченко Г.М. Основи психофізіології. Навчальний посібник, – Херсон: Персей, 2002. – 248 с.2. Максимович В.О., Солдак І.І., Горецький О.С. Контроль та поліпшення теплового стану людини. – Донецьк. – 1997. – 158 с.3. Dickey W.T., Warner Ahlgren E., Stephen C.R. Body temperature monitoring via the tympanic membrane // Surgery, 1970. V. 67. № 6. P. 981-984.4. Кощеев В.С., Кока А., Леон Г.Р., Максимов А.Л. Информативность температурных параметров различных зон тела человека для коррекции его теплового дисбаланса при выходе в открытое космическое пространство. // Физиология человека. – 2005. – Т.31. – № 6. – С. 78-86.5. Остапченко Л.І., Макарчук М.Ю., Мартинчук О.С., Криворучко Л.А., Чікіна Л.В., Крапивка П.І., Єрохов Р.А., Бровченко Н.С., Корчинський А.А. Факторний аналіз температури репрезентативних точок вегетативної нервової системи людини. Фізика живого. Т.15, №1, 2007. С.37-49. 6. Філімонова Н.Б. Комп'ютерна експрес-методика для вивчення психофізіологічного стану людини // Культура здоров'я. Збірник науково-методичних праць. Херсон. – 2000. – С. 204-209.7. Тернова Л.В., Чайченко Г.М., Горго Ю.П., Полянко І.В. Дослідження здатності людини до зорового розпізнавання образів різноорієнтованих у просторі // Вісник Черкаського державного університету. Актуальні проблеми фізіології. – 1998. – Вип. 2. – С.112-116.8. Федоров Б.М. Эмоции и сердечная деятельность. – М. Медицина. – 1977. – С.132-139.

Надійшла до редакції 15.09.10

УДК 591.147

М. Дзержинський, д-р біол.наук, Н. Бузинська, канд. біол. наук,
Л. Пазюк, канд. біол. наук

СТРЕСОРНА ВІДПОВІДЬ ЕПІФІЗА ПТАХІВ НА ТЛІ ВВЕДЕННЯ МЕЛАТОНІНУ І ОКСИТОЦИНУ

Екзогенний мелатонін при дії низьких температур, темряви, імунізації вірогідно збільшує розмір ядер пінеалоцитів, тоді як введення окситоцину посилює функцію епіфіза лише на тлі охолодження. Порівнюючи ефекти мелатоніну та окситоцину на характер стресорної відповіді епіфіза можна зробити висновок про більш виражений адаптаційний вплив мелатоніну при дії різних стресорів, що, імовірно, пояснюється одночасним впливом мелатоніну на нейроендокринну та імунну системи.

During low temperature, darkness or immunization exogenous melatonin significantly increases the size of pinealocytes nuclei while treatment with oxytocin enhances the function of epiphysis only under cooling. Compared the effects of melatonin and oxytocin on stress responses of epiphysis we can conclude that the adaptational effect of melatonin is more potent under various stressors. It could probably be explained by the simultaneous influence of melatonin on the neuroendocrine and immune systems.

Вступ. Доведено, що в пінеалоцитах епіфіза протягом ночі підвищується синтез гормону мелатоніну. При цьому рівень мелатоніну в крові змінюється циклічно як протягом доби, так і протягом року. Порушення секреції і рецепції мелатоніну стають причиною виникнення різних нейроімунологічних захворювань. Цей гормон за даними експериментальних і клінічних досліджень проявляє антистресорний і адаптаційний вплив, який пояснюють участю мелатоніну в координації та синхронізації нейроімунноендокринних процесів. Найвідоміші ефекти цього гормону пов'язані із забезпеченням циркадних ритмів всього організму та його впливом на нейромедіаторні системи мозку, а також із регуляцією активності гіпоталамо-гіпофізарно-ендокринної системи [1-5].

Слід зазначити, що між епіфізом і гіпоталамусом існують тісні морфо-функціональні зв'язки, зокрема з переднім гіпоталамусом. Нейросекреторні клітини СОЯ і ПВЯ переднього гіпоталамуса синтезують нонапептиди вазопресин і окситоцин, які також володіють широким спектром дії, зокрема проявляють адаптаційний вплив на реакцію щитовидної залози, наднирників і тимуса [6, 7]. Оскільки нонапептиди можуть потрапляти до ліквору III шлуночка мозку можна припустити їх прямий вплив на пінеалоцити епіфіза.

Об'єкт та методи досліджень. Досліди проводили на самцях курей (Gallus domesticus) кросу HyLine (Голландія) одномісячного віку. В якості стресора використовували охолодження, темряву та імунізацію.

Для моделювання холодового стресу тварин щодобово на 2 год. розміщували в індивідуальних контейнерах у морозильній шафі при температурі -18^0 С протягом 1 та 3-х діб, а для впливу темряви тварин утримували у темній кімнаті, де вікна були закриті чорними шторами. Імунізацію проводили розведеними еритроцитами людини другої групи крові (1:10). Серії з стресом порівнювали з інтактним контролем.

Піддослідні птахи на тлі охолодження або темряви (1 доба) отримували препарати окситоцину та мелатоніну.

Окситоцин – це нонапептидний гормон гіпоталамуса, який синтезується в крупноклітинних ядрах СОЯ та ПВЯ. Окрім добре відомого впливу окситоцину на непосмуговану мускулатуру та водно-сольовий обмін, існують дані про його дію на імунну систему [8]. Окситоцин вводили внутрішньом'язово в дозі 0,05 МО (міжнародних одиниць) на 100 г маси тіла піддослідної тварини.

Мелатонін – гормон, що продукується пінеалоцитами епіфіза. Він є похідним амінокислоти триптофану. Мелатонін має стимулюючий вплив на функцію імунної системи через свої рецептори на імунокомпетентних клітинах тимуса, селезінки та периферичних імунокомпетентних клітинах (лімфоцити, нейтрофіли). Припускають, що впливаючи одночасно на нейроендокринну та імунну системи мелатонін здійснює захист від стресу [1-5]. Мелатонін вводили перорально в дозі 50 мкг на на 100 г маси тіла піддослідної тварини.

Оскільки досліджувані гормони вводили піддослідним птахам у вигляді ін'єкцій та перорально, що є додатковим стресорним фактором, то контролем слугували птахи, які отримували ін'єкції фізіологічного розчину на тлі охолодження або темряви та для коректного порівняння результатів дослідів.

Під час проведення експерименту всіх птахів утримували в умовах одного віварію на стандартному харчовому раціоні. Птахів кожної серії досліду утримували в окремій клітці. Всіх піддослідних птахів (за винятком серій з темрявою) утримували при світловому режимі, який складався з 14 год. світлового періоду і 10 год. – темного періоду. Температура у віварії становила 22 – 24^0 С.

Наприкінці дослідів птахів усіх груп декапітували. Для морфологічних досліджень епіфіз фіксували у рідині Буена. Далі обробляли традиційними гістологічними методиками і виготовляли гістологічні препарати. Зрізи епіфіза завтовшки 5-6 мкм забарвлювали гематоксиліном Бьомера та еозином.

Про структурно-функціональні зміни в епіфізі свідчило вимірювання площі перерізу ядер пінеалоцитів в мкм^2.

Одержані гістологічні препарати всіх серій досліду аналізували на світловому мікроскопі. Мікрофотографії робили за допомогою установки System Microscope з відеокамерою Olympus BX 41 system, обладнаного цифровою фотокамерою Camedia C-5050 zoom і програмним забезпеченням Olympus DP 80 FT 3.2 на базі комп'ютера Pentium 4 з операційною системою Windows XP. Обробку мікрофотографій гістологічних препаратів отриманих на цифровому аналізаторі проводили за допомогою програми Medical Image Analyser (Version 1.0 (c) 2000 Powered by Ander).

Вірогідність різниці між морфометричними показниками контрольних та піддослідних груп птахів оцінювали за t-критерієм Стьюдента. Статистичну обробку здійснювали за допомогою програмного забезпечення STATISTICA for Windows 5.0.

Результати та їх обговорення. У роботі вивчено гістофізіологічна реакція пінеалоцитів епіфіза птахів на охолодження, темряву, імунізацію протягом 1 і 3 діб на тлі введення мелатоніну та окситоцину. За гістологічним аналізом паренхіма епіфіза курей (Gallus domesticus) кросу HyLine поділена на невеличкі часточки. За морфологією клітини часточок – пінеалоцити нагадують нейрони, вони мають короткі відростки, що закінчуються поблизу капілярів. Пінеалоцити знаходяться в оточенні нейроглії.

У контрольній серії з введенням інтактним птахам фізіологічного розчину паренхіма часточки складена переважно так званими "світлими" пінеалоцитами, що мають майже незабарвлену гомогенну цитоплазму з невеликою кількістю базофільних гранул. У цих клітинах виявляються крупні ядра з добре помітним ядерцем. Середній розмір площі перерізу цих ядер становить 25,75±0,45 мкм^2. Ближче до периферії часточок, знаходяться клітини меншого розміру з вузькою облямівкою цитоплазми, яка містить значну кількість базофільних гранул та гіперхромні ядра – це так звані "темні" пінеалоцити.

Така морфологічна структура епіфіза відповідає помірній секреторній активності.

***Таблиця* 1. Зміни розмірів ядер пінеалоцитів у різних серіях досліду і**

N	Серії досліду	Площа поперечного перерізу ядер пінеалоцитів, мкм^2
1	Контроль (фізіологічний розчин)	25,75±0,45
2	Мелатонін	22,61±0,45*
3	Окситоцин	26,00±0,41
4	Імунізація	21,79±0,54*

Примітка: * – різниця між дослідними групами та контролем вірогідна при Р<0,05

Спочатку, на першому етапі роботи, нами було проаналізовано вплив на функціональний стан пінеалоцитів епіфізу введення власне гормонів. Так при введенні нестресованим тваринам мелатоніну порівняно з введенням у контрольній групі фізіологічного розчину виявлено достовірне зменшення розміру ядер пінеалоцитів, що пояснюється дією механізмів негативних зворотних зв'язків. Площа перерізу клітинних ядер вірогідно зменшувалась і дорівнювала 22,61±0,45 мкм^2. Цитоплазма пінеалоцитів була збагачена секреторними гранулами, а ядра відтиснуті на периферію до відростків, що говорить про збільшення кількості секреторної субстанції та зниженню синтетичних процесів (табл. 1).

Введення піддослідним птахам окситоцину (табл. 1) не змінює площу перерізу клітинних ядер (26,00± 0,41 мкм^2). На відміну від контрольних пінеалоцитів цитоплазма "світлих" пінеалоцитів цієї серії візуально виглядала ще більш прозорою з дрібними гранулами.

На другому етапі роботи ми вивчали реакцію пінеалоцитів на дію різних стресорів. Якщо птахів піддавали стресу у вигляді імунізації, це призводить до пригнічення функціональної активності пінеалоцитів епіфіза (табл. 1). Наші спостереження виявили різке зменшення площі перерізу клітинних ядер пінеалоцитів до 21,79±0,54 мкм^2. При цьому різниця між імунізацією і контролем є вірогідною. У складі часточок епіфіза (ближче до периферії) зустрічаються переважно дрібні "темні" пінеалоцити з маленьким ядрами і заповненою гранулами цитоплазмою. Виявлені зміни дають можливість припустити, що секреторна активність епіфіза птахів цієї серії знижена, що відповідає характерним морфологічним проявам стресорної реакції.

Під впливом такого стресора як охолодження у піддослідних птахів відбувається також виражене гальмування функціональної активності пінеалоцитів епіфіза. Так одноразове охолодження викликає вірогідне зменшення площі перерізу клітинних ядер пінеалоцитів, яка складає 24,32±0,30 мкм^2. До того ж ще більш знижується активність пінеалоцитів птахів, яких охолоджували протягом 3 діб. Площа перерізу ядер цих клітин становила відповідно 21,23±0,34 мкм^2. Цитоплазма пінеалоцитів при 1 і 3-добовому охолодженні стає різко базофільною через високу концентрацію секреторних гранул у ній. Одержані дані говорять про пригнічення секреторної активності епіфізу (рис. 1).

Аналогічний вплив на функціональний стан епіфізу має також повна темрява (рис. 2), особливо на 3 день досліду. У паренхімі епіфіза з'являється значна кількість клітин, цитоплазма яких заповнена секреторними гранулами, тобто за своїми особливостями вони наближаються до "темних" пінеалоцитів. Ядра також були темнозабарвлені, ядерця в них виявлені нечітко. Розмір перерізу клітинних ядер за умови 3-добової темряви становив відповідно 23,00±0,42 мкм^2. Натомість після однодобового утримання піддослідних птахів у темряві не викликало таких чітких змін у структурі пінеалоцитів. Розмір перерізу клітинних ядер та концентрація гранул у цитоплазмі у цих птахів майже не відрізняється від контролю та становили 25,07±0,13 мкм^2 (рис.2).

Загалом можна зазначити, що всі види стресу мали негативний неспецифічний вплив на відповідь пінеалоцитів епіфізу, що відповідає стадії реакції тривоги за Г. Сельє. Морфо-фізіологічними ознаками такої відповіді стало зниження секреції, накопичення гранул у цитоплазмі пінеалоцитів, зменшення розмірів ядер і відповідно синтетичної активності.

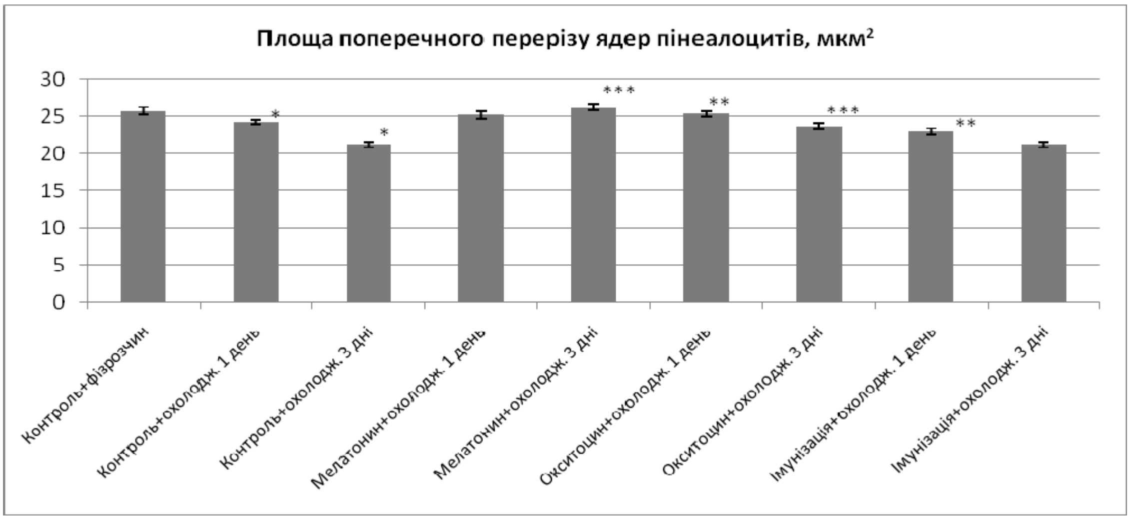


Рис. 1. Зміни розмірів ядер пінеалоцитів у різних серіях досліду при охолодженні.

Примітка: * – різниця між піддослідними серіями і контролем (фізіологічний розчин) вірогідна при Р<0,05; ** різниця між піддослідними серіями і контролем+охолодження 1 доба вірогідна при Р<0,05; *** – різниця між піддослідними серіями і контролем+охолодження 3 доби вірогідна при Р<0,05.

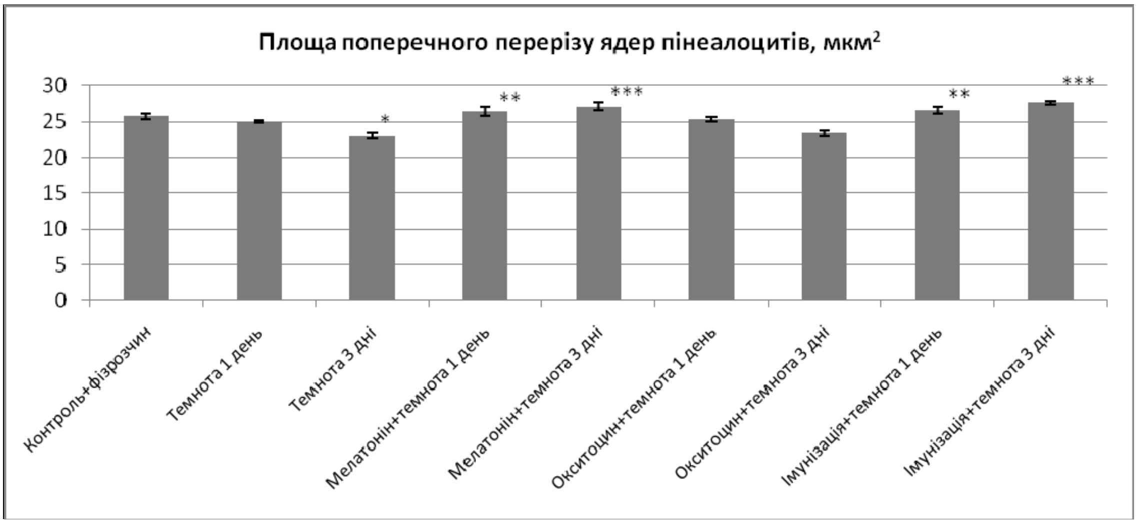


Рис. 2. Зміни розмірів ядер пінеалоцитів у різних серіях досліду при темряві.

Примітка: * – різниця між піддослідними серіями і контролем (фізіологічний розчин) вірогідна при P<0,05; ** різниця між піддослідними серіями і контролем+темрява 1 доба вірогідна при P<0,05; *** – різниця між піддослідними серіями і контролем+темрява 3 доби вірогідна при P<0,05.

На третьому етапі досліджень ми вивчали характер стресорної відповіді пінеалоцитів на введення гормонів. Якщо на тлі охолодження або повної темряви вводили мелатонін, нами виявлено спростування негативного впливу стресу під впливом мелатоніну. Про це свідчили вірогідне збільшення площі перерізу клітинних ядер у птахів цих серій (рис. 1, 2), відповідно тільки на 3 добу при охолодженні та на 1 і 3 добу при темряві. На гістологічних препаратах паренхіму часточок епіфіза складали так звані "світлі" пінеалоцити з крупними ядрами, прозорою цитоплазмою, що свідчить про активацію процесів синтезу та виведення відповідних гормонів.

Отже одержані дані вказують на позитивний вплив мелатоніну на відповідь пінеалоцитів при стресі і підтверджують висновки про антистресорний вплив мелатоніну на реакцію епіфіза, що, в свою чергу, узгоджуються з даними інших авторів про його адаптаційний вплив мелатоніну на різні органи.

Гістофізіологічний аналіз результатів інших серій досліду з введенням стресованим птахам окситоцину показав, що на тлі одноразового охолодження птахів і введення окситоцину нами отримано позитивний ефект. Це проявляється у вірогідному збільшенні розміру ядер, що є морфологічним еквівалентом посилення функції пінеалоцитів (рис. 1). Цитоплазма пінеалоцитів помірно заповнена секретом, ядра чіткі круглясті з ядерцями. Відповідно на 1 добу охолодження на тлі введення окситоцину площа перерізу клітинних ядер епіфіза збільшується до 25,40±0,35 мкм^2 і на 3 добу – до 23,70±0,44 мкм^2 порівняно з параметрами птахів, що слугували контрольною серією (охолодження з введенням фізіологічного розчину).

Як зазначено вище дія темряви на 1 і 3 добу викликає зменшення функціональної активності пінеалоцитів епіфіза. За цих умов введення мелатоніну було достатньо ефективним. Навпаки введення окситоцину не виявило вагомих результатів. Морфологія клітин при дії темряви на тлі введення окситоцину співпадає з такою при дії власне стресу, тобто темряви. Площа перерізу ядер пінеалоцитів у птахів при однодобовому утриманні в темряві дорівнює 25,30±0,32 мкм^2, а при триденному 23,40±0,43 мкм^2, тобто залишається на рівні контрольних значень.

Отже поєднання темряви з введенням окситоцину не викликало достовірних змін досліджуваних морфометричних показників. Якщо порівняти введення окситоцину на тлі охолодження з введенням на тлі темряви, можна зробити висновок про адаптаційний вплив окситоцину на функцію епіфізу при дії на організм лише низьких температур.

До того ж нами отримано дані про те, що імунізація птахів у поєднання з темрявою виявилася ефективною для посилення синтетичних процесів у пінеалоцитів. У цитоплазмі пінеалоцитів цієї серії досліду зменшується щільність заповнення її гранулами секрету, в окремих часточках епіфізу секрет виведений майже цілком. Клітинні ядра світлі, бульбашкоподібні, з добре означеними крупними ядерцями. Площа перерізу клітинних ядер на 1 добу вірогідно збільшується до 26,59±0,52 мкм^2 по відношенню. При триденному затемненні відбувається подальше збільшення цього показнику до 27,68±0,23 мкм^2 (рис. 2).

Навпаки у птахів, яких на тлі імунізації піддавали охолодженню, виявлено вірогідне зниження активності пінеалоцитів, особливо на 1 добу. Площа перерізу ядер пінеалоцитів становить 22,94±0,45 мкм^2 на 1 добу і 21,24±0,35 мкм^2 на 3 добу (рис. 1). Поєднання цих двох стресорів має хоча негативний характер на функцію пінеалоцитів, але не посилюючи один одного.

Висновки. При введенні тваринам екзогенного мелатоніну (в дозі 50 мкг/100 г маси тіла) на 3 добу охолодження вірогідно збільшується розмір ядер пінеалоцитів, тоді як при утриманні тварин у повній темряви адаптаційний вплив мелатоніну проявляється вже на 1 добу. До того ж негативний вплив імунізації тварин також нівелюється на тлі повної темряви, починаючи з 1 доби, коли посилюється секреція власного ендогенного мелатоніну. Отже одержані дані підтверджують висновки про антистресорний вплив мелатоніну на реакцію епіфіза. Навпаки введення нестресованим тваринам мелатоніну порівняно з введенням фізіологічного розчину викликало достовірне зменшення розміру ядер пінеалоцитів, що пояснюється механізмами негативних зворотних зв'язків. У серії дослідів з введенням птахам окситоцину (в дозі 0,05 МО/100 г маси тіла) нами показано, що порівняно з контрольною групою (фізіологічний розчин) він не мав впливу на функції клітин епіфіза. Але на тлі охолодження як на 1 добу, так і на 3 добу одержано позитивні результати, які проявлялися у вірогідному збільшенні розміру ядер, що є морфологічним еквівалентом посилення функції пінеалоцитів. При цьому поєднання темряви з введенням окситоцину не виклало змін досліджуваних морфометричних показників. Наведені результати свідчать про адаптаційний вплив окситоцину на функцію епіфіза лише при дії на організм низьких температур.

Порівнюючи ефекти мелатоніну та окситоцину на характер стресорної відповіді епіфіза можна зробити висновок про більш виражений адаптаційний вплив мелатоніну при дії різних стресорів, що, імовірно, пояснюється одночасним впливом мелатоніну на нейроендокринну та імунну системи.

1. Bailey M.J. , Beremand P.D. , Hammer R., Bell-Pedersen D., Thomas T.L., Cassone V.M. Transcriptional Profiling of the Chick Pineal Gland, a Photoreceptive Circadian Oscillator and Pacemaker // Molecular Endocrinology. – 2003. Vol. 17, N 10. – P. 2084 – 2095. 2.Moore C. B., Siopes T. D., Steele C. T., Underwood H. Pineal melatonin secretion, but not ocular melatonin secretion, is sufficient to maintain normal immune responses in Japanese quail (Coturnix coturnix japonica) // General and Comparative Endocrinology. – 2002. – Vol. 126, N 3. – P. 352 – 358. 3. Siopes T.D., Underwood H.A. Diurnal variation in the cellular and humoral immune responses of Japanese quail: Role of melatonin // General and Comparative Endocrinology. – 2008. – Vol. 158, N 15. – P. 245 – 249. 4. Dupre S.M. , Burt D.W. , Talbot R., Downing A. , Mouzaki D., Waddington D., Malpaux B. , DavisJ. R. E., Lincoln G. A., Loudon A. S. I. Identification of Melatonin-Regulated Genes in the Ovine Pituitary Pars Tuberalis, a Target Site for Seasonal Hormone Control // Endocrinology. – 2008. – 149, 11. – P. 5527 – 5539. 5.Froy O. Metabolism and Circadian Rhythms–Implications for Obesity // Endocr. Rev. – 2010. – Vol. 31. – N. 1. – P. 1- 24. 6. Пазюк Л.М., Олексієнко Н.В., Дзержинський М.Е., Бузинська Н.О., Палілова О.В., Преображенська У. В. Адаптаційний вплив нонапептидів гіпоталамуса на реакцію тимуса та гіпофізарно-тиреоїдної системи птахів при хронічному охолодженні // Вісник Білоцерківського державного аграрного університету. – 2007. – Вип. 47. – С. 20 – 24. 7. Дзержинський М.Е., Пазюк Л.М., Бузинська Н.О., Олексієнко Н.В., Рослова Н.В. Адаптаційний вплив окситоцину та мелатоніну на реакцію бурси Фабриціуса птахів на тлі холодового стресу і темряви // Вісник КНУ. Біологія. – 2010. – Вип.56. – С. 19 – 21. 8.Кузник Б.И,.Патеюк А.В, Джулай М.А., Данилишин Б.Ю., Чипизубова Н.С. Влияние цитомединов из передней и задней долей гипофиза на иммунитет и гемостаз у гипофизэктомированных цыплят // Иммунология. – 2005. — Т. 26. – С. 287 – 292.

Надійшла до редколегії 02.02.11

УДК 577.128:504.7

Б. Цудзевич, д-р біол. наук, І. Калінін, докторант

АКТИВНІСТЬ ГЛУТАТІОНЗАЛЕЖНИХ ФЕРМЕНТІВ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ІНТОКСИКАЦІЇ ВАЖКИМИ МЕТАЛАМИ

В роботі наведено дані експериментальних досліджень щодо впливу міді сульфату і кадмію сульфату на активність глутатіонзалежних ферментів крові інтоксикованих щурів.

The data of researches influence of copper sulfate and cadmium sulfate on activity of glutathione-dependent enzymes of blood of poisoned rats are shown in this article.

Вступ. Масштаби сучасних техногенних забруднень в результаті діяльності людини в даний час переважають над потенціалом біосферної екосистеми і створюють реальну загрозу для здоров'я людини і тварин. Кожного року в навколишнє середовище викидається велика кількість ксенобіотиків, забруднювачів, серед яких значне місце належить важким металам. Останні є високотоксичними і небезпечними для життєдіяльності живих організмів і спричиняють негативний вплив на метаболічні процеси. Перелік важких металів в більшості співпадає з групою мікроелементів, що в деякій мірі ускладнює вивчення впливу важких металів на біохімічні процеси.

Проблема вивчення впливу на організм людини і тварин ксенобіотиків залишається однією із найважливіших для людства. В метаболізмі ксенобіотиків задіяно більше 30 ключових ферментів, що забезпечують перебіг двох фаз: 1) модифікацію, завдяки якій створюються або вивільняються функціональні групи шляхом окиснення чи (рідше) відновлення, та 2) кон'югацію – приєднання до проміжних метаболітів ендогенних молекул, таких як глутатіон [1-2].

Система знешкодження ксенобіотиків за участю глутатіону є найбільш важливим механізмом захисту клітини. Відновлений глутатіон має вільну SH-групу, яка є сильним нуклеофілом і здатна зв'язувати електрофіли, тоді як його гідрофобні центри можуть нековалентно з'єднуватись з ліпофільними сполуками (фізична взаємодія), що запобігає їх зануренню в ліпідний шар мембран – тому глутатіон іноді називають внутрішньоклітинним альбуміном.

При кон'югації ксенобіотиків з глутатіоном утворюються тіоефіри, котрі потім перетворюються на меркаптурати. Більшість кон'югатів реакційно-інертні та гідрофільні, отож, нетоксичні і легко елімінуються з організму.

Кон'югацію глутатіону з ксенобіотиками каталізують ферменти γ-глутатіонтрансферази [КФ 2.5.1.18], що широко представлені в клітинах [3] і відіграють найбільш важливу роль в антиоксидантному захисті за дії важких металів. Вони є посередником у нуклеофільній атаці відновленого глутатіону на електрофільні зони ксенобіотиків з утворенням нетоксичних гідроксильних кон'югатів.

Глутатіон також захищає клітину від токсичної дії пероксиду водню. Ця реакція здійснюється за допомогою іншого ферменту –глутатіонпероксидази [КФ 1.11.1.9] [4].

Метою нашої роботи було дослідження вмісту відновленого глутатіону та активності ферментів крові щурів при отруєнні важкими металами.

Об'єкти та методи досліджень. Досліди проводили на білих нелінійних щурах-самцях, одного віку, масою 180-200 г., впродовж 14 діб, відповідно до конвенції Ради Європи щодо захисту хребетних тварин, яких використовують у наукових цілях. Тварини були розділені на три групи: перша – інтактні (контроль), друга – тваринам перорально вводили розчин міді сульфату в дозі 1/10 від $ЛД_{50}$, третя – тваринам перорально вводили розчин кадмію сульфату в дозі 1/30 від $ЛД_{50}$. Вміст відновленого глутатіону визначали за накопиченням продукту реакції з дітіобіснітробензойною кислотою (реактив Елмана) з вільними SH-групами [5]. Активність глутатіонпероксидази (ГП) [КФ 1.11.1.9] визначали за накопиченням окисненого глутатіону [6]. Активність глутатіон-S-трансферази (ГТ) [КФ 2.5.1.18] визначали за накопиченням кон'югату [7]. Експериментальні дані оброблялись загальноприйнятими методами статистики з використанням критерію Ст'юдента [8].

Результати та їх обговорення. Результати власних досліджень вмісту відновленого глутатіону (GSH), активності ГП і ГТ в сироватці крові щурів представлено в таблиці 1.

Таблиця **1. Відновлений глутатіон та активність глутатіонпероксидази і глутатіонтрансферази сироватки крові щурів при отруєнні міді сульфатом і кадмію сульфатом (M±m, n=8)**

Досліджуваний показник	Групи тварин		
	Інтактні	Отруєні $CuSO_4$	Отруєні $CdSO_4$
Відновлений глутатіон, ммоль/л	0,379±0,04	0,294±0,03*	0,252±0,02*
Глутатіонпероксидаза, ммоль/хв·л	0,273±0,12	0,214±0,11*	0,170±0,09*
Глутатіонтрансфераза, ммоль/хв·л	68,0±4,71	35,7±3,68*	27,4±2,90*

Примітка: * – дані вірогідні (p≤0,05) у порівнянні з інтактними щурами.

Слід зазначити, що отруєння щурів міддю сірчанокислою та кадмієм сірчанокислим призводить до зниження вмісту (GSH) сироватки крові щурів на 28% і 50% відповідно, по відношенню до інтактних тварин. За таких умов знижується і активність ГП – на 27% при отруєнні міддю сірчанокислою та на 50% при отруєнні кадмію сульфатом, відносно контрольної групи тварин. Активність ГТ знижується майже в 2 рази при отруєнні міддю та в 2, 5 рази – кадмію, у порівнянні з інтактною групою.

Таким чином, активність ферментів та вміст відновленого глутатіону піддаються більш суттєвим змінам за дії кадмію сульфату. Отримані результати, можуть вказувати на зниження функціональної активності антиоксидантної системи захисту організму, а знання метаболічних перетворень у механізмах детоксикації важких металів в організмі дозволить намітити напрями пошуків нових засобів для контролю, регулювання та стимуляції реакцій адаптації, компенсації і елімінації останніх з організму.

1. Пирузян Л.А., Суханов В.А., Саприн В.А. Прогностический фактор риска развития патологических процессов, основанный на полиморфизме ферментов метаболизма ксенобиотиков // Физиология человека. – 2000. – Т.26, №2. – С. 115-123. 2.Wickens A.P. Ageing and the free radical theory // Respir. Physiol. – 2001. – Vol.128, №3. – P. 379-391. 3. Habig W.H. Glutathione-S-transferases. The first enzymes step mercapturic acid formaticon / W.H.Habig, M.J.Pabst, W.B.Jacoby // J.Biol. Chem. – 1994. – V. 249. – Issue 22. – P. 7130-7139. 4.Коржов В. И., Жадан В. Н., Коржов М. В. Роль системы глутатиона в процессах детоксикации и антиоксидантной защиты // Журнал АМН України, 2007. – №1. – Т. 13. – С. 3-20. 5. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups// Arch. Biochem. Biophys. – 1959. – V. 82, N1. – P. 70-77. 6. Mannervik B. Glutathione peroxidase // Methods in enzymology. Acad. Press.-1985. – Vol. 113. – P. 490-495. 7.Власова С.Н., Шабунина Е.И., Переслегина А.И. Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей // Лаб. Дело. – 1990. – № 8. – С. 19-21. 8. Кучеренко М.Є., Бабенюк Ю.Д., Войціцький В.М. Сучасні методи біохімічних досліджень. - К.: Фітосоціоцентр, 2001. – С. 109-152.

Надійшла до редколегії 10.03.11

УДК 612.179.2

Я. Ткаченко, мол. наук співроб., Л. Яковенко, канд. біол. наук, В. Жовнір, канд. мед. наук, К. Часовський, мол. наук співроб., О. Федевич, мол. наук співроб., Л. Капустян, канд. біол. наук, А. Саламаніна, Г. Воробйова, д-р мед. наук, проф, Л. Сидорик, канд. біол. наук, І. Ємець, д-р мед. наук

АНТИ-HSP60 АНТИТІЛА У НОВОНАРОДЖЕНИХ ЗІ СКЛАДНИМИ ВРОДЖЕНИМИ ВАДАМИ СЕРЦЯ ПРИ ЗАСТОСУВАННІ КОМПОНЕНТІВ ПУПОВИННОЇ ТА ДОНОРСЬКОЇ КРОВІ

Досліджено особливості анти-Hsp60 імунореактивності у новонароджених зі складними ВВС при застосуванні компонентів пуповинної та донорської крові під час радикальної корекції вади. У післяопераційному періоді анти-Hsp60 позитивні сироватки детектувались лише у групі пацієнтів, яким переливали компоненти донорської крові, у цих пацієнтів спостерігались різного типу ускладнення. Зміни сироваткових рівнів анти-Hsp60 антитіл у пацієнтів зі складними ВВС можуть бути додатковим маркером безпечності та ефективності використання пуповинної крові у неонатальній кардіохірургії.

The levels of anti-Hsp60 antibodies in newborns were identified using autologic umbilical cord blood (AUCB) or donor blood components transfusion after heart cardiac surgery. Patients bearing the high levels of anti-Hsp60 antibodies were detected only in group of patients with transfusion of allogenic donor blood. Such patients have had the postoperative complications. We proposed to use the changes of anti-Hsp60 antibodies's levels as a marker of safety and effectivity of AUCB transfusion in neonatal cardiac surgery.

Вступ. В Україні щороку народжується близько 5 тисяч дітей з вродженими вадами серця (ВВС) [2]. Хірургічне лікування складних ВВС з використанням апарату штучного кровообігу (АШК) потребує застосування гомологічної еритроцитарної маси та плазми. Трансфузія новонародженим компонентів крові дорослого донора пов'язана з суттєвим ризиком. Це, насамперед, ймовірність передачі трансмісивних інфекцій, розвиток імунологічних ускладнень, що можуть зумовлювати, зокрема, гостру ниркову недостатність, гостре ураження легенів, тощо [8]. Аутологічна пуповинна кров є альтернативним джерелом еритроцитарної маси та плазми крові у кардіохірургії неонатального періоду [4,5]. Відкритими залишаються питання щодо безпечності та ефективності її застосування у новонароджених зі складними ВВС.

Останнім часом приділяється велика увага дослідженню ролі молекулярних шаперонів, зокрема, білку теплового шоку 60 (heat shock protein 60, Hsp60) та антитіл до нього у патогенезі різних захворювань, у тому числі серцево-судинних [10,16,19]. Hsp60 – молекулярний шаперон, основним компартментом якого є мітохондрії, де він забезпечує правильне згортання мітохондріальних білків. Частина Hsp60 за нормальних умов також виявляється у цитоплазмі, де він виконує антиапоптичну функцію [12, 13]. На клітинній поверхні кардіоміоцитів Hsp60 експресується лише після дії стресових факторів, у тому числі при гіпоксії [12] та хірургічному втручанні [17, 20]. На культурі неонатальних кардіоміоцитів було показано, що Hsp60 може секретуватися у позаклітинний простір екзосомальним шляхом, причому за стресових умов цей процес посилюється [14]. Підвищена експресія Hsp60 на мембрані кардіоміоцитів, а також його наявність у позаклітинному просторі може провокувати вироблення автоантитіл до нього [9]. З іншого боку, поверхнево-експресований Hsp60, а також позаклітинний ендогенний Hsp60 може представляти потенційну мішень для антитіл до мікробних Hsp60, які є перехресно-реактивними [18]. Такі антитіла здатні опосередковувати комплемент-залежну цитотоксичність, зумовлювати лізис або апоптоз клітин, що експресують на своїй поверхні ендогенний Hsp60. Вони також здатні зв'язувати циркулюючий у плазмі крові ендогенний Hsp60 і утворювати імунні комплекси з патологічним впливом на клітини та тканини [7]. Експериментально було показано, що моноклональні антитіла до Hsp60 підсилювали запальні реакції, індуковані екстрацелюлярним Hsp60 [24]. Встановлено зв'язок між наявністю у доопераційний період циркулюючих анти-Hsp60 антитіл у дорослих пацієнтів з операціями на серці та розвитком у післяопераційному періоді фібриляції передсердя (atrial fibrillation) [17]. З огляду на вищесказане, ми припустили, що рівні анти-Hsp60 антитіл у сироватці крові пацієнтів можуть бути можливим маркером безпечності використання пуповинної крові при хірургічному лікуванні новонароджених зі складними ВВС. Метою даної роботи було дослідження особливостей анти-Hsp60 імунореактивності у новонароджених зі складними ВВС при застосуванні компонентів пуповинної та донорської крові під час радикальної корекції вади.

Матеріали та методи досліджень. *Пацієнти:* новонароджені з транспозицією магістральних судин, яким проводили хірургічне лікування з використанням АШК були розподілені на 2 групи. 1 група – 9 новонароджених, при хірургічному лікуванні застосовували компоненти аутологічної пуповинної крові, діагноз встановлено пренатально, операція проводилась у перші 2-6 годин після народження; 2 група – 11 новонароджених, при хірургічному лікуванні використовували компоненти крові дорослих донорів, діагноз встановлено постнатально, операція проводилась через 1-2 тижні після народження. Контрольну групу склали 20 клінічно здорових новонароджених.

Визначення рівнів лактату, гемоглобіну (загального та фетального), розрахунок гематокриту проводили на аналізаторі газів електролітів метаболітів фірми RADIOMETER ABL735 (Данія).

Рівень анти-Hsp60 антитіл визначали методом ELISA з модифікаціями [11]. Як антиген використовували рекомбінантний білок GroEl *E.coli* (прокаріотний гомолог Hsp60 людини). Одержання та очистку рекомбінантного білка GroEl *E.coli* проводили за розробленою методикою [1]. Раніше експериментально було показано, що поліклональні афінно-очищені антитіла до рекомбінантного білка GroEl *E.coli* (прокаріотний гомолог еукаріотного Hsp60) розпізнавали ендогенний Hsp60 людини [1]. Цей факт, а також дані літератури щодо високого ступеню гомології білків родини Hsp60 (GroEl *E.coli* має 52% ідентичності на рівні амінокислотних послідовностей для Hsp60 людини [6], основні антигенні епітопи для анти-Hsp60 антитіл людини також представлено на GroEl *E.coli* [15]) склали основу для використання GroEl *E.coli* як антигену при дослідженні рівня антитіл до нього у новонароджених.

Застосовували наступні модифікації методу ELISA. Антиген (10 мкг/мл) протягом ночі інкубували в лунках полістирольного 96-лункового планшету при 4°С. У контрольні лунки вносили розчин BSA (10 мкг/мл). Для попередження неспецифічного зв'язування білків сироватки крові з адсорбованим білком та пластиком використовували розчин PBS з 0,1% твін-20 (PBS-т). Сироватки крові новонароджених вносили у лунки планшету з адсорбованим антигеном (у 2-х повторах) та інкубували протягом 1,5 год. при 37°С та 18 год. при 4°С. Зв'язування специфічних анти-Hsp60 антитіл з антигеном детектували за допомогою вторинних антитіл кроля проти IgG людини, мічених пероксидазою хрону ("Promega", США). Для візуалізації результатів реакції використовували субстрат для пероксидази хрону ABTC (фірма Sigma, США) у концентрації 0,5 мкг/мл в 50 мМ цитратного буферу, pH 5,0 з 0,05%-ним концентрованим перекисом водню, оптичну густину вимірювали при довжині хвилі 405 нм на спектрофотометрі "Multiscan" ("Titertek" Великобританія). Визначали середнє значення оптичної густини 2-х повторів кожної сироватки (за умови, якщо відмінність між повторами не перевищувала 15%). Як позитивний контроль використовували одержані нами поліклональні антитіла до GroEl *E.coli*, як негативний контроль – сироватки клінічно здорових донорів. Антитілопозитивною вважали сироватку, оптична густина якої у розведенні 1:100 перевищувала середнє значення оптичної густини сироваток здорових новонароджених (при тому ж розведенні) на 2 стандартних відхилення (m+2sd). Всі досліджувані сироватки було проскриновано на наявність анти-Hsp60 антитіл одночасно.

Статистичну обробку результатів досліджень здійснювали за допомогою пакету програм STATISTICA 6.0 (Stat-Soft, 2001, США). Результати представлено у вигляді середніх значень (m) з вказівкою на стандартне відхилення (sd). Для порівняння середніх значень досліджуваних груп використовували U-критерій Манна-Уітні (Mann-Whitney U-test).

Коефіцієнт взаємного спряження (статистичний параметр, що характеризує сукупності з якісною класифікацією) визначали за формулою:

$$K=[(n_{11} \times n_{12} - n_{12} \times n_{21}) - N/2]/\sqrt{n_{1*} \times n_{2*} \times n_{*1} \times n_{*2}} \quad [3]$$

Результати досліджень та їх обговорення. Післяопераційні клінічні характеристики пацієнтів зі складними ВВС представлено у Таблиці 1.

***Таблиця* 1. Післяопераційні клінічні характеристики новонароджених зі складними вродженими вадами серця**

Показник	**Перша группа** (n=9)	**Друга група** (n=11)
Штучна вентиляція легенів (год.)	61,44±35,19 [25-143]	62,0±26,38 [24-93]
Перебування в реанімації (дні)	7,11±3,25 [4-14]	7,75±3,53 [5-16]
Перебування в стаціонарі (дні)	15,6±4,93 [9-21]	21,0±4,2 [9-27]
Перебування в стаціонарі після операції (дні)	15,6±4,93 [9-21]	18,44±4,49 [10-25]

***Таблиця* 2. Рівні лактату, гематокриту та гемоглобіну у новонароджених зі складними вродженими вадами серця**

Показники	До операції	1 доба після операції	4 доба після операції	8 доба після операції	Норма (новонароджені)
Лактат, (ммоль/л)					до 2,0 ммоль/л
1 група	2,48±0,672*	2,02±0,753	0,92±0,232	-	
2 група	2,04±0,95	1,17±0,58	0,9±0,337	-	
Гемоглобін, (г/л)					160-210 г/л
1 група	179,8±22,47	115,0±19,99	101,6±22,1	108,2±26,7	
2 група	156,0±29,94	115,5±8,77	109,3±16,21	128,1±25,7	

Закінчення табл. 2

Показники	До операції	1 доба після операції	4 доба після операції	8 доба після операції	Норма (новонароджені)
Фетальний гемоглобін, (%)					60-98%
1 група	88,17±8,75	86,93±8,16**	89,33±7,78***	89,33±5,51	
2 група	-	50,71±21,8	30,14±4,99	-	
Гематокрит, (%)					45-65%
1 група	51,75±6,71	32,88±5,3	29,14±7,37	30,86±7,54	
2 група	45,18±8,18	33,66±2,46	32,9±5,088	30,86±7,54	

Різниця між 1 та 2 групою статистично достовірна – * – p=0,039; ** – p=0,018; * – p=0,002**

За досліджуваними показниками не виявлено достовірних відмінностей між новонародженими, яким проводили хірургічне лікування із застосуванням компонентів пуповинної та донорської крові. Проте, у новонароджених 1 групи у післяопераційний період не було ускладнень, пов'язаних з переливанням аутологічної пуповинної крові, тоді як у новонароджених 2 групи спостерігались ускладнення (гіпертермія, легеневі ускладнення).

Результати дослідження стандартних клінічних показників (лактату крові, гемоглобіну, гематокриту) в обох групах у динаміці представлено у Таблиці 2.

Перелічені показники відображають важкість стану хворого, і є одним із методів оцінки ефективності терапії, що проводиться, а також прогностичним показником результату захворювання. Зокрема, високий вміст лактату завжди вказує на критичний стан пацієнта і є прогностично несприятливим критерієм. Рівень лактату нормалізувався в обох групах вже на 4 добу після операції. Показники гемоглобіну (загального) та гематокриту на 8 добу після операції були нижчими норми теж в обох групах. Статистично достовірну різницю встановлено за рівнем фетального гемоглобіну: на 4 добу після операції даний показник знаходився в межах норми у всіх пацієнтів 1 групи і був втричі нижчим норми у всіх пацієнтів 2 групи (p=0,002, порівняно з 1 групою).

Нами вперше було проведено дослідження імунореактивності сироваток до Hsp60 у новонароджених з ВВС, яким переливали аутологічну пуповинну або компоненти донорської крові (рисунок 1).

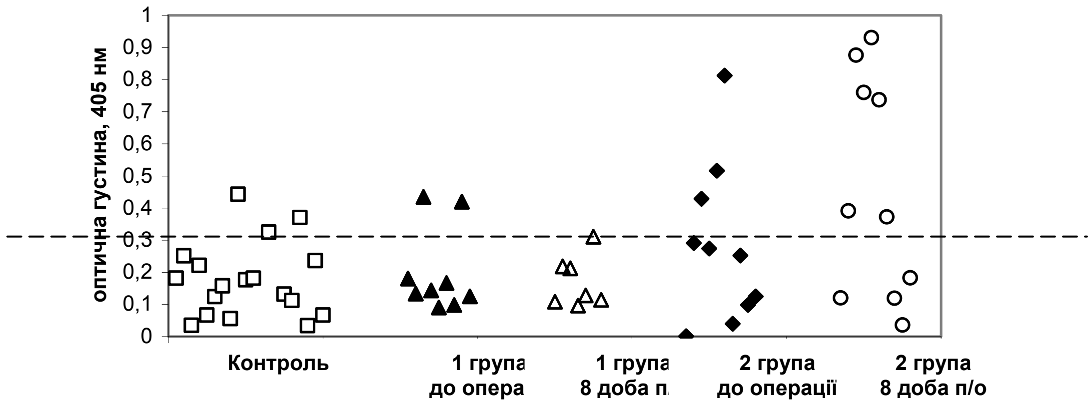


Рис.1. Рівень анти-Hsp60 антитіл у сироватках клінічно здорових новонароджених (контроль) та новонароджених зі складними вродженими вадами серця (антитілопозитивною вважали сироватку, оптична густина якої перевищувала середнє значення оптичної густини сироваток клінічно здорових новонароджених на 2 стандартних відхилення (m+2sd)

1 група – новонароджені зі складними ВВС, яким при хірургічному лікуванні переливали компоненти пуповинної крові;
2 група – новонароджені зі складними ВВС, яким при хірургічному лікуванні переливали компоненти донорської крові

У пацієнтів 1 групи не виявлено антитілопозитивних сироваток ні до операції, ні після неї (8 діб – період спостереження). У пацієнтів 2 групи до операції виявлено одну антитілопозитивну до Hsp60 сироватку: у матері цього новонародженого на 29 тижні вагітності було діагностовано пієлонефрит. На 8 добу після операції у даній групі 40% (4/10) сироваток були анти-Hsp60 позитивним, причому одна сироватка була анти-Hsp60 позитивною і до і після операції. У трьох випадках (3/4, 75%) підвищений рівень анти-Hsp60 антитіл спостерігався на 4-8 добу після операції, у цих пацієнтів у післяопераційному періоді виявлено різного типу ускладнення. У анти-Hsp60 негативних пацієнтів 2 групи легеневі ускладнення або гіпертермія спостерігались у 33,3% (2/6) випадків. У пацієнтів 1 групи у післяопераційний період зазначені ускладнення не спостерігались. Результати досліджень деяких клінічних показників у анти-Hsp60 позитивних та анти-Hsp60 негативних пацієнтів 2 групи у порівнянні з пацієнтами 1 групи представлено у Таблиці 3.

Середні значення рівнів анти-Hsp60 антитіл у динаміці у новонароджених досліджуваних груп представлено у Таблиці 4.

***Таблиця* 4. Рівень анти-Hsp60 антитіл у дітей зі складними вродженими вадами серця, визначений методом ELISA (OD_{405})**

Групи пацієнтів	До операції	1 доба після операції	4 доба після операції	8 доба після операції
1 група (пуповинна кров) (n=9)	0,163±0,107	0,126±0,022	0,162±0,093	0,169±0,079
2 група Донорська кров (n=10)	0,304±0,254	0,279±0,219	0,403±0,265	0,499±0,329
Контроль (n=20)	0,219±0,164			

За результатами проведених досліджень, коефіцієнт взаємного спряження між підвищеними рівнями анти-Hsp60 антитіл на 8 добу після операції у пацієнтів 2 групи та переливанням компонентів донорської крові становив К=0,361 (середня сила зв'язку).

За даними літератури [21,22] та результатами власних досліджень, практично у всіх клінічно здорових новонароджених виявлялись антитіла до Hsp60. Оскільки всі новонароджені та їх матері були клінічно здоровими, ці антитіла прийнято вважати природніми ("natural antibodies"). Було встановлено кореляцію між рівнем IgG анти-Hsp60 антитіл у пуповинній та материнській крові (r=0,901, p<0,0001) [21]. Враховуючи, що антитіла класу IgG здатні "проходити" через плаценту, материнська кров може бути джерелом IgG анти-Hsp60 антитіл у новонародженого. Це узгоджується з гіпотезою, що материнські антитіла впливають на майбутній профіль антитіл дитини [22]. У літературі не відображено питання щодо анти-Hsp60 імунореактивності у новонароджених з ВВС.

***Таблиця* 3. Клінічні показники на 8 добу після операції у новонароджених зі складними вадами серця, яким переливали аутологічну пуповинну кров та компоненти донорської крові**

Показники	1 група (донорська кров) Анти-Hsp60-позитивні сироватки (n=4)	Анти-Hsp60-негативні сироватки (n=6)	2 група (пуповинна кров) Анти-Hsp60 негативні сироватки (n=9)	Норма (новонароджені)
Рівень анти-Hsp60 антитіл, 8 доба після операції ($OD_{405\ нм}$)	0,83±0,09*#	0,2±0,146	0,169±0,079	0,219±0,164
Штучна вентиляція легень (год.)	63,0±35,37	61,5±24,74	61,44±35,19	-
Термін перебування у стаціонарі після операції (дні)	20,3±5,68	17,83±4,79	15,9±4,45	-
Ускладнення (n)	3 (75%)	2 (33,3%)	0 (0%)	-
Лактат, 4 доба після операції (ммоль/л)	0,6±0,424	0,6±0,336	0,92±0,232	до 2,0 ммоль/л
Гематокрит, 8 доба після операції **(%)**	34,67±3,51	37,0±7,55	30,86±7,54	45-65%
Гемоглобін, 8 доба після операції (г/л)	117,3±17,95	127,14±25,98	108,2±26,7	160-210 г/л
Фетальний гемоглобін,4 доба після операції (%)	32,0±1,41	29,4±5,85	89,33±5,51**	60-98%

* – різниця достовірна порівняно з контрольною групою (p=0,002)

– різниця достовірна порівняно з групою анти-Hsp60 негативних пацієнтів 2 групи (p=0,01) та анти-Hsp60 негативних пацієнтів 1 групи (p=0,008)

** – різниця достовірна порівняно з групою анти-Hsp60 позитивних та анти-Hsp60 негативних пацієнтів 2 групи (p=0,002)

Результати наших досліджень свідчать, що у доопераційний період у всіх пацієнтів зі складними ВВС, за виключенням однієї дитини, рівні анти-Hsp60 антитіл знаходились в межах контрольних показників (клінічно здорові новонароджені). У післяопераційний період анти-Hsp60 позитивні сироватки детектувались лише у групі пацієнтів, які одержували компоненти донорської крові (у 40% випадків). Встановлено зв'язок між підвищеними рівнями анти-Hsp60 антитіл на 8 добу після операції та переливанням компонентів донорської крові (К=0,361; середня сила зв'язку). За даними літератури анти-Hsp60 антитіла виявляються у більшості, якщо не у всіх дорослих людей, причому їх рівень може дуже широко варіювати [7,19]. З віком їх вміст у циркуляції може збільшуватись [7]. Висловлюється припущення, що високі рівні анти-Hsp60 антитіл слід розглядати як біологічний маркер несприятливого стану організму, у тому числі наявності хронічного запалення, автоімунних процесів, тощо [24]. На нашу думку, донорська кров може бути джерелом анти-Hsp60 антитіл. Який вплив вони будуть мати на організм новонародженого з ВВС при застосуванні компонентів донорської крові, на даний момент відповісти складно, виходячи з малої вибірки та короткого періоду спостереження (8 діб). Одержані нами результати є попередніми, на даний момент проводяться дослідження анти-Hsp60 імунореактивності у прооперованих новонароджених обох груп у віддалений період (3, 6 та 12 місяців) та у вагітних, у яких було діагностовано відхилення у розвитку серця плоду, а також у донорів, компоненти крові яких використовуються при хірургічному лікуванні новонароджених зі складними ВВС.

Висновки. За результатами проведених досліджень у післяопераційному періоді між новонародженими з ВВС, яким переливали аутологічну пуповинну кров або компоненти донорської крові, виявлено наступні відмінності: різного типу ускладнення (легеневі або гіпертермія) були лише у групі пацієнтів, яким переливали компоненти донорської крові; встановлено статистично достовірну різницю за рівнем фетального гемоглобіну (на 4 добу після операції даний показник знаходився в межах норми у всіх пацієнтів 1 групи і був втричі нижчим норми у всіх пацієнтів 2 групи); у післяопераційному періоді анти-Hsp60 позитивні сироватки детектувались лише у групі пацієнтів, яким переливали компоненти донорської крові.

1. Капустян Л. Н., Киямова Р. Г., Гришкова В. С., Терентьев А. Г., Филоненко В. В., Сидорик Л. Л. Получение рекомбинантного шаперона GroEL и его иммунологическая кросс-реактивность с Hsp60 // Біополімери і клітина. – 2006. – Т. 22, № 2. – С. 117 – 121. 2. Куркевич А.К., Руденко Н.М., Ємець І.М. Пренатальна діагностика критичних вроджених вад серця // Серцево-судинна хірургія. Щорічник науковиз праць Асоціації серцево-судинних хірургів України. Київ, 2007, вип.15, С.164-169. 3. Урбах В.Ю. Математическая статистика для биологов и медиков. М.: АН СССР; 1963, 333 с. 4. Федевич О.М., Часовський К.С., Седан Є.В., Куркевич А.Н,, Лисак Ю.П., Бойченко О.М., Ємець І.М. Ноий підхід до кардіохірургічного лікування складних критичних вроджених

вад серця в перші години життя //Щорічник наукових праць Асоціації серцево-судинних хірургів України. Київ 2010. Випуск 18, С.646-651. 5. Часовський К.С., Федевич О.М., Воробйова Г.М., Куркевич А.К., Горбатюк Г.А., Руденко Н.М., Ємець І.М. Перший досвід застосування компонентів аутологічної пуповидної крові при хірургічному лікуванні новонароджених з транспозицією магістральних судин // Щорічник наукових праць Асоціації серцево-судинних хірургів України. Київ 2010. Випуск 18, С.679-683. 6. Alard J.-E., Dueymes M., Youinou P., Jamin C. Modulation of endothelial cell damages by anti-Hsp60 autoantibodies in systemic autoimmune diseases // Autoimmunity Rev. -2007.- V.6.-P.438-443. 7. Cappello F., de Macario E., Di Felice V., Zummo G., Macario A. Chlamydya trachomatis infection and anti-Hsp60 immunity: the two sides of the coin // Plos Pathogens. – 2009. – Vol.5, N8. – P1-9. 8. Engoren M., Habib R., Zacharias A. Effect of blood transfusion on long-term survival after cardiac operation // Ann.Thorac Surg. – 2002. – Vol.74. – P.1180-1186. 9. Feng H., Zeng Y., Whitesell L., Katsanis E. Stressed apoptotic tumor cells express heat shock proteins and elicit tumor-specific immunity // Blood. – 2001. – Vol.97, № 11. – P. 3505–3512.10. Foteinos G., Afzal A., Mandal K., Jahangiri M., Xu Q. Anti-Heat Shock Protein 60 Autoantibodies Induce Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice via Endothelial Damage // Circulation. – 2005. – Vol.112. – P.1206-1213. 11. Guilbert B., Dighiero G., Avrameas S. Naturally occuring antibodies against nine common antigens in human sera. I Detection, isolation and characterization. J.Immunol. 1982. – Vol.128. – P.2779-2787. 12. Gupta S., Knowlton A. Cytosolic heat shock protein 60, hypoxia, and apoptosis // Circulation. – 2002. – Vol.106. – P.2727-2733. 13. Gupta S., Knowlton A. Hsp60, Bax, apoptosis and the heart // J.Cell.Mol.Med. – 2005. – Vol.9, N1. – P.51-58.14. Gupta S., Knowlton A. Hsp60 trafficking in adult cardiac myocytes: role of the exosomal pathway // American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology.- 2007.-Vol.292, N6.-P.H3052-H3056. 15. Handley H., Yu J., Yu D., Singh B., Gupta R., Vaughan J. Autoantibodies to human heat shock protein (hsp) 60 may be induced by Escherichia coli groEl // Clin Exp Immunol. – 1996. – Vol.103. – P.429-435. 16. Lachtman D.S. Heat shock proteins and cardiac protection // Cardiovasc. Res. – 2001. – Vol.51. – P. 637-646. 17. Mandal K., Jahangiri M., Mukhin M., Poloniecki J.,Camm J., Xu Q. Association of anti-heat shock protein 65 antibodies with development of postoperative atrial fibrillation // Circulation. – 2004. – Vol.110. – P.2588-2590. 18. Perschinka H., Mayr M., Millonig G., Mayerl C., van der Zee R., Morrison S., Morrison R., Xu Q., Wsck G. Cross-reactive B-cell epitopes of microbial and human heat shock protein 60/65 in atherosclerosis // Arteriscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2003. – Vol.23, N6. – P.1060-1065. 19. Prohazka Z., Duba J., Horvath L., Csaszar A., Karadi I., Szebeni A., Singh M., Fekete B., Romics L., Fust G. Comparative study on antibodies to human and bacterial 60 kDa heat shock proteins in a large cohort of patients with coronary heart disease and healthy subjects // Eur.Clin.Invest. – 2001. – Vol.31. – P.285-292.20. Sarri S., Shaw S., Gieschen-Krische M., Archer L., Yonan N., Fildes J. Myocardial heat shock protein 60 expression is upregulated following acute cardiac rejection // Transpl Immunol. – 2009. – Vol.21, N3. – P.140-2. 21. Varbiro Sz., Biro A., Cervenak J., Singh M., Banhidy F., Sebestyen A., Fust G., Prohaszka Z. Human anti-60 kD heat shock protein autoantibodies are characterized by basic features of natural autoantibodies // Acta Physiol.Hungar. – 2010. – Vol.97, N1. – P.1-10. 22. Victora G., Bilate M., Socorro-Silva A., Caldas C., Lima R., Kalil J., Coelho V., Victora C. Mother-child immunological interactions in early life affect long-term humoral autoreactivity to heat shock protein 60 at age 18 years // J. Autoimmun. – 2007. – Vol.29. – P.38-43. 23. Wu T., Tanguay R. Antibodies against heat shock proteins in environmental stresses and diseases:frend or foe? // Cell Stress Chaper. – 2006. – Vol.11, N1. – P.1-12. 24. Yokota S., Minota S., Nobuhiro F. Anti-HSP auto-antibodies enhance HSP-induced pro-inflammatory cytokine production in human monocytic cells via Toll-like receptors // Intern. Immun. – 2006. – Vol.18. – P.573-580.

Надійшла до редколегії 15.03.11

УДК 612.825.5.1

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

ГЕНДЕРНІ ОСОБЛИВОСТІ ЗМІН ПАРАМЕТРІВ ЕЕГ ПРИ КОГНІТИВНОМУ НАВАНТАЖЕННІ ПІСЛЯ КОРОТКОТРИВАЛОГО СТАНУ СПОКОЮ

При виконанні когнітивного завдання, після короткого стану спокою динаміка змін потужністних характеристик ЕЕГ була однонаправлена як у чоловіків так і жінок в той час як картина когерентних зв'язків мала певні гендерні відмінності – у чоловіків правопівкульний механізм уваги і використання зорово-просторових стратегій мислення, у жінок – більш виражений лівопівкульний контроль обчислювальних операцій і використання вербальних стратегій.

The changes of electric activity of man`s brain upon implementation of the cognitive tasks (mental arithmetic account) after short (to 3 min) stay of rest was characterized by a presence of similar power characteristics for men and women, however coherent relations had some gender differences – for men they were characterised the right hemisphere mechanism of attention and visual-spatial thinking strategies, for women – there was more expressed the left hemisphere control of the arithmetic operations and using the verbal strategy.

Вступ. В нейрофізіологічних дослідженнях останніх років все більше уваги приділяється вивченню механізмів мозку, що визначають пов'язану зі статтю специфіку когнітивних процесів. Статевий диморфізм морфофункціональної організації головного мозку людини багато в чому визначає гендерні особливості протікання мозкових процесів, що відбиваються в різних стилях когнітивної стратегії.

З іншого боку відомо, що фоновий стан активності нейронних ансамблів кори мозку грає істотну роль в їх подальшій взаємодії, викликаній когнітивною діяльністю. Приймаючи до уваги цей факт та зважаючи на результати наших попередніх досліджень, метою даної роботи було вивчення гендерних особливостей механізмів мозкового електрогенезу (зокрема, міжпівкульної взаємодії) при виконанні когнітивного навантаження (рахунок подумки) при короткому(до 3 хв.) знаходженні людини в стані спокою.

Об'єкт і методи досліджень. В експериментах приймали участь 40 студентів-волонтерів (вік 18-25 років), обох статей, без скарг на здоров'я на момент проведення обстежень. Під час реєстрації ЕЕГ, обстежувані знаходились в спеціально обладнаній камері (затемненій, екранованій та звукоізольованій) в зручному, напівлежачому положенні із заплющеними очима.

Перед початком запису електроенцефалограми досліджувані отримували інструкцію сидіти спокійно, не рухаючись та не відкриваючи очей, проте при цьому ні в якому випадку не засинаючи. Після отримання інструкції і певного часу для адаптації людини до умов експерименту (1-2 хв.) власне і починалась реєстрація ЕЕГ на протязі 3-х хвилин. Далі обстежувані отримували завдання рахувати подумки – від заданого чотирьохзначного числа віднімати двохзначне. Через 6 хв. запису ЕЕГ обстежуваним повідомляли про отримані результати.

Запис та первинний аналіз ЕЕГ проводили на базі електроенцефалографічного комплексу EEG-16S (MEDICOR, Угорщина) – IBM PC AT від симетричних лобних (F3, F4), тім'яних (P3, P4), потиличних (O1, O2) та скроневих (T3, T4) відведень за міжнародною схемою 10-20 %. В якості референтного використовувався об'єднаний вушний електрод. Міжелектродний опір був меншим за 5 кОм. Частота дискретизації аналогового сигналу дорівнювала 100 Гц, ЕЕГ записувалась щохвилини, тривалість запису – 20 сек. Фільтр високих частот був встановлений на 30 Гц, постійна часу становила 0.3 с. При аналізі спектрального складу ЕЕГ використовували швидке перетворення Фур'є. Епоха аналізу становила 5,12 сек, епоха усереднення – 0,64 сек. Визначались наступні параметри ЕЕГ: абсолютна (СП, мкВ^2*сек) та відносна (ВСП, %) спектральна потужність θ-, α- та β-діапазонів, а також їх піддіапазонів: $\theta1$ – 4,0-6,0 Гц; $\theta2$ – 6,0-7,5 Гц; $\alpha1$ – 7,5-9,5 Гц; $\alpha2$ – 9,5-11,0 Гц; $\alpha3$ – 11,0-13,0 Гц; $\beta1$ – 13,0-20,0 Гц; $\beta2$ – 20,0-25,0 Гц. ВСП розраховувалась як відношення спектральної потужності певного діапазону до сумарної потужності досліджуваної області спектра. Крім того, визначались середні рівні когерентності (СРК) у цих діапазонах. Слід відмітити, що аналізуючи зміни СРК, розглядалась кількість пар відведень в яких вони спостерігались та їх топографічний розподіл.

Значущість змін досліджуваних ЕЕГ- параметрів оцінювали за допомогою непараметричного критерію знакових рангових сум Вілкоксона, реалізованому в програмному пакеті "Statgraphics 5.1" (Manugistics, Inc.).

Результати та їх обговорення Порівняння змін нейродинаміки ЕЕГ (характеристик СП і ВСП) при виконанні когнітивного завдання (арифметичний рахунок подумки) у чоловіків і жінок після 3 хвилинного стану спокою показало їх однонаправленість та адекватність поставленій задачі (Рис. 1). Проте, картина змін середніх рівнів КОГ мала певні гендерні відмінності (Рис. 2), аналіз яких і буде в подальшому представлений.Відмінності в змінах когерентності ЕЕГ у чоловіків та жінок , викликані виконанням арифметичного рахунку подумки, стосувались практично усіх частотних діапазонів ЕЕГ-коливань і виявлялись у фундаментальних аспектах функціональної коркової організації, а не просто в різній мірі її вираженості.

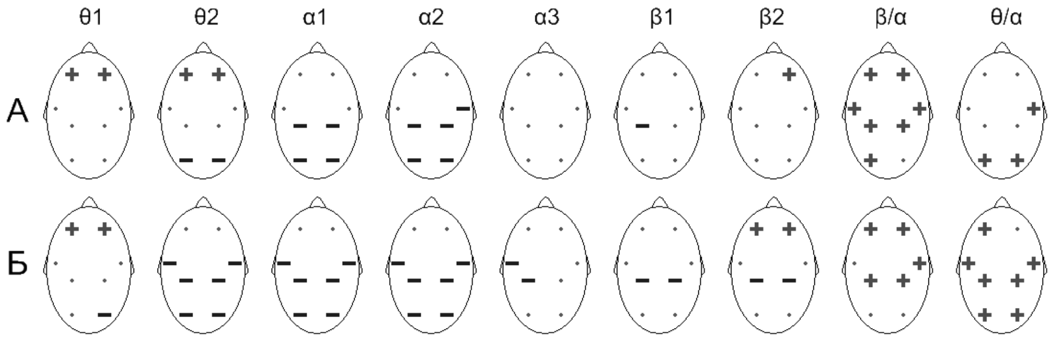


Рис. 1 Зміни ЕЕГ-показників при переході до активної діяльності (рахунок подумки) з узагальненою фоновою активністю стану спокою (S/O) у осіб різної статі. А-чоловіки Б – жінки; СП – спектральна потужність, ("+" – значуще збільшення показника; "-" – значуще зменшення показника; значущі зміни – $p<0.05$).n=60

По-перше, звертає на себе увагу більша задіяність фронтальних зон (особливо лівої) у жінок по відношенню до чоловіків – свідчення того, що під час виконання обчислювальних операцій у них були більше виражені контролюючі функції з боку фронтального неокортексу та більш широке використання вербальних стратегій. З іншого боку, згідно [1] лівостороння асиметрія може свідчити про високий рівень інтелектуального навантаження, пов'язаного зі здійсненням арифметичних операцій подумки. .

Крім цього, нейродинаміку КОГ жінок відрізняла від такої у чоловіків наявність чисельних міжпівкульних взаємодій майже у всіх діапазонах, що в свою чергу може бути відображенням залучення додаткових нейроних модулів, як результат більш тривалого ніж у чоловіків процесу пошуку і селекції інформації [2]. В той же час для чоловіків було характерне посилення взаємодії між центрально-парієтально-окципітальними областями обох півкуль та правим скроневим відведенням в θ1- піддіапазоні, а також між фронтальними і темпоро-окципітальнимі відділами правої півкулі, тоді як для жінок додатково були задіяні ліва скронева та лобна ділянка.

Згідно [3] активація лівої скронево-тім'яної зони мозку пов'язується з ухваленням рішення, опосередкованого внутрішньою мовою, а лобних областей з процесами робочої пам'яті, що є ключовими психофізіологічними процесами при виконанні будь-якої арифметичної діяльності [4 ,5].

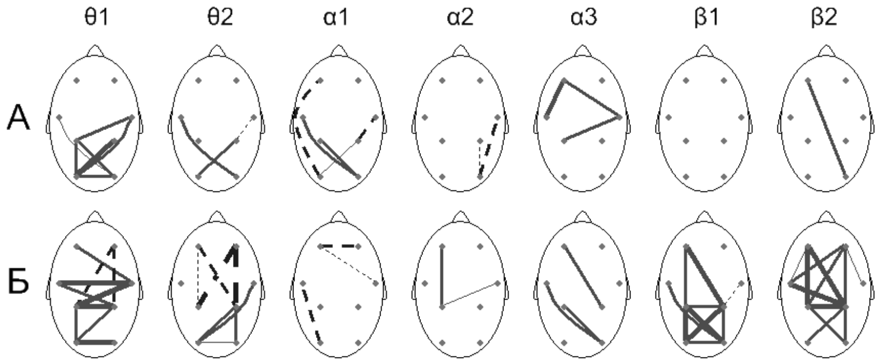


Рис. 2 Зміни рівнів когерентності (КОГ) при переході до активної діяльності (рахунок подумки) з фоновою активністю короткотривалого спокою (S/O) у осіб різної статі. А-чоловіки Б – жінки; ("–" – значуще зростання показника для пари з'єднаних відведень, "- – - " – значуще зниження, відповідно; значущі зміни – $p<0.05$*)*,n=60

Аналізуючи отримані результати треба зважити, що виконання рахунку подумки звичайно викликає певну емоційну реакцію, що, зокрема, може знаходити своє відповідне відображення в зростанні СРК θ1- частоти в лобних відведеннях.

Звертає на себе увагу і гендерні відмінності показників СРК в β- діапазоні. Так, зміни СРК β1-ритму спостерігались тільки для жінок і характеризувались зростанням як внутрішньо-, і міжпівкульних зв'язків (Рис. 2), що узгоджується з даними [6] про те, що зміни когерентності високочастотних діапазонів теж можуть відображати активацію системи неспецифічної емоційної активації у жінок.

Когнітивні процеси супроводжуються різною організацією коркової активності у чоловіків і жінок згідно показникам когерентності ЕЕГ і в β2-діапазоні: у перших вирішення завдання супроводжується зростанням середніх рівнів когерентності ЕЕГ в лівій лобній та в правій потиличній областях , тоді у других – дифузно представленим по корі збільшенням потужності ритму і тісною взаємодією обох півкуль. Наявність зазначеного "діагонального" типу перебудов когерентності під час когнітивної діяльності, що спостерігається в наших дослідженнях у чоловіків, згідно [7]. може свідчить про більш високий рівень можливостей обстежуваних при реалізації когнітивних завдань до переробки інформації.

Отримані дані свідчать про наявність гендерних відмінностей в механізмах пів кульної взаємодії при когнітивній діяльності після короткочасного (до 3 хв.) знаходження в стані спокою–у жінок успішне виконання арифметичного рахунку пов' язано з таким способом ментального мислення як використання лінгвістичного, а у чоловіків – зорово-просторового кодування числових стимулів.

Висновок. Динаміка змін потужністних характеристик ЕЕГ при виконанні когнітивного завдання, після короткого стану спокою була однонаправлена як у чоловіків так і жінок в той час як картина когерентних зв'язків мала певні гендерні відмінності – у чоловіків правопівкульний механізм уваги і використання зоровопросторових стратегій мислення, у жінок – більш виражений лівопівкульний контроль обчислювальних операцій і використання вербальних стратегій.

1. Иваницкая Л.Н., Богун А.С. Некоторые особенности ЭЭГ школьников при интеллектуальной нагрузке различного профиля // Валеология . – 2007. – №. 3. – С. 68-77. 2. Разумникова О.М., Ларина Е.И. Полушарные взаимодействия при поиске оригинальных вербальных ассоциаций: особенности когерентности биопотенциалов коры у креативных мужчин и женщин // Высшая нервная деятельность. – 2005. – №6. – С. 785-795. 3. Domahs F., Bartha L., Lochy A., Benke T., Delazer M. Number words are special: Evidence from a case of primary progressive aphasia // Journal of neurolinguistics. – 2006. – V. 19. – P. 1–37. 4. Хомская Е.Д. Нейропсихология. – СПб. : Питер, 2005. – 496 с. 5. Zago, Petit L., Mellet E., Joliot M., Mazoyeret B., et al. Neural correlates of counting large numerosity // ZDM. – 2008. – V. 42, № 6. – P. 569-577. 6. Хомская Е.Д., Батова Н.Я. Мозг и эмоции (нейропсихологическое исследование). – М.: Изд-во МГУ, 1992. – С. 6-67.7. Свидерская Н.Е., Королькова Т.А., Селицкий Г.В. Влияние уровня сознания на пространственную организацию корковой активности при психических процессах // Ж.в.н.д. – 1990. – т. 40, № 5. – С. 951-962.

Надійшла до редколегії 16.03.11

УДК 612.82/.83; 612.821

Н. Філімонова, канд.фіз.-мат.наук,
Г. Вітковська, студ.

ЕЛЕКТРИЧНА АКТИВНІСТЬ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЧОЛОВІКІВ ПРИ ТЕСТУВАННІ ОПЕРАТИВНОЇ ПАМ'ЯТІ НА НЕВЕРБАЛЬНІ СТИМУЛИ ПІДВИЩЕНОГО РІВНЯ СКЛАДНОСТІ

В результаті аналізу ЕЕГ в 16 відведеннях в дельта-, тета-, альфа-, бета1-, та бета2-діапазонах було виявлено, що підвищення електричної активності головного мозку чоловіків при тестуванні оперативної пам'яті на невербальні стимули підвищеного рівня складності свідчить про збільшення напруги, зосередженості, уваги як неспецифічної, так і селективної. При цьому був виявлений різнонаправлений та латералізований характер змін фази та потужності в дельта-діапазоні, а саме: домінуюча частота падала в лівій лобовій та правій потиличній зонах, а потужність зростала в правій префронтальній та лівій тім'яній зонах. Також виявлено, що інформаційне перенавантаження збільшує міжрегіональну синхронізацію спеціалізованих нейромереж центрально-тім'яної та скроневих зон правої півкулі та підвищує спеціалізованість нейромереж з обробки інформації в лівій лобовій зоні і в правих задній скроневій та потиличній зонах.

As a result of analysis of the EEG in 16 leads in delta-, theta-, alpha-, beta1- and beta2- frequency bands, we found that the increase of electrical brain activity of men in testing memory for nonverbal stimuli higher difficulty suggests an increase in tension , concentration of attention as nonspecific, and selective. It was found multiple-directed and lateralized of the phase change and power in the delta frequency band, namely: the dominant frequency falling in the left frontal and right occipital areas, and increased capacity in the right prefrontal and left parietal areas. Also found that information overload increases interregional synchronization of neural networks specialized central parietal and temporal areas and right hemisphere increases specialization of the neural network information processing in the left frontal area and right temporal and occipital rear areas.

Вступ. В сучасному динамічному та інформаційнонасиченому світі навантаження на психіку людини зростає. Так, за останні три десятиріччя було вироблено інформації більше, ніж за останні 5 тисячоріч. Більше 9000 періодичних видань видаються тільки в США і більше 1000 книг видаються щоденно в світі. Часто виникають ситуації, коли людина є пригніченою різноманітною інформацією, яка її оточує. Деякі люди в результаті інформаційного перенавантаження відчувають дезорієнтацію, нудоту, запаморочення, інколи ейфорію та маніакальні стани. Як було встановлено, дезорієнтація та інші психофізіологічні негативні ефекти є корельованими з пізнавальним перенавантаженням, що є абсолютно неприпустимим в системах, коли прийняття рішення людиною зачіпає безпеку життя інших людей [1]. Особливо актуальною ця проблема є для військових. Так, при розробці концепції конкурентної переваги військових США проти майбутніх супротивників проблему ментального перенавантаження виділено як таку, яка критично послаблює військову потужність. По-перше, велика кількість не достатньо інтегрованих військових підрозділів, які приймають участь в бойових діях веде до втрати контролю над ситуацією. По-друге, вибух доступної інформації створює інформаційне середовище розумового перенавантаження, яке призводить до прийняття командуванням хибних рішень. Один з чиновників Міністерства оборони США (Department of Defense, U.S.) повідомив, що кожен рік більше 3000 повідомлень з 30 000, які надходять, ніколи не відкриваються внаслідок інформаційної надмірності [2]. В NASA визначають інформаційне перенавантаження як ситуацію, коли інформаційні процеси потребують такого індивідуального часу для виконання операцій взаємодії та внутрішнього оцінювання, який переважає доступні ресурси часу [3]. Під інформаційним перенавантаженням також розуміють інформаційний синдром втоми, інформаційний вибух, інформаційне перенасичення [1]. Розрізняють особистісне (надмірний обсяг інформації) та організаційне (некерованість інформаційними потоками) інформаційне перенавантаження. Особистісне інформаційне перенавантаження може бути викликане великим обсягом непотрібної та незначущої інформації, недостатнім часом для осмислення інформації, одночасним багатоджерельним надходженням інформації [1]. В NASA розроблені певні тести (наприклад, NASA TLX) для вимірювання робочого навантаження та фізіологічної оцінки стану оператору. При цьому обстежуваному пропонується виконувати декілька незалежних задач, які одночасно пред'являються. Обмеження часу для прийняття рішення є також критичним і для пілотів винищувачів. Підготовка одного такого пілота коштує близько 3 млн. доларів, тому в ВПС Великобританії було розроблено тест для відбору пілотів, в якому обстежуваному також надаються одночасно декілька різномодальних завдань [2]. Аналогічні дослідження проводяться в сфері бізнесу з метою підвищення ефективності прийняття рішень керівними структурами [1]. Проведені обстеження показали, що найкраще з одночасно пред'явленими завданнями справляються жінки, але пілотами винищувачів та військовими, операторами складних систем найчастіше є чоловіки. Тому виникає питання, як саме вони справляються з інформаційним навантаженням і чи дійсно вказані тесті є адекватними при профвідборі. На першому етапі ми поставили задачу дослідити електричну активність кори головного мозку чоловіків при зростаючому рівні складності одномодального завдання – запам'ятовуванні геометричних фігур з однією та двома ознаками.

Об'єкт та методи досліджень. В дослідженні як обстежувані добровільно взяли участь 10 чоловіків, правші, віком 19-21 рік), студенти 2-4 курсів Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Впродовж дослідження кожний обстежуваний послідовно проходив 2 комп'ютерні субтести оцінки розвитку короткочасної пам'яті. В першому субтесті оцінювалась оперативна пам'ять на прості геометричні фігури (Г1): 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". В другому субтесті оцінювалась оперативна пам'ять на геометричні фігури з двома ознаками (Г2): форма (круг, еліпс, квадрат та прямокутник) і зафарбування вертикальної або горизонтальної половини фігури Другий субтест був організований за аналогічною схемою. Другий субтест моделював стан інформаційного перенавантаження, оскільки за попередніми дослідженнями виявлено, що рівень складності цього завдання є надмірним для більшості обстежуваних – в них вже при пред'явленні 4 стимулів різко зростала кількість помилок, а латентні періоди реакції падали, що свідчило про хаотичність, випадковість відповіді [4]. 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 [4]. 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 звукоізольованому приміщені, з ними підтримувався аудіо-зв'язок. Запис ЕЕГ здійснювався монополярно, референтний електрод було розташовано на мочці вуха з кожної сторони, частота квантування ЕЕГ дорівнювала 500 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 – Амаксимальна, мкВ/с;

максимальна потужність спектру у відведенні – Sмаксимальна, мк$В^2/с^2$;

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

середня потужність спектру у відведенні – Sсередня, мк$В^2/с^2$;

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

повна потужність спектру у відведенні – Sповна, мк$В^2/с^2$;

домінуюча частота спектру у відведенні – Fдомінуюча, Гц;

середня частота спектру у відведенні – Fсередня, 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 ($p < 0,05$), 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: M_e [25%; 75%].

Результати та їх обговорення. Проведений аналіз отриманих даних загалом показав, що, не зважаючи на те, що при всіх рівнях складності стимулу включалися механізми оперативної пам'яті, складність завдання впливала на електричну активність головного мозку. Застосовуючи критерій Вілкоксона до порівняння показників ЕЕГ кожного з обстежуваних при тестуванні оперативної пам'яті на Г1 та Г2 було виявлено наступні відмінності (рис.1).

В дельта – діапазоні в префронтальній зоні у відведенні Fp1A1 Fсередня знизилась з 1,0 [0,9 ; 1,3] Гц до 0,90 [0,80 ; 1,20] Гц (р= 0,03), а в Fp2A2 Індекс збільшився з 78,0 [75,0 ; 82,0] % до 79,50 [76,00 ; 84,00] % (р= 0,05). В лівій лобовій зоні в F3A1 Fсередня зменшилась з 1,1 [1,0 ; 1,3] Гц до 1,05 [1,00 ; 1,30] Гц (р= 0,04). В лівій тім'яній зоні в P3A1 Асередня підвищилась з 4,8 [3,7 ; 6,0] мкВ/с до 5,35 [4,10 ; 7,00] мкВ/с (р= 0,05), в правій потиличній зоні в O2A2 Fдомінуюча знизилась з 0,9 [0,8 ; 1,1] Гц до 0,75 [0,70; 1,00] Гц (р= 0,04), в правій скроневій зоні в T6A2 Fсередня зменшилась з 0,9 [0,8 ; 1,1] Гц до 0,80 [0,70 ; 1,00] Гц (р= 0,03), а Індекс збільшився з 69,5 [60,0 ; 78,0] % до 73,50 [66,00 ; 82,00] % (р= 0,05) (рис.1). Дельта-хвилі більш проявлені в мозку під час сну, відпочинку, але в останні роки виявлено, що їх активація пов'язана з активною, цілеспрямованою когнітивною увагою, яка приймає участь в оцінці міри виконання завдання (часу реакції та відсотку помилок) [5]. В [5] відмінності в зміні фази та потужності при виконанні завдання не були достатніми, щоб їх класифікувати окремо. При інформаційному перенавантаженні нами було виявлено різнонаправлений та латералізований характер змін фази та потужності. Так, домінуюча частота падала в лівій лобовій та правій потиличній зонах, а потужність зростала в правій префронтальній та лівій тім'яній зонах.

В тета-діапазоні в центральній зоні в відведенні С3А1 Sповна зросла з 33,0 [30,0 ; 45,0] мкВ^2/с^2 до 37,00 [30,00 ; 71,00] мкВ^2/с^2 (p= 0,05), С4А2 Sмаксимальна – з 10,0 [9,5 ; 20,0] мкВ^2/с^2 до 12,50 [9,00 ; 22,00] мкВ^2/с^2 (p= 0,05), в правій скроневій зоні в Т4А2 Асередня збільшилась з 1,5 [1,3 ; 2,0] мкВ/с до 1,60 [1,30 ; 2,30] мкВ/с (p= 0,03) і в Т6А2 Sповна – з 19,0 [12,0 ; 76,0] мкВ^2/с^2 до 29,50 [16,00 ; 90,00] мкВ^2/с^2 (p= 0,04).

В правій тім'яній зоні в Р4А2 Fдомінуюча зросла з 4,9 [4,8 ; 5,1] Гц до 5,05 [4,90 ; 5,20] Гц (p= 0,04). В лівій потиличній зоні в О1А1 Індекс знизився з 10,0 [6,0; 15,0] % до 9,50 [5,00 ; 13,00] % (p= 0,03) (рис.1). В [6] показана важлива роль тета – коливань в організації багато-елементної оперативної пам'яті. Потужність ритму зростає, коли збільшується кількість нейронів, які включені в обробку пов'язаної з задачею інформації. Виявлено, що в задачах візуального пошуку відбувається підвищення тета-ритму в центрально-фронтальній зоні, що вказує на збільшення ступеня зосередженості, підвищення уваги [7]. Нами було показано, що при інформаційному перенавантаженні підвищення активності в тета-діапазоні відбувається в центральній та правій скроневих зонах і зниження – в лівій потиличній. Виявлено також підвищення домінуючої частоти в правій тім'яній зоні. Це може свідчити про те, що обробка невербальної інформації підвищеної складності потребує не стільки звернення до зорової кори, скільки міжрегіональну синхронізацію спеціалізованих нейромереж центрально-тім'яної та скроневих зон правої півкулі.

В альфа-діапазоні в лівій префронтальній зоні в відведенні Fp1A1 Аповна зросла з 21,5 [17,0 ; 23,0] мкВ/с до 22,00 [16,00 ; 27,00] мкВ/с (p= 0,01), в лівій лобній зоні в F3A1 Sповна – з 35,0 [19,0 ; 46,0] мкВ^2/с^2 до 35,50 [23,00 ; 70,00] мкВ^2/с^2 (p= 0,02) та в F7A1 Sповна – з 29,5 [12,0 ; 46,0] мкВ^2/с^2 до 40,00 [18,00 ; 48,00] мкВ^2/с^2 (p= 0,02), в лівій центральній зоні в С3А1 Sповна зросла з 31,0 [18,0 ; 45,0] мкВ^2/с^2 до 36,0 [22,0; 58,0] мкВ^2/с^2 (p= 0,01) та в лівій скроневій зоні в Т3А1 Sповна – з 27,0 [13,0 ; 29,0] мкВ^2/с^2 до 28,50 [14,00 ; 37,00] мкВ^2/с^2 (p= 0,03). В правій центральній зоні в С4А2 Sмаксимальна зросла з 8,6 [4,8 ; 10,0] мкВ^2/с^2 до 9,05 [5,40 ; 12,00] мкВ^2/с^2 (p= 0,02), в правій тім'яній зоні в Р4А2 Аповна – з 17,0 [11,0 ; 19,0] мкВ/с до 17,50 [12,00 ; 20,00] мкВ/с (p= 0,02), правій скроневій зоні в Т4А2 Аповна – з 13,0 [10,0 ; 15,0] мкВ/с до 13,50 [11,00 ; 15,00] мкВ/с (p= 0,05) та в Т6А2 Sповна – з 20,0 [9,7 ; 35,0] мкВ^2/с^2 до 24,00 [17,00 ; 39,00] мкВ^2/с^2 (p= 0,03). Крім того, в потиличній зоні активність зросла симетрично в обох півкулях: в О1А1 Sповна збільшилась з 26,5 [15,0 ; 89,0] мкВ^2/с^2 до 27,50 [18,00 ; 89,00] мкВ^2/с^2 (p= 0,01) та в О2А2 Sповна – з 27,0 [13,0 ; 66,0] мкВ^2/с^2 до 33,50 [17,00 ; 65,00] мкВ^2/с^2 (p= 0,01) (рис.1). В [8] показано, що зростаючий рівень складності просторового завдання призводить до збільшення домінантної частоти в право-тім'яної та заднє-скроневої зонах. Підвищена тривога, хвилювання призводили до асиметрії в тім'яній, лобовій та скроневій зонах. В [9] показано, що потужність в альфа-діапазоні зростає з ускладненням візуально-просторового завдання в правій півкулі. За нашими результатами можна припустити, що інформаційне перенавантаження підвищує спеціалізованість нейромереж з обробки інформації в лівій лобовій зоні і в правих задній скроневій та потиличній зонах, оскільки підвищення активності в альфа-діапазоні свідчить про ефективне пригнічення в короткочасній пам'яті невідповідної інформації, яка відволікає увагу. Наші результати співпадають з результатами, отриманими іншими авторами, які показали, що ці зони є специфічними для даної задачі [8-9]. В центральній та скроневих зонах також спостерігалось підвищення альфа-активності, але не було виявлено латералізованого впливу невербального інформаційного навантаження. Нагадаємо, що хоча для запам'ятовування надаються невербальні подразники, відповідь формується в результаті внутрішньої мови і полягає в тому, щоб натиснути правою рукою у випадку "так" або лівою у випадку "ні". Таким чином, було виявлено, що при підвищенні складності обробки невербальної інформації збільшувалось напруження, обстежувані посилювали логічний аналіз пред'явлених стимулів та концептуальну обробку сенсорної інформації. Підвищення активності в потиличній зоні може бути пов'язане з підвищенням специфічності реакцій зорової кори – образним мисленням.

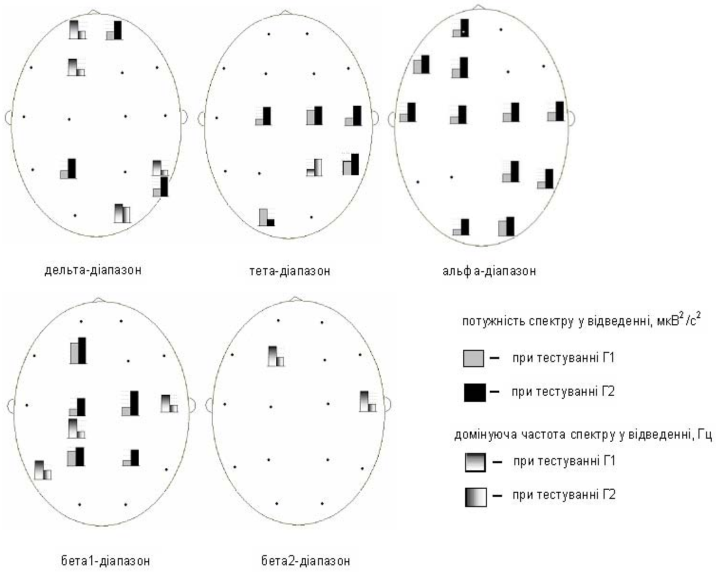


Рис.1. Значущі зміни активності головного мозку чоловіків (n=10) при тестуванні невербальної оперативної пам'яті на геометричні фігури з однією (Г1) та двома ознаками (Г2)

В бета-1 діапазоні в лівій лобній зоні в F3A1 Sповна зросла з 10,0 [6,7 ; 17,0] мкВ^2/с^2 до 12,50 [10,00 ; 23,00] мкВ^2/с^2 (p= 0,05), в лівій центральній зоні в С3А1 Sповна зросла з 11,5 [6,4 ; 19,0] мкВ^2/с^2 до 12,00 [11,00; 22,00] мкВ^2/с^2 (p= 0,02), а Fдомінуюча знизилась з 16,2 [15,9 ; 16,4] Гц до 15,85 [15,60 ; 16,10] Гц (p= 0,02). В правій центральній зоні в С4А2 Sповна також зросла з 10,5 [6,7 ; 12,0] мкВ^2/с^2 до 12,50 [11,00 ;

19,00] мкВ^2/с^2 (p= 0,03). В потиличній зоні обох півкуль в P3A1 Sсередня зросла з 1,0 [0,7 ; 1,3] мкВ^2/с^2 до 1,20 [0,85 ; 1,40] мкВ^2/с^2 (p= 0,05) та в P4A2 Sповна зросла з 12,0 [6,0 ; 17,0] мкВ^2/с^2 до 13,00 [11,00 ; 18,00] мкВ^2/с^2 (p= 0,04). В лівій задній скроневій зоні в T5A1 Fсередня зросла з 15,3 [11,2 ; 15,9] Гц до 14,40 [11,60; 15,60] Гц (p= 0,05), а в правій скроневій зоні в T4A2 Fдомінуюча знизилась з 15,8 [15,4 ; 16,0] Гц до 15,50 [13,50 ; 15,90] Гц (p= 0,02). В правій потиличній зоні в O2A2 Sмаксимальна зросла з 3,1 [2,0 ; 5,3] мкВ^2/с^2 до 3,55 [2,80 ; 6,20] мкВ^2/с^2 (p= 0,02) (рис.1). В бета-2 діапазоні спостерігались тільки зниження середньої частоти в лівій лобовій зоні в F3A1 Fсередня з 24,5 [24,3 ; 24,9] Гц до 24,20 [23,70 ; 24,50] Гц (p= 0,05) та в правій скроневій зоні – в T4A2 Fсередня з 24,1 [23,5 ; 24,5] Гц до 23,25 [21,20 ; 25,00] Гц (p= 0,04) (рис.1). Як відомо [10], коливання в бета-діапазоні залучені до різноманітних функцій таких, як особливості інтегрування при сприйнятті, поперечній модальній інтеграції, селективній увазі, короткочасній пам'яті, асоціативному та перцептивному навчанні. Ці дані свідчать, що синхронізація відповіді в бета-діапазоні пов'язана з такими станами головного мозку, як активація та зосереджена увага, які підтримують когнітивну здатність та навчання. За нашими даними запам'ятовування невербальних стимулів підвищеного рівня складності супроводжується підвищенням активності в бета-діапазоні в центральній та тім'яній зонах обох півкуль. Це може бути пов'язано зі збільшенням міжпівкульної інтеграції, підвищенням активації головного мозку та зосередженості. Міжпівкульна взаємодія необхідна для здійснення процесів обробки невербальної інформації, її аналізу та формування відповіді в тестовому завданні.

Про підвищений рівень уваги при запам'ятовуванні геометричних фігур з двома ознаками свідчить підвищений рівень як тета-, так і бета-активності. Відмінності полягають в тому, що підвищення рівня тета-активності свідчить про підвищення неспецифічної уваги. При цьому тета-активація зростає в центральній та правій скроневій зоні. А підвищення бета-активності вказує на збільшення селективної уваги. При цьому бета-активація зростає в центральній, потиличній та лівій лобній зонах. Неспецифічна увага може бути пов'язана з обробкою невербальної зорової інформації, яка переважно здійснюється саме в правій півкулі, а селективна увага може бути пов'язана з логічним аналізом ознак геометричної фігури та прийняттям рішення про її наявність в попередньо пред'явленій множині фігур.

Висновки. В результаті проведеного дослідження було виявлено, що підвищення електричної активності головного мозку чоловіків при тестуванні оперативної пам'яті на невербальні стимули підвищеного рівня складності свідчить про збільшення напруги, зосередженості, уваги як неспецифічної, так і селективної. При цьому був виявлений різнонаправлений та латералізований характер змін фази та потужності в дельта-діапазоні, а саме: домінуюча частота падала в лівій лобовій та правій потиличній зонах, а потужність зростала в правій префронтальній та лівій тім'яній зонах. Також виявлено, що інформаційне перенавантаження збільшує міжрегіональну синхронізацію спеціалізованих нейромереж центрально-тім'яної та скроневих зон правої півкулі та підвищує спеціалізованість нейромереж з обробки інформації в лівій лобовій зоні і в правих задній скроневій та потиличній зонах.

1. Tungare M. Mental Workload in Personal Information Management: Understanding PIM Practices Across Multiple Devices. A Dissertation presented to the Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Computer Science and Applications. – Blacksburg, VA, USA., 2009.- 188 p. 2. Prinzel L.J. 3rd. Research on hazardous states of awareness and physiological factors in aerospace operatlons. Technical Memorandum. Technical Paper NASA/TP-2002-211444. – Hampton: NASA Langley Research Center, 2002. – 80 p. 3. Bourne L.E.Jr., Yaroush R.A. Stress and cognition: A cognitive psychological perspective. NASA Grant Number NAG2-1561. – Boulder, Colorado: University of Colorado, Department of Psychology, 2003. – 123 p. 4. 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. 5. Demanuele C., Sonuga-Barke E.J.S., James C.J. Slow neuronal oscillations in the resting brain vs task execution: A BSS investigation of EEG recordings // Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), 2010 Annual International Conference of the IEEE. Buenos Aires. – Aug. 31 2010-Sept. 4 2010. – P.1638 – 1641. 6. Raghavachari S., Kahana M. J., Rizzuto D. S., Caplan J. B., Kirschen M.P., Bourgeois B., Madsen J. R., Lisman J. E. Gating of Human Theta Oscillations by a Working Memory Task // The Journal of Neuroscience. – 2001. – V. 21(9). – pp. 3175-3183. 7. Sasaki H. Frontal midline theta rhythm: comment on chan and HSU // Perceptual and Motor Skills. – 2010. – V.110. – pp. 1010-1012. 8. Earle JB. Task difficulty and EEG alpha asymmetry: an amplitude and frequency analysis // Neuropsychobiology. – 1988. – V.20(2). – pp. 95-112. 9. Osaka M. Peak Alpha Frequency of EEG during a Mental Task: Task Difficulty and Hemispheric Differences // Psychophysiology. – January 1984. – V. 21, Iss.1. – pp. 101–105. 10. Rodriguez R., Kallenbach U., Singer W., Munk M. H. J.Short- and Long-Term Effects of Cholinergic Modulation on Gamma Oscillations and Response Synchronization in the Visual Cortex // The Journal of Neuroscience. – 2004. – V. 24(46). – pp.10369-10378.

Надійшла до редколегії 25.03.11

УДК 577.151.63:612.396.22

**О. Харченко, канд. біол. наук, Я. Максимович, канд. біол. наук,
Л. Остапченко, д-р біол.наук, проф.**

АКТИВНІСТЬ NO-СИНТАЗИ КЛІТИН ПЕЧІНКИ І МОЗКУ ЩУРІВ ЗА УМОВ ХРОНІЧНОЇ АЛКОГОЛЬНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ ТА ПРИ ДІЇ ОЦТОВОКИСЛОГО ЦИНКУ

При експериментальній хронічній алкогольній інтоксикації встановлено поступове зростання активності NO-синтази в гомогенаті клітин печінки та мозку щурів, причому найбільші зміни спостерігалися на 21-шу добу. Введення оцтовокислого цинку за досліджуваної патології приводило до поступового зниження активності ферменту, особливо на пізніх етапах дослідження, причому у гепатоцитах спостерігалась повна нормалізація її активності.

It was determined that NO-synthase activity increased gradually in homogenate of liver and brain cells under cells under chronic alcoholic intoxication and zinc acetate treatment. The maximal changes of activity were observed on 21th day. Zinc acetate treatment provoked gradually decrease of enzyme activity on the last stages of research. It was observed that NO-synthase activity was near the control value in hepatocytes.

Розкриття характеру впливу гострої і хронічної алкогольної інтоксикації на здоров'я людини є однією з актуальних і до кінця не вирішених завдань сучасної медицини. Протягом останніх 10 років у всьому світі і, зокрема, в Україні, відзначається тенденція до поширення, омолодження та посилення наслідків цього захворювання [1]. В основі розвитку алкоголізму лежать глибокі зміни метаболізму, спричинені розладом функціонування різних метаболічних шляхів, зокрема порушення продукції оксиду азоту (NO), що має широкий спектр біорегуляторної дії [2]. До складу всіх ізоформ синтази оксиду азоту (NOS), яка відповідає за утворення NO в організмі, входять іони цинку. Відомо, що за умов хронічної алкогольної інтоксикації спостерігається дефіцит цього мікроелементу у ряді органів [3], внаслідок чого, можливо, змінюється активність даного ферменту. З метою корекції нестачі цинку використовують його солі, серед яких низькою токсичністю характеризується оцтовокислий цинк. Тому метою наших досліджень було визначити активність NO-синтази та вплив оцтовокислого цинку на активність цього ферменту у клітинах печінки і мозку щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією.

Об'єкти й методи дослідження. У роботі дотримувались міжнародних рекомендацій про проведення медично-біологічних досліджень з використання тварин згідно Європейської конвенції. Дослідження проводили на щурах (самцях) лінії Вістар масою 180-200 г, що утримувались на стандартному раціоні віварію з вільним доступом до води. Тварини були розділені на 3 групи. 1-ша група – контрольні тварини; 2-га група – щури з хронічною алкогольною інтоксикацією, що викликалась за стандартною методикою М.Х. Халілова і Ш.А. Закірходжаєва [4]; 3-тя група – щури з хронічною алкогольною інтоксикацією, яким додатково вводили оцтовокислий цинк в дозі 0,2 г на 100 г маси тварини [5]. Клітини печінки і мозку виділяли за стандартною методикою на 4, 6, 11, 16 та 21 доби після початку експерименту. Активність NO-синтази визначали колориметрично за накопиченням нітрит-іонів – стабільних продуктів аеробного окислення NO [6].

Статистичну обробку результатів проводили з використанням t-критерію Стьюдента при P<0,05.

Результати досліджень та їх обговорення.

У результаті досліджень нами було встановлено, що в гепатоцитах щурів за умов хронічної алкогольної інтоксикації активність NO-синтази поступово зростала, причому найбільші зміни спостерігалися на 21-шу добу (в 3,3 рази вища за контроль) (рис.1). Введення оцтовокислого цинку за умов хронічної дії етанолу на більш ранніх етапах дослідження (7-ма та 11-та доба) призводило до зростання активності NO-синтази в 2 рази в порівнянні з контрольними показниками. У подальшому активність ферменту знижувалась і на 21 добу була в 1,2 рази нижчою по відношенню до контролю. У порівнянні з відповідними термінами досліджень при дії етанолу активність NO-синтази на 4-ту добу суттєво не відрізнялась, а на 7-му, 11-ту, 16-ту та 21-шу добу була в 1,7; 1,3; 1,6 та 3,8 разів нижчою відповідно.

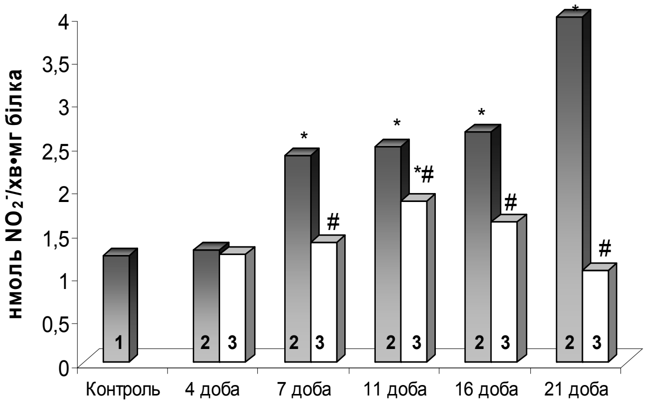


Рис. 1. Активність NO-синтази гепатоцитів щурів за умов хронічної алкогольної інтоксикації та при введенні оцтовокислого цинку (1 – контроль; 2 – етанол; 3 – етанол + цинк)

* – P ≤ 0,05 у порівнянні з контролем

– P ≤ 0,05 у порівнянні з експериментальною моделлю

Дослідження функціонування NO-синтази у клітинах головного мозку є важливим у зв'язку з тим, що оксид азоту залучений у процеси розвитку як органічних порушень, так і поведінкових дисфункцій за умов хронічного екзогенного надходження етанолу.

У результаті проведених досліджень нами встановлено, що у клітинах мозку при дії етанолу активність NO-синтази поступово зростала протягом усіх етапів експерименту і на 21-шу добу була в 3,6 разів вищою за контрольні показники (рис. 2). Введення досліджуваної сполуки за умов хронічної алкогольної інтоксикації в клітинах мозку приводило до менш значного зростання активності NO-синтази, яке на 4-ту, 11-ту та 21-шу добу було відповідно в 1,8; 2,3 та 1,3 рази вищим від контролю. В порівнянні з відповідним часовим періодом при дії тільки етанолу активність NO-синтази на 4-ту добу була дещо нижчою (в 1,2 рази), на 7-му та 11-ту добу значно не відрізнялась, а на 16-ту та 21-шу – була нижчою відповідно в 1,7 та 2,7 разів.

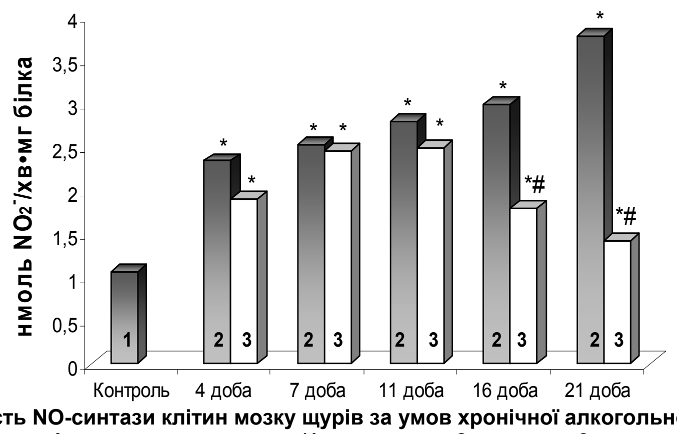


Рис. 2. Активність NO-синтази клітин мозку щурів за умов хронічної алкогольної інтоксикації та при введенні оцтовокислого цинку (1 – контроль; 2 – етанол; 3 – етанол + цинк)

* – P ≤0,05 у порівнянні з контролем

– P ≤ 0,05 у порівнянні з експериментальною моделлю

Встановлене нами зростання загальної активності NO-синтази клітин печінки і мозку щурів при хронічній алкогольній інтоксикації можливо відбувалось за рахунок зростання експресії iNOS, що продукує значно більше NO• у порівнянні з eNOS чи nNOS. У подальшому накопичення вмісту оксиду азоту у цих клітинах може бути одним із факторів посилення токсичної дії етанолу.

Висновок. Таким чином, нами продемонстровано поступове зростання активності NO-синтази у досліджуваних органах при хронічній алкогольній інтоксикації, що у подальшому може призвести до посилення оксидативного стресу та розвитку патологічних пошкоджень. Введення оцтовокислого цинку за досліджуваної патології приводило до поступового зниження активності ферменту, особливо на пізніх етапах дослідження, причому у гепатоцитах спостерігалась повна нормалізація його активності. Це свідчить на користь можливого використання досліджуваної сполуки для нормалізації метаболічних порушень, викликаних хронічним надходженням етанолу і дає підстави для його подальших досліджень як потенційного лікувального засобу за умов хронічного алкоголізму.

1. Дереча Л.М. Алкоголь та його дія на організм: огляд літератури // Вісник Харківського національного університету. – 2007. – Вип. 6. – №788. – С. 7–16. 2. Xin-Sheng Deng and Richard A. Deitrich Ethanol Metabolism and Effects: Nitric Oxide and its Interaction// Current Clinical Pharmacology. – 2007. – V. 2.- P. 145-153. 3. Sidhu P., Garg M. L., Dhawan D. K. Protective effects of zinc on oxidative stress enzymes in liver of protein deficient rats // Nutr. Hosp. – 2004. – V. 9, №6. – P. 341–347. 4. Халилов М.Х., Закихорджаев Ш.Я. К характеристике некоторых патохимических сдвигов в крови, тканях печени и головного мозга при экспериментальной алкогольной интоксикации // Вопросы клиники алкоголизма: Сб. науч. тр., Ташкент, 1983. – С. 38–41. 5. Ещенко Ю.А. Вміст цинку в клітинах при різних функціональних станах інсулярного апарата підшлункової залози: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.13 "Фізіологія людини і тварин" / Ю.А. Ещенко. – Київ, 2004. – 19 с. 6. Hevel J.M., White K.A., Marletta M.A. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase // Biochem. Biophis. Res. Com. – 1991. – V. 266, №34. – P. 22789–22791.

Надійшла до редколегії 25.03.11

УДК 612.825.1

А. Чернінський, канд. біол. наук

УЧАСТЬ ЗОРОВОЇ КОРИ У РЕАЛІЗАЦІЇ ЕЛЕКТРОЕНЦЕФАЛОГРАФІЧНОЇ РЕАКЦІЇ ЗАСВОЄННЯ РИТМУ ПРИ СВІТЛОВІЙ СТИМУЛЯЦІЇ ЛЮДИНИ

Досліджено перебудови електричної активності головного мозку людини під час ритмічної стимуляції світловими спалахами. За допомогою методів реконструкції джерел електричної активності на основі аналізу незалежних компонентів виявлено, що основними але не єдиними структурами, які беруть участь у формуванні фотореактивної ритміки є кортикальні області зорового аналізатора.

Human brain electrical activity related to photic driving was investigated. Independent component analysis algorithms were used to reconstruct the sources of the electroencephalogram. Our data revealed that the central visual structures of the brain are the main but not the only source of the photic-driving-sensitive activity.

Вступ. Електрична відповідь головного мозку людини на ритмічну візуальну стимуляцію відома багато років і використовується як рутинна процедура у неврології [1]. Цей феномен полягає у збільшенні долі коливань електроенцефалограми (ЕЕГ), частота яких співпадає із частотою стимуляції або ж кратна їй. Цей феномен широко використовується у клініці в якості показника збудливості нервової тканини. При цьому, конкретні нейрональні механізми цієї реакції досі детально не з'ясовані. Більш поширеним уявленням про природу цього явища є припущення про існування у головному мозку ритмогенних структур, кожна з яких "налаштована" на вузьку частоту функціонування і через синаптичні зв'язки здатна залучати до своєї ритміки інші нейрональні групи. Ймовірно, що саме такі процеси беруть участь у динамічній синхронізації нейронів головного мозку, яка є одним із теоретичних механізмів обробки інформації, зокрема, сенсорної інтеграції. Важливим питанням, є те, активність яких саме нейронів ми спостерігаємо у скальповій ЕЕГ. Очевидно, що "пейсмекерні" нейрональні групи не можуть бути надто великими за кількістю, а тому електричні процеси, які відбуваються на їх мембранах, не будуть реєструватися на поверхні скальпу взагалі, або ж будуть вкрай низькими за амплітудою. З іншого боку, феномен "нав'язування" пов'язаний із генерацією високоамплітудної активності, а отже – синхронізацією чисельних нейрональних груп. Метою даної роботи було з'ясувати, чи одні і ті ж нейрональні групи беруть участь у генерації викликаної активності під час ритмічної фотостимуляції у різних людей.

Об'єкт та методи дослідження. У дослідженні брали участь 16 осіб (18-24 роки, обох статей). Усі учасники надали письмову згоду на участь у дослідженні. Під час експерименту обстежувані знаходилися у звукоізольованій кімнаті із слабким рівнем освітлення. Під час експерименту обстежувані знаходилися у звукоізольованій затемненій кімнаті в зручному положенні напівлежачи з закритими очима. Після комутації електродів і інструктажу обстежуваного протягом 3 хвилин реєстрували ЕЕГ у стані спокою, після чого починали пробу з ритмічною фотостимуляцією (РФС). РФС проводилася за допомогою світлодіодної матриці розміром 12х3 см, розміщеної на відстані 50 см від очей обстежуваного. Стимули подавалися серіями, що відрізнялися частотами спалахів, які становили почергово 6, 8, 10, 12, 14, 16 Гц. Тривалість періодів стимуляції та міжстимульних інтервалів становила 15 с. Тривалість одного спалаху становила 5 мс. Колір світла – червоний.

Запис та аналіз ЕЕГ 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, C3, C4, Cz, P3, P4, Pz, T3. T4, F7, F8, T7, T8, O1, O2). У якості референтного використовувався об'єднаний вушний електрод. Міжелектродний опір становив менше 5 кОм. Частота дискретизації сигналу становила 500 Гц.

Аналіз записаних реалізацій ЕЕГ здійснювали оффлайн. ЕЕГ проби з РФС розкладався на незалежні компоненти (НК) за допомогою відповідної процедури (ICA [2]), реалізованій у програмному комплексі "Нейроком" (ХАІ-Медика, Харків) [3]. У відповідності до числа відведень ЕЕГ кількість екстрагованих компонентів становила 20. Оцінювали зміни спектру потужності сигналів незалежних компонентів під час серій РФС різної частоти. Спектральний аналіз проводили за алгоритмом швидкого перетворення Фур'є, роздільна здатність по частоті становила не менше 0,2 Гц. Ступінь засвоєння ритму оцінювали за появою під час РФС в спектрі потужності виразних піків на частотах, що співпадали із частотами стимуляції, або ж що були кратними ним. Просторову локалізацію джерел активності незалежних компонентів здійснювали за допомогою реалізованого в програмі "Нейроком" алгоритму на основі багатодипольної моделі. Зв'язування отриманих координат дипольних джерел проводили за алгоритмом [4] на основі стереотаксичного атласу [5]. Програма автоматично обирала ідентифікатори анатомічних структур, що містилися у кубі ± 5 мм навколо отриманої на основі алгоритмів локалізації координат дипольних джерел. Вибір розміру куба обґрунтований тим, що похибка алгоритмів локалізації становить близько 1 см [6]. Отриманий масив анатомічних міток надалі підлягав систематизації з метою виділення тих, які зустрічаються найбільш часто.

Результати досліджень та їх обговорення. Було виявлено, що виразне "засвоєння" ритму стимуляції (за змінами спектральної потужності нативної ЕЕГ) спостерігалося у 15 з 16 обстежуваних. Для подальшого аналізу відбиралися незалежні компоненти, у спектрі потужності яких спостерігалися локальні максимуми на частотах, кратних частоті стимуляції. Кількість незалежних компонентів ЕЕГ, спектр яких змінювався під час стимуляції спалахами хоча б однієї частоти, становила у різних обстежуваних від 2 до 9. Загалом по всім обстежуваним було виділено 74 таких НК (з 300 максимально можливих). Для вирішення питання, які мозкові структури є генераторами активності виділених НК, ми застосували алгоритми тривимірної локалізації на основі багатодипольної моделі. У трьох обстежуваних, еквівалентний диполь – джерело активності цих НК – був розміщений поверхнево у потиличній корі і орієнтований перпендикулярно до її поверхні. Решта диполів мали переважно глибинне розташування. Перенесення отриманих координат диполей у систему стереотаксичного атласа Talairach показало, що переважна їх частина містилася у потиличній (52 %), лімбічній (12 %) та лобовій (13 %) частках головного мозку. На рівні звивин джерела НК, "чутливих" до фотостимуляції містилися у язиковій (21 %), середній потиличній (12 %), поясній (12 %) звивинах та у клині (18 %). На цитоархітектонічному рівні джерела цих НК були виявлені у 17 (11 %), 18 (29 %) та 19 (13 %) полях за Бродманом. Частота зустрічі інших цитоархітектонічних полів не перевищувала 6 %. Таким чином, методи реконструкції джерел електричної активності головного мозку показали, що у більшості випадків джерелом викликаної активності при ритмічній фотостимуляції є кіркові структури зорового аналізатора (17, 18 і 19 поля).

Ми вирішили приділити особливу увагу тим незалежним компонентам, зміни спектру яких спостерігалися при стимуляції усіма 6-ма або хоча б 5-ма частотами. Хоча б один такий "фотореактивний" компонент було виявлено у 14 з 15 обстежуваних, а у 7 учасників таких компонентів було два. 74 % анатомічних міток, асоційованих з координатами цих диполів, відносилися до потиличної частки півкуль головного мозку. Ще 13 % міток відносилися до підкіркових структур, 7 % – до лімбічної системи, і 6 % – до лобової частки. На рівні звивин домінували язикова (31 %), середня потилична (11 %) звивини, клин (29 %) і таламус (10%). На цитоархітектонічному рівні джерела фотореактивних НК класифікувалися як 17 (16 %), 18 (34 %), 19 (12 %) і 30 (12 %) поля за Бродманом (див. рис.). Як відомо, 17, 18 і 19 поля за Бродманом є відповідно первинною, вторинною і третинною кірковими областями зорового аналізатора. 30 поле частково відноситься до поясної звивини, і залучене до здійснення високорівневого аналізу зорових стимулів (ідентифікація, вибір об'єкта) [7].

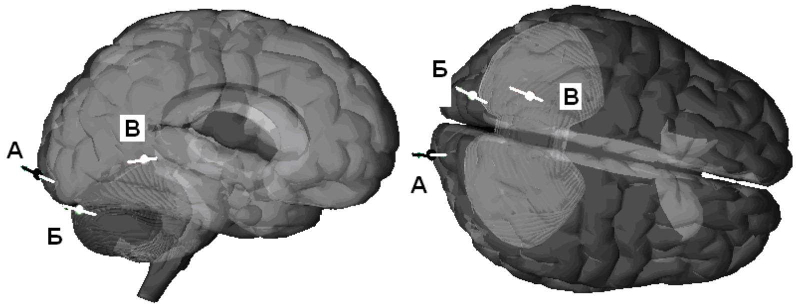


Рис. Локалізація деяких джерел фотореактивної активності: поля 18 (А), 19 (Б), 30 (В). Поле 17 не показано, оскільки тісно прилягає до поля 18. Лінії позначають орієнтацію дипольних векторів. Область електропозитивності усіх трьох диполів розташована у потиличному напрямку

Результати проведеного дослідження дозволяють зробити висновок, що резонансні перебудови електричної активності відбуваються у багатьох мозкових структурах, причому в найбільшому ступені залучені потиличні ділянки кори великих півкуль, які є центральними структурами зорового аналізатора. До останніх відносяться і більшість структур, які відповідають перебудовою електричної діяльності на стимуляцію спалахами практично будь-якої частоти, тобто для резонансної активації яких важливим є сам факт ритміки сенсорного збудження, а не його частота. На даний момент сенс резонансних перебудов мозкової ритміки до кінця не з'ясований. Проте, безперечно, що механізми, які її забезпечують, відіграють значну роль у функціонуванні головного мозку. Динамічна синхронізація нервових елементів теоретично є одним з способів суттєвого підвищення інформаційної ємкості мозку. Так, спосіб обробки одного і того ж паттерну сенсорного збудження визначається характером нейрональних ланцюгів, по яким воно проходить. Багато форм діяльності нервової системи вимагають багатократної обробки одних і тих же даних. Прикладом цього може бути сенсорна перцепція. Так, однією з гіпотез, що пояснює формування сенсорних образів, є гіпотеза про динамічний байндинг [8]. Ймовірним субстратом цих процесів може бути динамічна, мінлива синхронізація нейрональних ланцюгів шляхом включення/виключення різних синаптичних входів. Як зазначалося вище, при цьому повинна існувати невелика за чисельністю популяція нейронів, які б здійснювали зазначені процеси переключення (rewiring). Можна припустити, що ритмічне збудження, яке виникає внаслідок дії нав'язаної зовнішньої ритміки сенсорних подій, активує саме такі "керівні" нейрони. Одночасний розвиток синхронних гальмівних і збуджувальних постсинаптичних потенціалів на керованих нейрональних елементах проявляється у сумарній електричній активності як поява високоамплітудної ритміки, синхронної з ритмом стимуляції.

Висновки. Результати нашого дослідження показали, що нейрональним субстратом формування реакції засвоєння ритму при світловій стимуляції людини здебільшого є центральні структури зорового аналізатора.

1. Fukami T., Ishikawa F., Ishikawa B., Saito Y. Quantitative evaluation of photic driving response for computer-aided diagnosis // Journal of Neural Engineering – 2008 – V. 5. 2. Lee T. W., Girolami M., Bell A. J., Sejnowski T.J. A. Unifying Information-Theoretic Framework for Independent Component Analysis // Computers & mathematics with application – 2000. – V. 39, No 11. 3. Кисельгов Е. Н. Независимый компонентный анализ и его применение к задачам выделения статистически независимых сигналов // Технология приборостроения. – 2001. – № 1-2. 4. Lancaster J. L., Woldorff M. G., Parsons L. M., et al. Automated Talairach Atlas labels for functional brain mapping // Human Brain Mapping. – 2000. – V.10. 5. Talairach J., Tournoux P. Co-planar stereotaxic atlas of the human brain. – New York: Thieme. – 1988. – 122 p. 6. Onton J., Westerfield M., Townsend J., Makeig S. Imaging human EEG dynamics using independent component analysis // Neuroscience & Biobehavioral Reviews. – 2006. – V. 30, No 6. 7. Deary I. J., Simonotto E., Meyer M. et al. The functional anatomy of inspection time: an event-related fMRI study Neuroimage. – 2004 – V. 22, No 4. 8. Игумен Феофан (В. И. Крюков) Принципы сенсорной интеграции: иерархичность и синхронизация // Журн. высш. нерв. деят. – 2005 – Т. 55, № 2.

Надійшла до редколегії 07.04.11

УДК 577.112.3:616.33-006.6

М. Тимошенко, асп., Л. Гайда, канд. біол. наук,
О. Кравченко, канд. біол. наук, Л. Остапченко, д-р біол. наук

ВМІСТ ВІДНОВЛЕНОГО ГЛУТАТІОНУ В КЛІТИНАХ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГАСТРОКАНЦЕРОГЕНЕЗУ

Досліджено вміст відновленого глутатіону в загальній фракції клітин слизової оболонки шлунка в динаміці експериментального гастроканцерогенезу. Через 4 та 6 тижнів розвитку раку шлунка рівень глутатіону зростав на 135% та 85%, тоді як через 8, 12, 18 та 24 тижня спостерігалося зниження його вмісту на 34, 69, 55 та 52% відповідно, в порівнянні з контролем. Отримані дані свідчать про зміни в функціонуванні глутатіонової системи, що дає підстави для всебічного її дослідження.

Glutathione content in general fraction of gastric mucosa cells was analyzed in dynamics of experimental gastric cancerogenesis. In 4 and 6 weeks of gastric cancer development the level of glutathione grew for 135 % and 85% and in 8, 12, 18 and 24 weeks of the experiment resulted in 34, 69, 55 and 52% of glutathione level decreasing in comparison whit control. The receive data witness about alterations in glutathione system function, which gives perspectives for its further research.

Вступ. Рак шлунка залишається однією з найбільш розповсюджених форм злоякісних пухлин людини [1], більше 85% його випадків належать до аденокарцином [2]. Ця патологія являється поліетіологічним захворюванням і більшість можливих причин його виникнення вже відомо, проте механізми, що ведуть до гастроканцерогенезу досі залишаються недостатньо вивченими.

До найбільш відомих факторів ризику розвитку раку шлунка відносять інфекцію Helicobacter pylori, споживання великої кількості солі, алкоголю; паління; дію радіації; недостатність в раціоні свіжих овочів та фруктів; високий вміст в ґрунті, воді та овочах нітратів – попередників нітритів і канцерогенних N-нітрозосполук, що утворюються в шлунку, генетичну схильність, а також наявність таких патологічних станів, як доброякісні новоутворення шлунка, атрофічний гастрит, виразкова хвороба, пострезекційні синдроми [1,3]. Участь кожного фактора нерівнозначна, а в багатьох випадках не встановлена остаточно і є дискусійною.

Багатьма дослідниками визнається, що в злоякісній трансформації клітин важливу роль відіграє оксидативний стрес та вільні радикали через хімічну модифікацію ними структури ДНК, взаємодію з онкогенами і генами-супресорами пухлинного росту [4]. Захист від цитотоксичної дії активних форм кисню (АФК) пов'язаний з наявністю в клітинах ферментів антиоксидантного захисту: супероксиддисмутази, каталази, відновленого глутатіону (GSH) та глутатіонзалежних ферментів.

Відновлений глутатіон, окрім забезпечення антиоксидантного захисту, детоксикації електрофільних ксенобіотиків, відомий соєю участю в модуляції редокс-регульованої сигнальної передачі, регуляції клітинної проліферації, апоптозу, диференціювання клітин [5], запасанні та транспортуванні цистеїну, в синтезі дезоксирибонуклеотидів, регуляції імунної відповіді, метаболізмі лейкотрієнів та простагландинів [4], фолдингу та синтезі білків [6]. Глутатіон модулює клітинну відповідь на редокс-зміни, що асоційовані з наявністю АФК [6]. Свої функції глутатіон реалізовує як самостійна сполука або опосередковано як субстрат GSH-залежних ферментів – глутатіонпероксидази, глутатіон-трансферази та глутатіонредуктази, які разом з НАДФН складають глутатіонову антиоксидантну систему. Відновлений глутатіон є найбільш важливим внутрішньоклітинним захисним агентом органів ссавців, включаючи і шлунково-кишковий тракт [6].

Тому метою нашого дослідження було визначити вміст відновленого глутатіону в клітинах слизової оболонки шлунка в динаміці експериментального гастроканцерогенезу.

Об'єкт та методи досліджень. У дослідах використовували білих лабораторних нелінійних щурів-самців з початковою масою 100±20 г. Тварин було розділено на 8 груп: 1 – контрольна, яка утримувалась на стандартному раціоні віварію; 2-8 – дослідна група, тварин якої виводили з експерименту через 4, 6, 8, 10, 12, 18 та 24 тижні розвитку моделі, відповідно. Ініціацію гастроканцерогенезу викликали шляхом повної заміни питної води на 0,01% розчин N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідину (МННГ) протягом 10 тижнів. До того ж, експериментальна група знаходилася на раціоні з підвищеним (5%) вмістом хлориду натрію. По закінченню 10 тижня тварин переводили на стандартний раціон віварію до кінця 24 тижня [7]. Розвиток патології діагностували візуально за ступенем ураження слизової оболонки шлунка та гістологічно.

Загальну фракцію клітин слизової оболонки шлунка виділяли за методикою, яка базується на ферментативному відщепленні клітин з використанням пронази (0,2мг/мл) [8,9]. Для отримання супернатанту гомогенат клітини центрифугували на холоді (+4°С) при 20000g 15 хвилин. Вміст відновленого глутатіону визначали спектрофлюориметричним методом з використанням ортофталевого альдегіду, в результаті взаємодії якого з GSH утворюються високофлюоресцентні продукти, які активуються при 350нм, і мають чітко виражений пік при 420нм [10]. Вимірювання проводили на спектрофлюориметрі RF-510 (Shimadzu). Концентрацію білка визначали за методом Бредфорд [11].

Результати та їх обговорення. N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин – хімічний канцероген, який використовується для експериментальних досліджень раку шлунка завдяки своїй селективності щодо дистального залозистого відділу шлунка гризунів з локалізацією пухлин в пілоричному відділі. Залозиста тканина шлунка високочутлива до розвитку раку, викликаного МННГ, що пояснюється надзвичайно високою концентрацією в ній глутатіону, який стимулює макромолекулярне алкілування ДНК за допомогою МННГ (in vitro) [12]. Канцероген безпосередньо діє на епітеліальні клітини шлунково-кишкового тракту, метилює основи нуклеїнових кислот та нітрозилює лізинові залишки білків. Високий вміст в їжі солі порушує слизовий бар'єр шлунка, призводить до запалення, дифузних виразок та дистрофії клітин [2].

Глутатіон є важливим для функціональної та структурної цілісності травного тракту [6]. В слизовій оболонці шлунка людей концентрація глутатіону значно вища, ніж в печінці [13], що також справедливо і для печінки та залозистого відділу шлунка гризунів [12]. Оскільки GSH-кон'югуюча ферментна система захищає клітини від нуклеофільних та вільнорадикальних сполук, такий високий рівень глутатіону свідчить про важливість цих ферментів в захисті проти токсичних речовин, що надходять до організму через шлунково-кишковий тракт [13].

Оскільки глутатіон приймає участь в різноманітних клітинних процесах, в тому числі і клітинній диференціації, проліферації та апоптозі, порушення його гомеостазу задіяне в етіології та/або прогресії численних хвороб людини, включаючи рак. Хоча, через плейотропні ефекти глутатіону на функції клітини достатньо важко визначити його роль в ініціації та/або прогресії хвороби. Рівень GSH, швидкість турноверу та/або стан окислення можуть бути підірвані успадкованими або набутими дефектами ферментів, транспортерів, сигнальних молекул або транскрипційних факторів, які задіяні в гомеостазі глутатіону, а також дією хімічних речовин або метаболічних інтермедіатів [5].

Для оцінки загального стану антиоксидантної системи клітин слизової оболонки шлунка за умов експериментального гастроканцерогенезу визначали вміст відновленого глутатіону. Дослідженнями [14] показано, що споживання 0,01% розчину МННГ протягом 4 тижнів може використовуватись як модель передракових змін шлунка. Через 4 та 6 тижнів споживання тваринами розчину МННГ рівень GSH зростав на 135% та 85% (рис. 1).

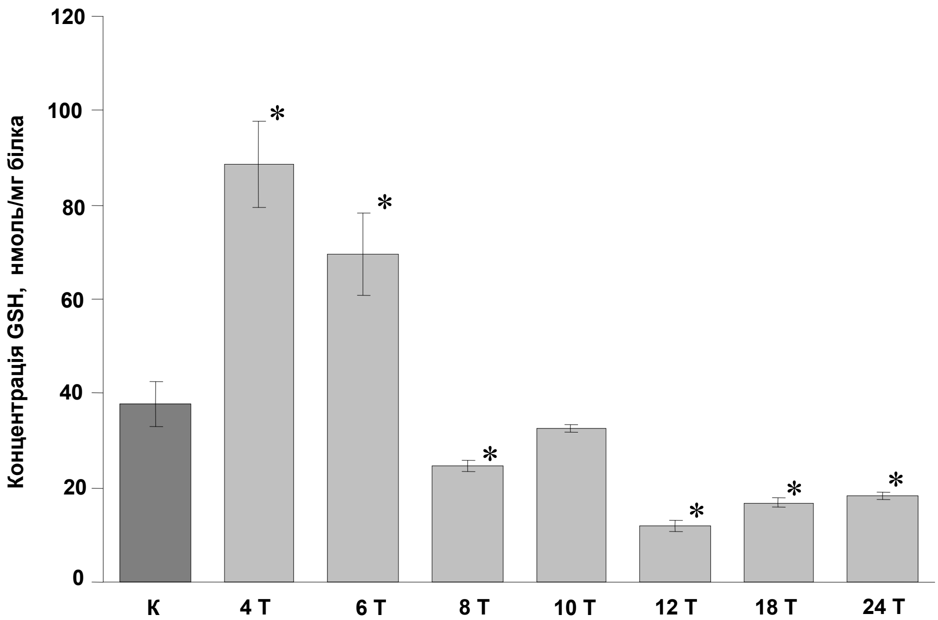


Рис. 1. Вміст відновленого глутатіону за умов розвитку експериментального раку шлунка
* – $p < 0,05$ (достовірність різниці в порівнянні з показниками контрольної групи тварин)

Такий ефект ймовірно спричинений активацією процесів антиоксидантного захисту та компенсаторним гіперсинтезом глутатіону, спрямованим на відновлення пошкоджень слизової оболонки шлунка, спричинених впливом канцерогену. Високий внутрішньоклітинний рівень глутатіону може бути результатом підвищення каталітичної активності або експресії γ-глутамілцистеїнсинтетази – ключового ферменту синтезу GSH, а також зниженням експорту глутатіону з клітини.

В умовах розвитку окисного стресу збільшення вмісту GSH захищає ДНК, білки та клітинні структури від пошкоджень АФК та електрофільними сполуками, а також посилює інактивацію гідроперекисів та інших токсичних продуктів окислення шляхом відновлення та глутатіонування [15]. GSH елімінує канцерогени через ІІ фазу метаболізму і в подальшому експортує ці речовини з клітини.

За нормальних умов, рівень клітинного глутатіону контролюється співвідношенням між швидкістю його синтезу або збереженням, та швидкістю використання або експортом. Однак, рівень GSH також знаходиться під впливом агентів або умов, які змінюють тіоловий редокс-стан, що веде до утворення глутатіон-S-кон'югатів та комплексів, які порушують розподілення глутатіону серед органел [5]. Синтез та катаболізм глутатіону та його похідних відбувається ферментативними цитозольними та пазматично-мембранними транспортними системами так званого γ-глутамільного циклу. Глутатіон синтезується в цитозолі з глутамату, цистеїну та гліцину АТФ-залежними γ-глутамілцистеїнсинтетазою, та глутатіонсинтетазою. Мембрани клітин ссавців погано проникні для глутатіону, тому основну потребу в ньому клітини вирішують за рахунок ендогенного синтезу [15]. Це дає підстави припустити, що такий високий рівень глутатіону в перші 6 тижнів дії МННГ в основному підтримується синтезом його de novo.

Через 8, 12, 18 та 24 тижня розвитку раку шлунка в загальній фракції клітин слизової оболонки шлунка спостерігалося зниження вмісту GSH на 34%, 69%, 55% та 52% відповідно, в порівнянні з контролем. З 18 тижня по малій кривизні шлунка візуально спостерігались новоутворення (рис. 2), що за літературними даними [16] відповідають аденокарциномам. В пілоричному відділі шлунка візуально спостерігалися локальні потовщення слизово-м'язевого шару блюдцеподібної форми з центральною заглибиною.

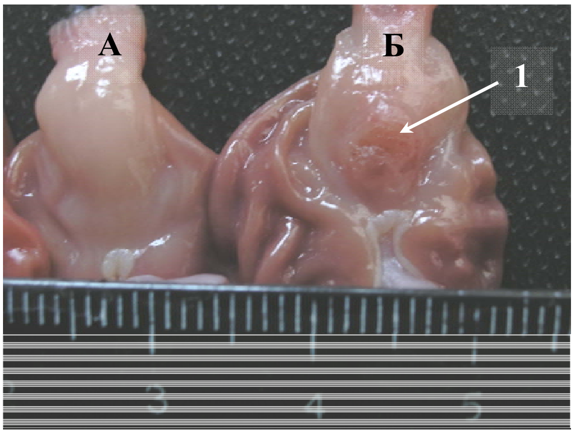


Рис. 2. Макроскопічні зміни слизової оболонки шлунка через 18 тижнів експериментального гастроканцерогенезу, індукованого розчином 0,01% MNNG в питній воді. А – контроль, Б – 18 тиждень гастроканцерогенезу. 1 – пухлина

Виявлене зниження концентрації глутатіону може бути наслідком підвищеного метаболізму через його безпосереднє залучення в детоксикацію цитотоксичних, канцерогенних сполук ендогенного та екзогенного походження, АФК з утворенням його окисленої форми (GSSG) та глутатіонових кон'югатів шляхом утилізації GSH за участі глутатіонпероксидази та глутатіонтрансферази. Також причиною зниження вмісту глутатіону може бути надмірний його катаболізм та експорт з клітин. Дефіцит глутатіону або зниження відношення GSH/GSSG проявляється підвищеною чутливістю до окисного стресу, а пошкодження, що виникають в результаті цього, задіяні в таких захворюваннях як рак [5].

Експорт глутатіону можливий завдяки наявності зв'язаних з плазматичною мембраною низькоафінних АТФ-залежних GSH-транспортерів, функціонуванні яких в клітинах ссавців обумовлено білками MRP (multidrug resistance-associated proteins) [5], а також завдяки GSH-обмінникам. В літературних джерелах є відомості, що деякі пухлинні клітини мають підвищену γ-глутамілтранспептидазну активність, яка відповідає за ініціацію розпаду глутатіону та глутатіонвмісних молекул, і високий рівень експресії глутатіон-експортуючих MRP білкових помп [5].

Отримані нами дані співвідносяться з результатами інших авторів, які показали, що в зразках тканини шлунків щурів, які відбирались через 25 тижнів після 14-добового інтрагастрального введення МННГ (200 мг/кг ваги) та насиченого розчину NaCl двічі на тиждень протягом перших трьох тижнів, концентрація GSH знизилась на 48% в порівнянні з контрольними зразками [2]. Також показано, що в біоптатах хворих на карциному шлунка рівень GSH був знижений на 50%. В зразках з діагнозом гострого гастриту не виявлено жодних змін досліджуваного параметру, а зразки з хронічним атрофічним гастритом, мали тенденцію до підвищення рівня глутатіону [13].

Висновки. Виявлені нами особливості змін концентрації відновленого глутатіону в загальній фракції клітин слизової оболонки шлунка за умов гастроканцерогенезу свідчать про порушення глутатіонового гомеостазу глутатіону, що може бути задіяне в ініціації та розвитку патології. На підставі отриманих даних актуальним стає всебічне дослідження стану глутатіонової антиоксидантної системи та систем, які з нею пов'язані.

1. Букин Ю.В., Драудин-Крыленко В.А. Молекулярно-биологические механизмы гастроканцерогенеза и подходы к профилактике рака желудка // Успехи биологической химии. – 2000. – Т.40. – С.329-356. 2. Gunassekaran G.R., Gayathri R., Priya D.K.D. et al. Protective role of gossypol against N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine induced gastric carcinogenesis in experimental rats // International Journal of Medicine and Medical Sciences. – 2010. – V.2(4). – P.121-127.3. Имянитов Е.Н. Эпидемиология и биология рака желудка // Практическая онкология. – 2009. – Т.10. – №1. – С.1-7. 4. Pasupathi P., Saravanan G., Chinnaswamy P., Bakthavathsajam G. Glutathione, glutathione-dependent enzymes and antioxidant status in gastric carcinoma patients // J. of Appl. Biomed.–2009. – №.7. – P.101-109. 5. Ballatori N., Krance S.M., Notenboom S. et al. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases // Biol. Chem. – 2009. – V.390(3). – P.191-214. 6. Helieh S. Oz and Jeffrey L. Ebersole. Application of Prodrugs to Inflammatory Diseases of the Gut // Molecules. – 2008. – №.13. – P.452-474. 7. Okazaki K., Ishii Y., Kitamura Y. et al. Dose-dependent promotion of rat forestomach carcinogenesis by combined treatment with sodium nitrite and ascorbic acid after initiation with N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine: possible contribution of nitric oxide-associated oxidative DNA damage // Cancer Sci. – 2005. – V.97. – P.175-182. 8. Roediger W.E.W. Methods of preparing isolated colonic epithelial cells (colonocytes) for metabolic studies / Roediger W.E.W., Truelove S.C. // Gut. – 1979. – Vol. 20. – P.484–488. 9. Таиров М.М., Берсимбаев Р.И., Аргутинская С.В.,Салгани Р.И. Клеточная локализация аденилатциклаз, стимулируемых гистамином и простагландином Е2 в слизистой оболочке желудка крыс и их роль в регуляции желудочной секреции // Биохимия. – 1983. – Т.48. – №6. – С.1035-1041. 10. Hissin P. and R. Hilf. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues // Analytical Biochemistry. – 1976. – V.74. – P.214-226. 11. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for quantities of utilizing the principle of protein binding // Analytical Biochemistry. – 1976. – V.86. – P.193-200. 12. Boyd S., Sasame H., Boyd M. High concentrations of glutathione in glandular stomach: possible implications for carcinogene // Science. – 1979. – V.205. – P.1010-1012. 13. Hoppenkamps R., Thies E., Younes M. and Siegers C.-P. Glutathione and glutathione-dependent enzymes in the human gastric mucosa // Klinische Wochen-schrift. – 1984. – №62. – P.183-186. 14. Campbell-Thompson M., Lauwers G.Y. et al. 17β-Estradiol modulates gastroduodenal preneoplastic alterations in rat exposed to the carcinogen N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine // Endocrinology. – 1999. – V.140. – №10. – P.4886-4894. 15. Зенков Н.К, Меньщикова Е.Б., Ткачев В.О. Некоторые принципы и механизмы редокс-регуляции // Кислород и антиоксиданты. – 2009. – Вып.1. – С.3-64. 16. Uchida Y., Schlake W., Roessner A., Ruhland D., Themann H. and Grundmann E. Development of Tumors in the Glandular Stomach of Rats after Oral Administration of Carcinogens // Zeitschrift fur Krebsforschung und Klinische Onkologie. – 1976. – №.87. – с.199-212.

Надійшла до редколегії 08.04.11

УДК 634.8:577.12

В. Стороженко, канд. біол. наук, А. Грудіна, студ.,
В. Макаренко, пров. інж., В. Прокопець, канд. фіз.-мат. наук

ВПЛИВ ОСВІТЛЕННЯ ВУЗЬКОГО СПЕКТРАЛЬНОГО ДІАПАЗОНУ НА ПІГМЕНТНІ СИСТЕМИ *KALANCHOE BLOSSFELDIANA*

Досліджували вплив випромінювання вузького спектру (450-460 нм, 610-660 нм) на вміст та співвідношення головних фотосинтетичних пігментів у листках Kalanchoe blossfeldiana. Виявлено, що освітлення рослин світлом з даними спектральними характеристиками індукує накопичення хлорофілу, каротиноїдів в листках та підвищення потенційної активності ФС ІІ.

The influence of limited spectrum of radiation (450-460 nm, 610-660 nm) on main photosynthetic pigments content in leaves of Kalanchoe blossfeldiana was investigated. It was revealed, that illumination of plants by light with this spectrum characteristics induced chlorophyll and carotenoids accumulation in leaves and increasing of potential PS II activity.

Вступ. На сучасному етапі розвитку агропромислового комплексу одним з найважливіших невирішених питань є зменшення енергоємності агротехнологій на фоні їх постійної інтенсифікації у зв'язку з ростом населення земної кулі. В умовах постійного росту вартості кінцевих продуктів виробництва енергетичного сектору (паливо, електроенергія та ін.) закономірно збільшується собівартість продукції агровиробництва, в тому числі і рослинництва. На шляху до вирішення питання зниження енерговитрат у аграрному секторі лежить розробка нових технологій отримання продукції з низькою собівартістю та високою конкурентноспроможністю на світовому ринку. На допомогу цьому мають бути задіяні нові агротехнології, які забезпечать сталі показники біологічної продуктивності рослин з низьким рівнем енерговитрат [9].

Світловий режим рослин – один з найбільш важливих факторів пригнічення або, навпаки підвищення ефективності фотосинтезу, процесу, напряму пов'язаного з урожайністю. Збільшення ефективності фотосинтезу, покращення асиміляційної здатності фотосинтетичного апарату залежить від функціонування його пігментних систем, які приймають участь у фіксації та первинних етапах перетворення енергії сонячного світла. Тому пошук ефективних механізмів посилення фотоасиміляції за рахунок зовнішніх джерел освітлення є важливим та актуальним завданням сучасної фітофізіології [7].

Як відомо, рослини здатні поглинати енергію сонячного випромінювання в досить широкому спектрі денного світла – 380-710 нм. Цей спектр носить назву фотосинтетично активної радіації (ФАР). Однак, максимуми поглинання хлорофілів – головних фотосинтетичних пігментів знаходяться в межах 640-680 нм, а каротиноїдів – в межах 470-480 нм [2, 3, 4]. Застосування у агровиробництві джерел освітлення з вузькими діапазонами спектрального складу випромінюваного світла може становити практичний інтерес, оскільки допоможе розширити уявлення про роль світла окремих ділянок спектру у функціонуванні пігментних систем фотосинтетичного апарату рослин, а у подальшому – і у формуванні біологічної продуктивності рослин, яка безпосередньо пов'язана з їх фотосинтетичною діяльністю.

Прогресивна оптимізація світлового режиму рослин для різних культур в історичному аспекті закономірно виникала паралельно з технічним вдосконаленням систем освітлення. На початкових етапах розвитку цього напряму фітофізіології (середина XIX – 60-і роки XX століття) вчені застосовували в значній мірі емпіричний підхід до вирішення питань, пов'язаних із штучним опроміненням, що було пов'язано з відносно малими знаннями про потреби рослин у випромінюванні (його спектрального складу, величині і тривалості протягом дня) [10]. Тому розвиток і прогрес світлокультури рослин визначалися головним чином розвитком фізики і прогресом у світлотехнічній промисловості. Революційним стало відкриття електролюмінесценції в 20-і роки XX століття. Російським фізиком Лосєвим було відкрито ефект слабкого світіння кристалів карборунда при пропусканні через них електричного струму, тобто прямого перетворення енергії електричного струму в світлову. В наш час одними з найбільш перспективних матеріалів для створення світлодіодів для промислового рослинництва є нітрид галлію (GaN) (синє та зелене світло), фосфід галію (GaP) та алюмінію-галію арсенід (AlGaAs) (червоне світло) [5, 8].

Насьогодні перспективними є агротехнології рослинництва, які базуються на принципі освітлення рослин джерелами, які мають визначений спектр випромінювання з підвищеною спектральною ефективністю в синій області у порівнянні зі стандартними люмінесцентними лампами денного освітлення (світлодіодні панелі та конструкції) [1].

Лампи BS-57 компанії Baisheng (Китай) розроблені для оптимізації світлового режиму вирощування рослин, мають низький рівень енергоспоживання, представляють собою світлодіодну панель, на якій, за рахунок співвідношення світлодіодів з різними спектрами, загальний спектральні діапазони випромінювання ламп знаходяться в межах 450-460 нм (синє світло) та 610-660 нм (оранжеве та червоне світло) [13].

Виходячи з викладених вище закономірностей, метою нашої роботи стало дослідження впливу освітлення вузького спектрального складу на стан пігментних систем фотосинтетичного апарату рослин Каланхое Блоссфельда (*Kalanchoe blossfeldiana*), оптимальне проходження генеративного періоду розвитку яких безпосередньо залежить від кількісних та якісних характеристик світлового режиму їх вирощування.

Матеріали і методи. дворічні рослини *Kalanchoe blossfeldiana* сортів TIMOR та Brilliant star (генеративний період розвитку) вирощували в умовах 16 годинного фотоперіоду під лампами денного освітлення L 30W/77 (Fluora). Потім частину рослин переносили під лампи BS-57 компанії Baisheng (Китай) на 60 діб. Вимірювання пігментного складу листків проводили на 20-у та 60-у добу експозиції рослин в умовах освітлення лампами BS-57. Загальна інтенсивність освітлення в обох варіантах складала 15 Вт/м^2, рослини вирощували при температурі 20 ^{o}С. Вологість ґрунту у вегетаційних посудинах підтримували на рівні 60 % від ПВ [12].

Для визначення вмісту хлорофілу використовували висічки з 2-го ярусу листків за допомогою свердел діаметром 5 мм. Екстракцію та визначення вмісту фотосинтетичних пігментів проводили за Вельбурном [16]. Статистичну обробку експериментальних результатів проводили за Доспєховим [6] з використанням програми "Microsoft Excel".

Результати та їх обговорення. ісля експозиції рослин протягом 20 діб в умовах вузького спектру ФАР спостерігали достовірне збільшення площі листкової поверхні у рослин каланхое Блоссфельда сортів TIMOR та Brilliant star на 8 та 21 %, відповідно (рис. 1).

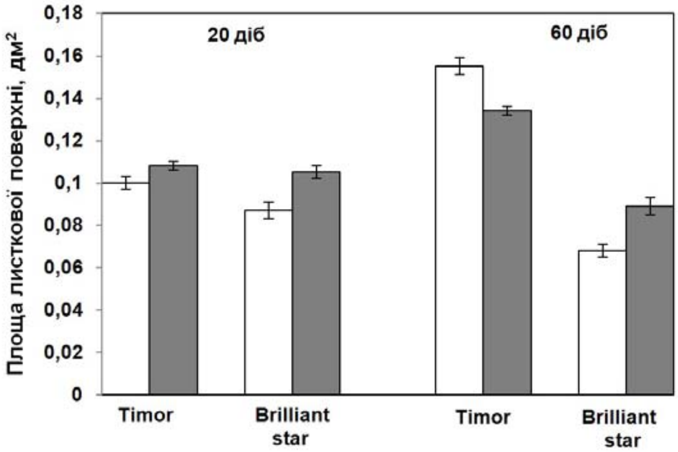
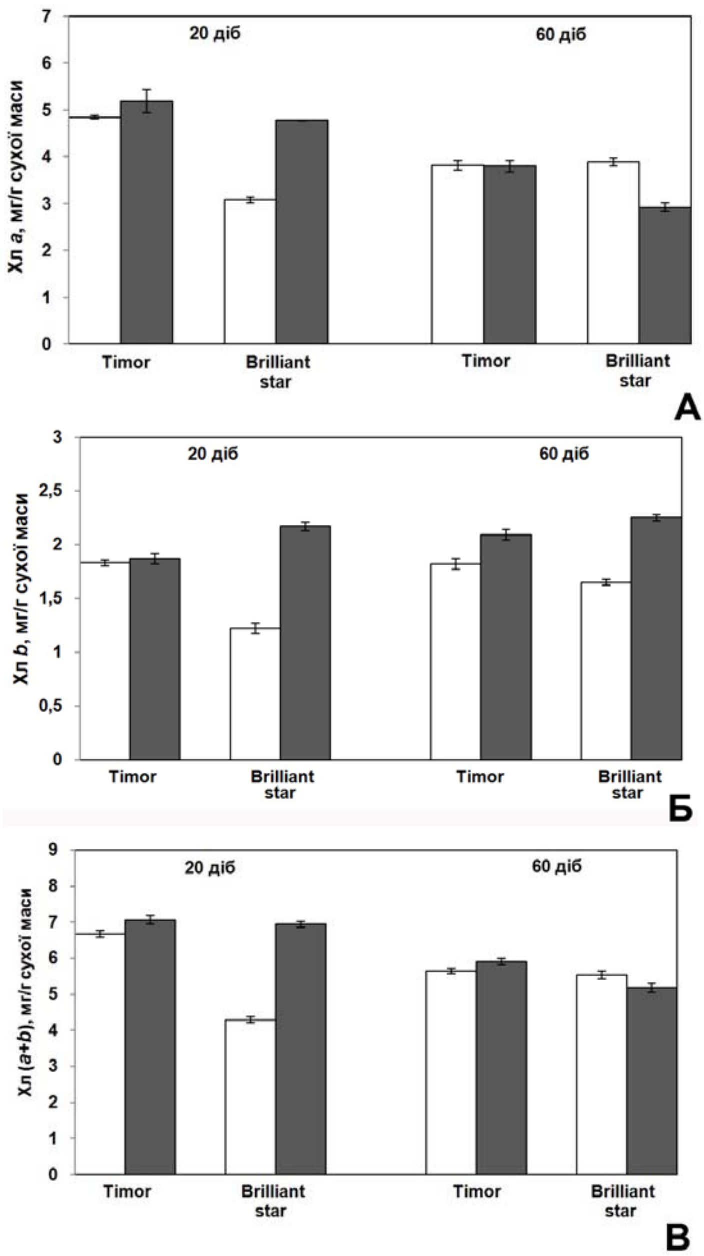


Рис. 1. Вплив умов освітлення вузького спектрального діапазону на площу листкової поверхні двох сортів *Kalanchoe blossfeldiana.* Білі стовпчики – контроль, сірі – дослід

Водночас, суттєво збільшувався вміст хлорофілу *a* (хл *a*) в листках на 7 (для сорту TIMOR) та 55 % (для сорту Brilliant star) (рис 2А). Вміст хлорофілу *b* (хл *b*) залишався для сорту TIMOR в межах контрольних значень, однак для сорту Brilliant star він сильно збільшувався – на 78 % (рис. 2Б).



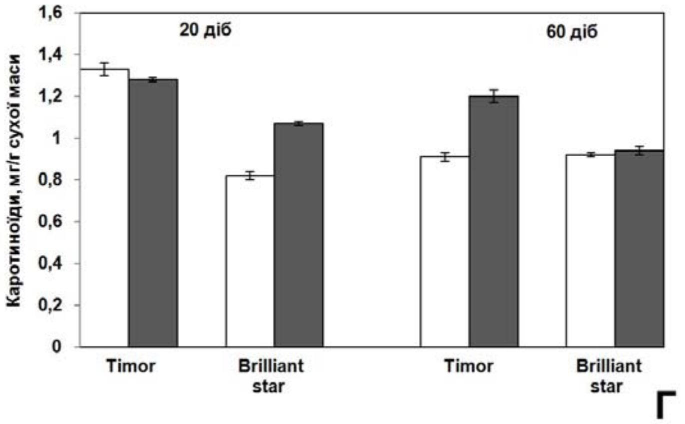


Рис. 2. Вплив освітлення вузького спектрального діапазону на вміст хлорофілу *a* (А), хлорофілу *b* (Б), загальної суми хлорофілів (В) та каротиноїдів (Г) в листках двох сортів *Kalanchoe blossfeldiana*. Білі стовпчики – контроль, сірі – дослід

Сумарний вміст обох форм хлорофілу в листках збільшувався на 6 та 62 % для сортів каланхое TIMOR та Brilliant star (рис.2В). Однак, їх співвідношення залишалося в межах контрольних значень для сорту TIMOR, а для сорту Brilliant star – знижувалося на 14 % (рис. 3А). Сумарний вміст каротиноїдів в листках в умовах освітлення рослин світлом вузького спектрального діапазону підвищувався на 30 % для сорту Brilliant star (рис. 2Г), водночас, збільшувалося співвідношення хлорофіли (a+b)/каротиноїди в умовах освітлення рослин лампами вузького спектру – на 11% та 22 % (рис. 3А).

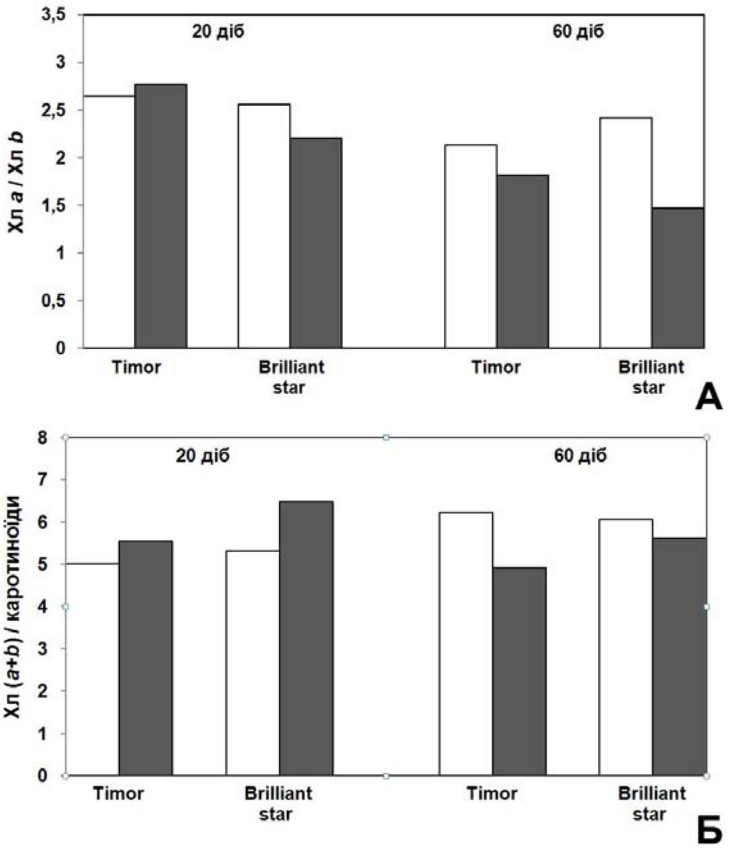


Рис. 3. Вплив освітлення вузького спектрального діапазону на співвідношення фотосинтетичних пігментів: хл *a* / хл *b* (А) та хл (a+b) / каротиноїди (Б) в листках двох сортів *Kalanchoe blossfeldiana*. Білі стовпчики – контроль, сірі – дослід

На 60 добу вирощування рослин під лампами вузького спектрального складу спостерігали зменшення площі листкової поверхні для рослин *Kalanchoe blossfeldiana* сорту TIMOR на 14%. Водночас, для сорту Brilliant star загальна картина була протилежною – площа листкової поверхні рослин в умовах освітлення лампами з випромінюванням світла вузького спектрального складу підвищувалася на 31 % (рис. 1А).

Зміни вмісту фотосинтетичних пігментів на 60 добу освітлення лампами вузького хвильового спектру відрізнялися від першої дати вимірювання. Зокрема, вміст хл *a* в листках каланхое сорту Brilliant star знижувався на 25 % (рис. 2А). Тенденція до індукції світлом вузького хвильового спектру накопичення хл *b* була такою ж, як і у минулу дату вимірювання. Так, вміст цієї форми хлорофілу був вищим на 15 % та 36 % для сортів TIMOR та Brilliant star у порівнянні з освітленням лампами ДРЛ стандартного хвильового діапазону (400 – 700 нм) (рис. 2Б). Загальний вміст хлорофілів в листках в умовах освітлення лампами вузького спектрального діапазону був вищим для сортів TIMOR та Brilliant star на 6 % та 62 %, відповідно (рис. 2В). Співвідношення хл *a* / хл *b* для вищезгаданих сортів знижувалося на 15 та 39 % в цілому за рахунок зменшення вмісту хл *a* для сорту Brilliant star та підвищення вмісту хлорофілу *b* в листках обох сортів каланхое (рис. 3А).

Співвідношення (хл *a* + хл *b*) / каротиноїди також знижувалося на 21% та 7 % за рахунок достовірного підвищення вмісту каротиноїдів в листках рослин каланхое сорту TIMOR, незмінного вмісту каротиноїдів та несуттєвого зниження загального вмісту хлорофілу в листках рослин каланхое сорту Brilliant star (рис. 2В-Г, рис. 3Б).

Слід зазначити, що збільшення вмісту хл *a* в листках рослин *Kalanchoe blossfeldiana* сортів Timor та Brilliant star в умовах освітлення світлодіодною конструкцією BS-57 може свідчити про посилення процесів біосинтезу цієї форми хлорофілу під впливом світла вузького спектрального складу (450-460 нм та 610-660 нм). Водночас, для останнього сорту підвищення вмісту хл *b* було суттєвішим, за рахунок чого співвідношення хл *a* / хл *b* знижувалося, що, за класичними уявленнями, може свідчити про підвищення потенційної активності ФС II. Це пояснюється тим, що головним світлозбиральним пігментом ФС I у хлоропластах виступає хл *a*, а у ФС II – хл *a* і хл *b*. Тому, чим нижчим є співвідношення хл *a* / хл *b*, тим вищою є потенційна активність ФС II [11].

Збільшення накопичення сумарної фракції каротиноїдів – допоміжних пігментів фотосинтетичного апарату на 20 добу вирощування рослин каланхое знову ж таки було характерним для сорту Brilliant star, що ймовірно, пов'язане з інтенсифікацією процесів біосинтезу каротиноїдів, виходячи з двох факторів – спектральних характеристик ламп BS-57 (максимуми поглинання більшості каротиноїдів вищих рослин, окрім γ-каротину та неоксантину [3, 4], знаходяться в межах 450-460 нм, тобто в одному з спектральних діапазонів випромінювання ламп), а також зі специфічними особливостями вищезгаданого сорту, які проявилялися в активації синтезу каротиноїдів на 20 добу вирощування рослин каланхое сорту Brilliant star.

Співвідношення (хл *a* + хл *b*) / каротиноїди підвищувалося на 20-у добу експозиції рослин каланхое обох сортів в умовах освітлення лампами вузького спектрального діапазону за рахунок більш інтенсивного накопичення хлорофілів в листках у порівнянні з каротиноїдами.

На 60-у добу освітлення рослин лампами BS-57 вміст та співвідношення фотосинтетичних пігментів в листках каланхое обох сортів змінювалося. Так, вміст хл *a* в листках каланхое сорту Timor в умовах освітлення світлодіодною панеллю залишався на рівні контрольних значень, а для сорту Brilliant star – знижувався на 25 % в порівнянні з контролем що може бути пов'язане зі зниженням впливу освітлення вузького спектру на біосинтез хл *a*, викликаним активним синтезом цієї форми хлорофілу у попередній період освітлення.

Вміст хл *b* підвищувався в умовах освітлення світлодіодною панеллю BS-57 у обох сортів, хоча співвідношення хл *a* /хл *b* знижувалося для обох сортів, що, знову ж таки, як і у попередньому вимірюванні, вказує на підвищення потенційної активності ФС II в умовах модифікованого світлового режиму.

Сумарний вміст обох форм хлорофілу в умовах вирощування рослин під світлом вузького спектрального діапазону залишався на рівні попередніх значень для сорту Timor, а для сорту Brilliant star – знижувався на 7 %. Водночас, це, можливо, пов'язано з генетично детермінованими флуктуаціями змін вмісту хлорофілу для даного сорту. Імовірно, по цій же причині на 60 добу вирощування рослин знижувалося співвідношення (хл *a* + хл *b*) / каротиноїди.

За даними іноземних дослідників, синє світло (440-485 нм) активувало синтез амінолевулінової кислоти – ключової сполуки у біосинтезі порфіринів [14], та хлорофіліду – найближчого до хлорофілу попередника в процесі біосинтезу останнього [15] з одночасним зростанням загального вмісту хлорофілу в калюсних клітинах *Nicotiana tobacco*. Накопичення хлорофілів і каротиноїдів, виходяли з більш оптимальних для вирощування рослин спектральних характеристик світодіодних панелей у порівнянні з люмінесцентними лампами денного світла пояснюється саме високою спектральною ефективністю останніх у синій області спектру [1].

В цілому слід зазначити, що використання світлодіодної панелі BS-57 з вузькими хвильовими спектрами випромінювання для вирощування рослин індукує накопичення хлорофілів та каротиноїдів у листках *Kalanchoe blossfeldiana,* що позитивно впливає на стан їх фотосинтетичного апарату, оптимальне функціонування якого, в свою чергу, визначає високу біологічну продуктивність. Дослідження можливих фізіологічних ефектів, індукованих освітленням рослин різних видів та екотипів світлодіодними панелями та конструкціями з вузьким хвильовим спектром в подальшому допоможе в розробці нових та вдосконаленні вже існуючих технологій оптимізації вирощування культурних рослин різних видів в умовах закритого ґрунту.

Висновки. Застосування ламп BS-57 з вузьким спектральним діапазоном для оптимізації світлового режиму рослин сприяє накопиченню хлорофілу та каротиноїдів в листках *Kalanchoe blossfeldiana* та підвищенню потенційної активності ФС II.

1. БахаревИ., Прокофьев А., Туркин А. Яковлев А. Применение светодиодных светильников для освещения теплиц: реальность и перспективы // Современные технологии автоматизации. – 2010. – 2. – С. 76-82. 2. БриттонГ. Биохимия природных пигментов: Пер. с англ. – М., Мир. – 1986. – 422 с. 3. ГудвинТ., Мерсер Э. Введение в биохимию растений: В 2 т. Т. 1. – М.: Мир. – 1986. – 392 с. 4. ГудвинТ., Мерсер Э. Введение в биохимию растений: В 2 т. Т. 2. М.: Мир, 1986. 312 с. 5. Гужов С., Полищук А., Туркин А. Концепция применения светильников со светодиодами совместно с традиционными источниками света // Современные технологии автоматизации. – 2008. – 1. – С. 14-18. 6. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – Москва. – "Агропромиздат". – 1985. – 350 с.7. ПротасовН.Н. Светокультура как способ выявления потенциальной продуктивности растений //Физиология растений. – 1987. – 34, № 4 – С.812-822. 8. Справочная книга по светотехнике / Под ред. Ю.Б Айзенберга. 3-е изд. перераб. и доп. – М.: Знак. – 2006. – 972 с. 9.Тарарико Ю.А. Формирования устойчивых агроэкосистем. – К.: ДИА, 2007. – 560 с.10. ЧервінськийЛ.С., Сторожук Л.О. Світлокультура рослин. Процес становлення // "Енергетика і автоматика". – 2010 – № 3(5). [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://www.nbuv.gov.ua/e-journals/eia/2010_3/10clspog.pdf 11.Едвардс ., Уокер Д. Фотосинтез С3- и С4- растений: механизмы и регуляция: Пер. с англ. – М: Мир. – 1986. – 590 с. 12. ЮдінФ.А. Методика агрохимических исследований – М.: Колос, 1971. – 272 с. http://www.bsled.com. 12. KamiyaA., Ikegami I., Hase E. Effects of light on chlorophyll formation in cultured tobacco cells. II. Blue light effect on 5-aminolevulinic acid formation // Plant Cell Physiol. – 1983. – 24, № 5. – P. 799-809.13. Kamiya A., Ikegami I., Hase E. Effects of light on chlorophyll formation in cultured tobacco cells. I. Chlorophyll accumulation and phototransformation of protochlorophyll(ide) in callus cells under blue and red light // Plant Cell Physiol. – 1981. – 22, № 8. – P. 1385-1396.14Wellburn, A. R. The spectral determination of chlorophyll a and chlorophyll b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution // Journal of Plant Physiology. – 1994. – 144,№3. – P. 307-313.

Надійшла до редколегії 20.04.11

Наукове видання

ВІСНИК

КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ПРОБЛЕМИ РЕГУЛЯЦІЇ ФІЗІОЛОГІЧНИХ ФУНКЦІЙ

Випуск 14

Друкується за авторскою редакцією

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

Підписано до друку 26.04.11. Формат 60x84 1/8. Вид. № 23. Гарнітура Arial. Папір офсетний. Друк офсетний. Наклад 300. Ум. друк. арк. 10,0. Обл.-вид. арк. 7,9. Зам. № 211-5655

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_div.chief@univ.kiev.ua
http: vpc.univ.kiev.ua