

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

Для викладачів, наукових співробітників, аспірантів та студентів.

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

Для преподавателей, научных сотрудников, аспирантов и студентов.

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

For scientists, professors, aspirants and students.

ВІДПОВІДАЛЬНИЙ РЕДАКТОР РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ	Л.І. Остапченко, д-р біол. наук, проф. Є.О. Торгалло, канд. біол. наук (відп. секр.); С. Є. Вакал, асист. (техн. секр.); С. Сабо, д-р біол. наук, проф. (м. Ірвайн, США. Університет Каліфорнії); О.В. Жолос, д-р біол. наук, проф. (Королівський університет Белфаста, м. Белфаст, Великобританія); С. Ю. Морозов, д-р біол. наук, проф. (Московський державний університет ім. М.В. Ломоносова, м. Москва, РФ); М. Шандор, д-р біол. наук, проф. (Західно-Угорський Університет, м. Сомбатхей, Угорщина); С. Юозас, д-р біол. наук, проф. (Інститут ботаніки, м. Вільнюс, Литва); Б. Каленгхем, проф. (м. Кембридж, Великобританія); В.О. Іваниця, д-р біол. наук, проф.; Т.В. Берегова, д-р біол. наук, проф.; Д.Н. Говорун, д-р біол. наук, проф.; Дж. Воллес, д-р біол. наук, проф. (Торонто, Онтаріо, Канада); М.С. Зефіров, д-р біол. наук, проф.; І. Г. Ємельянов, д-р біол. наук, проф.; Е.М. Дзержинський, д-р біол. наук, проф.; І. Ю. Костіков, д-р біол. наук, проф.; О. Я. Скларов, д-р біол. наук, проф.; В.С. Мартинюк, д-р біол. наук, проф.; М. Ю. Макаруч, д-р біол. наук, проф.; В. П. Поліщук, д-р біол. наук, проф.; В. К. Рибальченко, д-р біол. наук, проф.; Н.Ю. Таран, д-р біол. наук, проф.; А.В. Сиволоб, д-р біол. наук, проф.; А.Г. Мойсеєнок, д-р біол. наук, проф., чл.-кор. НАН Білорусії
Адреса редколегії	03127, Київ-127, просп. акад. Глушкова, 2а, ННЦ "Інститут біології"; ☎ (38044) 521 35 98
Затверджено	Вченою радою ННЦ "Інститут біології" 12.06.14 (протокол № 12)
Атестовано	Вищою атестаційною комісією України. Постанова Президії ВАК України № 1-05/1 від 10.02.10
Зареєстровано	Міністерством юстиції України. Свідоцтво про державну реєстрацію КВ № 16053-4525 ПР від 09.11.09
Засновник та видавець	Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет". Свідоцтво внесено до Державного реєстру ДК № 1103 від 31.10.02
Адреса видавця	01601, Київ-601, 6-р Т.Шевченка, 14, кімн. 43 ☎ (38044) 239 31 72, 239 32 22; факс 239 31 28

ЗМІСТ

Омельченко Ю., Сокур О., Остапченко Л. Активність NO-синтази мозку щурів із сформованою алкогольною залежністю за умов введення оцтовокислого цинку	5
Верещака В. Роль гіпертонічної хвороби у розвитку морфологічних змін шкіри: гістохімічне дослідження	9
Гармаш Я., Мінченко Д., Харькова А., Мінченко О. Експресія мРНК G6PD, TALDO1, TKT, PGLS ТА RPIA у клітинах з пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1 за умов дефіциту глюкози	14
Скочко Н., Торгалю Є., Берегова Т. Вікові зміни секреції гідрохлоридної кислоти та пепсину у шлунку щурів	20
Бекмухамедова В., Вороніна О., Фалалеева Т. Доклінічне дослідження гострої токсичності препарату "Кокарніт" на щурах	22
Бояльська О., Киричук І., Шпита О., Бойко А. Поширення вірусу грипу серед різних груп населення Житомирської області	25
Добростан О., Плиська О., Філімонова Н. Функціональний стан центральної нервової системи (ЦНС) студенток з різним індексом маси тіла в динаміці першого року навчання	28
Франкевич Д., Гребіник Д., Матишевська О. Доксорубіцин – модулятор продукування активних форм кисню та рівня цитозольного Ca^{2+} у нормальних і лейкемічних клітинах	32
Єфіменко О., Савченко Ю., Нуріщенко Н., Жолобак Н., Співак М. Скоротлива активність гладеньких м'язів шлунку та товстої кишки у щурів за умов 10-денного введення нанокристалічного діоксиду церію	35
Пилипенко С., Шелюк О., Цейслер Ю., Нурищенко Н., Берегова Т. Вплив блокади кальцієвих каналів L-типу на моторику шлунка у щурів за умов тривалого введення омепразолу	39
Світін Р., Кілючицький П. Гельмінтофауна масових видів безхвостих амфібій (<i>AMPHIBIA: ANURA</i>) на території НПП "Кармелюкові Поділля"	43
Корінчак Л. Стан кардіореспіраторної системи у дівчаток 8-12 років в залежності від пори року	45
Маркевич А., Фалалєєва Т., Богун Л., Харченко О. Вплив низькомолекулярної органічної сполуки на базальну шлункову секрецію у щурів	49
Яненко В. Особливості розподілу популяцій перепела (<i>COTURNIX COTURNIX L.</i>) в агроценозах України	52
Яценко О., Яценко В. Особливості змін показника мінливості еритроцитів у спортсменів під час тренувального процесу	56
Андрійчук Т. Редокс-чутливі ланки радіаційно-індукованого апоптозу	58
Матвієнко М., Кривошеєв Р., Акімов Ю., Пустовалов А., Держинський М. Морфологічно-функціональні зміни клітин преоптичного ядра гіпоталамуса щурів при взаємодії α - адренергічної та кісептинергічної систем	62
Драницина А., Савко У., Дворченко К., Моргасенко О., Верещака В. Експресія гена PAR2 в епітеліоцитах дванадцятипалої кишки щурів за умов тривалої гіпоацидності шлунка та при введенні мультипробіотика Симбітер	65
Голишкін Д., Вірченко О., Фалалєєва Т., Галенова Т., Савчук О. Вміст цитокінів у сироватці крові щурів за умов дії стресу та введення меланіну	69
Пшиченко В. Гістофізіологічний стан епіфізу щурів в умовах хронічного стресу	73
Кузнєцова М., Галенова Т., Савчук О., Болібрех Х., Половкович С. Пошук інгібіторів тирозинових протеїніназ серед похідних хінонів та хіноксалінів	76
Цирюк О., Берегова Т. Пошук засобів корекції структурно-функціональних змін в шлунку за умов тривалої гіпоацидності	80
Мельник М., Мартинюк В., Артеменко О. Вплив електромагнітних полів частотами 8 і 50 Гц на динаміку концентрації внутрішньоклітинного кальцію в гладеньком'язових клітин	83
Ноздренко Д. Захисний ефект фуллерену C_{60} на розвиток процесів втоми в <i>MUSCLE SOLEUS</i> щура після штучної ішемізації	86
Гарманчук Л. Епідермальний фактор росту підсилює цитотоксичний/цитостатичний ефект німотузамабу та проапоптичну дію β - D- кіслофуранозиду на клітини раку молочної залози	89

СОДЕРЖАНИЕ

Омельченко Ю., Сокур О., Остапченко Л. Активность NO-синтазы мозга крыс из сформированной алкогольной зависимостью в условиях введения уксусноникотината цинка	5
Верещака В. Роль гипертонической болезни в развитии морфологических изменений кожи: гистохимическое исследование	9
Гармаш Я., Минченко Д., Харьков А., Минченко А. Экспрессия мРНК G6PD, TALDO1, TKT, PGLS И RPIA в клетках с подавленной функцией сигнального энзима ERN1 в условиях дефицита глюкозы	14
Скочко Н., Торгалю Е., Береговая Т. Возрастные изменения секреции гидрохлоридной кислоты и пепсина в желудке крыс	20
Бекмухамедова В., Воронина Е., Фалалеева Т. Доклиническое исследование острой токсичности препарата "Кокарнит" на крысах	22
Бояльская О., Киричук И., Шпита А., Бойко А. Распространение вируса гриппа среди разных групп населения Житомирской области	25
Добростан О., Плиски А. Функциональное состояние центральной нервной системы (ЦНС) студентов с разным индексом массы тела в динамике первого года обучения	28
Франкевич Д., Гребиник Д., Матишевская О. Доксорубин – модулятор продукции активных форм кислорода и уровня цитозольного Ca^{2+} в нормальных и лейкемических клетках	32
Ефименко Е., Савченко Ю., Нуриченко Н., Жолобак Н., Спивак Н. Сократительная активность гладких мышц желудка и толстой кишки у крыс после 10-дневного введения нанокристаллического диоксида церия	35
Пилипенко С., Шелюк О., Цейслер Ю., Нуриченко Н., Береговая Т. Влияние блокады кальциевых каналов L-типа на моторику желудка у крыс в условиях длительного введения омепразола	39
Свитин Р., Килощичий П. Гельминтофауна массовых видов безхвостых амфибий (<i>AMPHIBIA: ANURA</i>) на территории НПП "Кармелюкове Подиля"	43
Коринчак Л. Состояние кардиореспираторной системы у девочек в зависимости от времени года	45
Маркевич А., Фалалеева Т., Богун Л., Харченко О. Влияние низкомолекулярного органического соединения на базальную желудочную секрецию у крыс	49
Яненко В. Особенности распределения популяций перепела (<i>COTURNIX COTURNIX L.</i>) в агроценозах Украины	52
Яценко О., Яценко В. Особенности изменения показателей изменчивости эритроцитов у спортсменов в ходе тренировочного процесса	56
Андрийчук Т. Редокс-чувствительные звенья радиационно-индуцированного апоптоза	58
Матвиенко М., Кривошеев Г., Акимов Ю., Пустовалов А., Дзержинский М. Морфофункциональные изменения клеток преоптического ядра гипоталамуса крыс при взаимодействии α -адренергической и кинспептинергической системы	62
Драницина А., Савко У., Дворченко Е., Моргаенко А., Верещака В. Экспрессия гена <i>Par2</i> в эпителиоцитах двенадцатиперстной кишки крыс при длительной желудочной гипокислотности и при введении мультитипробактерии Симбитер	65
Голишкин Д., Вирченко А., Фалалеева Т., Галенова Т., Савчук А. Содержание цитокинов в сыворотке крови в условиях действия стресса и введения меланина	69
Пшиченко В. Гистофизиологическое состояние эпифиза крыс в условиях хронического стресса	73
Кузнецова М., Галенова Т., Савчук А., Болибрух Х., Половкович С. Поиск ингибиторов тирозинных протеинкиназ среди производных хинонов и хиноксалинов	76
Цирюк Е., Береговая Т. Поиск средств коррекции структурно-функциональных изменений в желудке при длительной гипокислотности	80
Мельник М., Мартынюк В., Артеменко А. Влияние электромагнитных полей 8 и 50 Гц на динамику концентрации внутриклеточного кальция в гладкомышечных клетках	83
Ноздренко Д. Защитный эффект фуллерена C_{60} на развитие процессов усталости в muscle soleus крысы после искусственной ишемизации	86
Гарманчук Л. Эпидермальный фактор роста усиливает цитотоксический/цитостатический эффект нимотузамабу и проапоптотическое действие β -D-ксилофуранозиды на клетки рака молочной железы	89

CONTENTS

Omelchenko Yu., Sokur O., Ostapchenko L. Activity NO-synthase rat brain from formation of alcohol dependence under introduction acetate zinc	5
Vereshchaka V. The influence of hypertension on the development of morphological changes in skin: histochemical investigation	9
Garmash I., Minchenko D., Kharkova A., Minchenko O. Expression of G6PD, TALDO1, TKT, PGLS and RPIA mRNA in glioma cells with blockade of ERN1 signaling enzyme function in glucose deprivation conditions	14
Skochko N., Torgalo E., Beregova T. Age-related changes in gastric secretion of hydrochloric acid and pepsin in rats	20
Bekmukhamedova V., Voronina O., Falalyeyeva T. Preclinical study of acute toxicity "Cokarnit" in rats	22
Boyalska O., Kyrychuk I., Shpyta O., Boyko A. The spread of influenza virus among different populations of Zhytomyr region	25
Dobrostan O., Pluska A. The features of the nervous system of the first year female students (Freshmen) with different body mass index	28
Franskevich D., Grebinuk D., Matushevskaya O. Doxorubicin – modulator of reactive oxygen species production and cytosolic Ca^{2+} level in normal and leukemic cells	32
Iefimenko O., Savchenko O., Nyrischenko N., Zholobak N., Spivak M. Contractile activity of smooth muscles of the stomach and colon in rats under 10-days injection of nanocrystalline cerium dioxide	35
Pilipenko S., Shelyuk O., Tseysler Yu., Nurishchenko N., Beregova T. The influence of calcium channel blockade L-type on gastric motility in rats with long-term administration of omeprazole	39
Svitin R., Kilochytsky P. Helminthofauna of dominant species of anuran amphibians (<i>AMPHIBIA: ANURA</i>) from the territory of NP "Karmelukove Podilla"	43
Korinchak L. The state of the cardiorespiratory system of girls depending on the season	45
Markevych A., Falalyeyeva T., Bogun L., Harchenko O. Effect of low molecular weight organic compound on basal gastric acid secretion in rats	49
Yanenko V. Distribution of quail (<i>COTURNIX COTURNIX L.</i>) populations in agroecosystems of Ukraine	52
Yatsenko O., Yatsenko V. Features changes of variation erythrocytes sportsmen in the training process	56
Andriichuk T. Redox – sensitive link radiation – induced apoptosis	58
Matvienko M., Krivosheyev R., Akimov Yu., Pustovalov A., Dzerzhinsky M. Morphofunctional changes in cells of rat preoptic hypothalamic nucleus in the interaction of α -adrenergic and kisspeptinergic systems	62
Dranitsina A., Savko U., Dvorchshenko K., Morgaienko O., Vereschaka V. Expression of <i>Par2</i> gene in rat duodenal upon long-term hypoacidity and with administration of multiprobiotic Symbiter	65
Golyshkin D., Virchenko O., Falalyeyeva T., Halanova T., Savchuk O. The cytokines content in rats serum under stress and administration of melanin	69
Pshichenko V. Histophysiological state of the pineal gland of rats under chronic stress	73
Kyznetsova M., Halanova T., Savchuk O., Bolibrukh K., Polovkovych S. Searching of tyrosine protein kinase inhibitors among quinone and quinoxaline derivatives	76
Tsiryuk O., Beregova T. Finding ways of correction the structural and functional changes in the stomach under prolonged hypoacidity	80
Melnyk M., Martynuk V., Artemenko O. Exposure of electromagnetic field with frequencies of 8 and 50 Hz on dynamic the intracellular calcium concentration in smooth muscle cells	83
Nozdrenko D. Protective effect of fullerenes C_{60} on muscle soleus development process after artificial ischemia	86
Garmanchuk L. EGF increases cytotoxic/cytostatic effect of nimotuzumab and proapoptotic action of 6-azacytosine β -D-xylofuranoside to cells of breast adenocarcinoma (MCF-7)	89

АКТИВНІСТЬ NO-СИНТАЗИ МОЗКУ ЩУРІВ ІЗ СФОРМОВАНОЮ АЛКОГОЛЬНОЮ ЗАЛЕЖНІСТЮ ЗА УМОВ ВВЕДЕННЯ ОЦТОВОКИСЛОГО ЦИНКУ

Досліджено вплив оцтовокислого цинку на загальну активність NO-синтази та iNO –синтази в клітинах головного мозку щурів із сформованою алкогольною залежністю. Виявлено індукцію NO-синтази за рахунок її індукційної форми в експериментальній групі щурів, які постійно вживали алкоголь протягом 8 тижнів. Застосування оцтовокислого цинку не призводило до повної нормалізації активності ферментів, що може бути пов'язано з переважним впливом цинку на експресію iNOS.

Ключові слова: NO-синтаза, мозок, оцтовокислий цинк, алкогольна залежність.

Вступ. Експериментальними і клінічними дослідженнями показано, що хронічна алкогольна інтоксикація викликає функціональні і морфологічні порушення практично всіх систем та структур головного мозку [1]. В першу чергу етанол уражує нейрони нової кори, гіпокамп та півкуль мозочку впливаючи на нейромедіатори та змінюючи синаптичну передачу [2]. Серед багатьох біологічних процесів, які обумовлюють такі наслідки вживання алкоголю, певна роль відводиться оксиду азоту (NO). Функції оксиду азоту в ЦНС доволі різноманітні: він контролює активність нейронів, є медіатором ноцицепції, термогенезу, регулює вихід нейромедіаторів, грає важливу роль в процесах довгострокової потенціації, і, відповідно пам'яті та ін. [3]. В фізіологічних умовах NO захищає головний мозок від ішемічного та нейротоксичних впливів, тоді як в умовах патології може посилювати деструктивні процеси. Вважається, що у механізмі розвитку алкогольної інтоксикації важливу роль відіграє порушення вмісту мікроелементів, спектр біологічної дії яких визначається взаємодією з ферментами, гормонами, нейромедіаторами, пептидами та іншими біологічно активними речовинами [4]. На думку ряду авторів, порушення мінерального обміну (особливо цинку) може бути одним з пускових механізмів метаболічних розладів за умов алкогольної інтоксикації [5]. Цинк входить до складу білків, що беруть участь у генній експресії та метаболізмі нуклеїнових кислот, процесах клітинного росту та диференціації, він є структурним компонентом біологічних мембран, клітинних рецепторів, протеїнів, та ін. Для корекції дефіцитів цинку використовують їх солі, серед яких низькою токсичністю характеризується оцтовокислий цинк [6]. Актуальним і перспективним вважається його застосування для корегування метаболічних уражень, які виникають під час розвитку алкоголізму, що може бути основою розробки нових лікувальних протиалкогольних засобів. Метою роботи було дослідити вплив оцтовокислого цинку на активність NO-синтази мозку щурів із сформованою алкогольною залежністю.

Матеріали і методи. Дослідження проведені на білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях масою 180-200 г. Проведенні дослідження відповідають основним вимогам щодо утримання та роботи з лабораторними тваринами згідно правил Європейської конвенції щодо захисту тварин, які використовуються в експериментальних дослідженнях та інших наукових цілях (Страсбург, 1986 р.) та згідно етичних норм у відповідності до українського законодавства. Сьогодні при дослідженні можливих механізмів впливу алкоголю на організм в основному використовують моделі хронічної алкоголізації з примусовим споживанням тварин. Однак більш наближеними до реальної ситуації є моделі формування алкогольної залежності з можливістю вільного вибору тваринами етанолу. Алкогольна залежність у тварин в хронічному експерименті формувалась в умовах вільного вибору між 40 % розчином етанолу та водою про-

тягом 2 місяців [7]. Щурів утримували на стандартному раціоні віварію з вільним доступом до води. Алкогольну залежність формували за наступною схемою: щурів розсаджували в індивідуальні клітки з двома пляшечками: одна містила мірну кількість води, а інша – 40% розчину етанолу. Кожної доби протягом місяця проводили вимірювання кількості випитого етанолу. Через місяць після початку експерименту тварин розподіляли на 3 групи. До 1 групи відносили інтактних тварин (контроль), до 2 групи – щурів з сформованою алкогольною залежністю, у яких споживання етанолу протягом доби становило 2 мл та більше. 3 група – щури, яким додатково протягом останнього місяця вводили оцтовокислий цинк в дозі 2 мг на 1 кг маси тварини перорально [8]. Тварин забивали методом дислокації шийних хребців, декапітували, після чого шляхом розтину черепної коробки мозок тварини видаляли з основи черепа, підрізавши черепно-мозкові нерви, промивали фізіологічним розчином та в подальшому гомогенізували. Визначення загальної активності NO-синтази в клітинах мозку щурів проводили стандартним спектрофотометричним методом. Визначення активності NO-синтази засноване на комбінації класичного методу [9] та сучасної його модифікації [10], пристосованої до спектрофотометричного вимірювання одного з продуктів реакції – L-цитруліну. Активність ферменту виражали в пмоль L-цитруліну на мг білка за хв. Експериментальні дані обробляли методами варіаційної статистики із використанням програми Statistica 7 з визначенням t-критерію Стюдента.

Результати та їх обговорення. У результаті досліджень нами було встановлено, що системне споживання алкоголю призводило до зростання активності NO-синтази в клітинах мозку щурів на 280% (4 тижень експерименту) у порівнянні із контролем (рис.1). В подальші терміни досліджень (5-8 тижень) активність ферменту залишалась підвищеною і на 8 тижень експерименту перевищувала контрольні показники на 70 %. Встановлене нами зростання активності NO-синтази клітин мозку за умов розвитку алкогольної залежності узгоджується з рядом досліджень [3], де продемонстровано, що введення етанолу призводить до збільшення вмісту оксиду азоту та його похідних у мозку. Показано, що у людей, які систематично вживають алкоголь відбувається зростання вмісту стійких метаболітів оксиду азоту – нітратів та нітритів, причому автори вважають, що формування NO• може бути пов'язаним з розвитком толерантності до алкоголю. Оксид азоту може сприяти руйнуванню гематоенцефалічного бар'єру, зумовлюючи вазогенний набряк і ушкодження мозку [11]. Дослідженнями останніх років встановлено, що NO, і особливо продукти його перетворення, такі як пероксинітрит (ONOO⁻), іон нітрозонію (NO⁺), нітроксил (NO[•]) є основними факторами реалізації нітрозуючого стресу, в результаті якого відбувається пряма взаємодія NO з металами (гемове залізо гемоглобіну, міоглобіну, залізовмісних ферментів, ДНК, міддю та цинку

активних центрів ферментів), а також не пряма взаємодія NO^+ (S,N,O нітрозилування) з тіольними, фенольними, гідроксильними та аміногрупами білків і ДНК. Подібний вплив призводить до десенситатії рецепторів, пригніченню активності мітохондріальних ферментів, фрагментації нуклеїнових кислот та, як наслідок до апоптозу. Отже, індукція цього ферменту при хронічній алкогольній інтоксикації є додатковим фактором погли-

блення нітрозативного стресу у клітинах мозку, особливо за рахунок формування пероксинітриту та інших нітроокисних похідних.

Нами було встановлено, що застосування оцтовокислого цинку у тварин, які споживали алкоголь призводило до зниження активності NO-синтази (1-4 тиждень) на 44%,16%,14%, та 24% відповідно, але перевищувала контрольні показники в середньому на 56%.

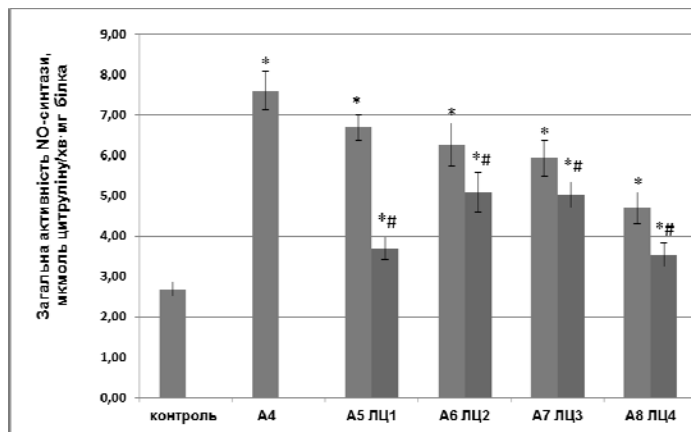


Рис. 1. Загальна NO-синтазна активність клітин мозку щурів при введенні оцтовокислого цинку за умов розвитку хронічної алкогольної інтоксикації

1 – контроль;

A4 – A8 – 4-8 тижні хронічної алкоголізації;

LC1-LC4 – введення оцтовокислого цинку на 5-8 тиждень хронічної алкоголізації.

* – $p \leq 0,05$ порівняно з показниками тварин контрольної групи

– $p \leq 0,05$ порівняно з показниками тварин експериментальної моделі алкоголізації.

Варто відмітити, що інгібування активності NO-синтази може призводити до збільшення тривалості сну, викликаних вживанням етанолу; полегшувати симптоми виведення алкоголю; посилювати транквілізуючі ефекти етанолу; попереджувати розвиток толерантності до етанолу; знижувати норму споживання спирту у щурів, які віддають перевагу алкоголю [12]. Отримані нами результати узгоджуються з даними інших авторів, які показали, що сполуки цинку можуть інгібувати активність NO-синтази за умов хронічної алкогольної інтоксикації [13]. Одним з факторів, що визначають активність NO-синтази є доступність субстрату – L-аргініну. Поява у клітині метильованих форм цієї амінокислоти призводить до значного інгібування активності досліджуваного ферменту. Основним шляхом їх синтезу є переніс метильної групи S-аденозил-L-метіоніна за допомогою відповідних N-метилтрансфераз на гуанідиновий азот аргінінових залишків білків. Протеоліз останніх призводить до вивільнення N-метиларгінінів, які є силь-

ними інгібіторами ізоформ NO-синтаз. У літературі є дані про те, що за умов розвитку хронічної алкогольної інтоксикації відбувається зниження активності метилтрансфераз, у той час як введення сполук цинку, навпаки, призводить до активації цих ферментів [14]. Тому, однією з можливих причин зниження активності NO-синтази при введенні оцтовокислого цинку на фоні хронічної алкогольної інтоксикації може бути зростання вмісту N-метиларгінінів.

Відомо, що цинк входить до складу всіх ізоформ NO-синтази і його застосування може призвести до зростання активності ферменту [15].

Нами було досліджено вплив оцтовокислого цинку на загальну активність NO-синтази та її індукційної форми – iNOS в клітинах мозку інтактних щурів. Встановлено, що застосування оцтовокислого цинку протягом 4 тижнів призводило до зростання загальної NO-синтазної активності в клітинах мозку щурів в середньому на 38% (рис.2).

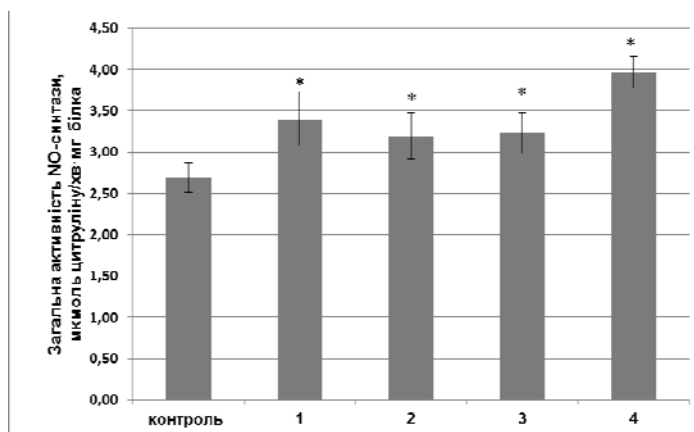


Рис. 2. Загальна NO-синтазна активність клітин мозку інтактних щурів при введенні оцтовокислого цинку

1 – контроль;

1-4 – 1-й- 4-й тиждень введення цинку оцтовокислого.

* – $p \leq 0,05$ порівняно з показниками тварин контрольної групи

При застосуванні оцтовокислого цинку активність індукційної форми NO-синтази також перевищувала контрольні показники в усі терміни досліджень на 83%, 50%, 85% та 16% відповідно (рис.3).

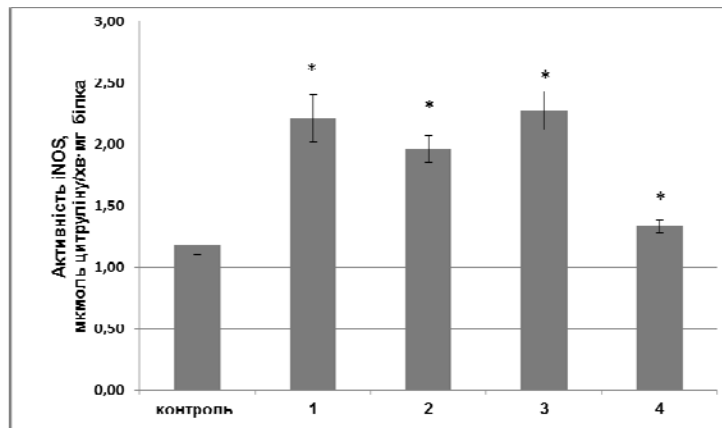


Рис. 3. Активність iNOS клітин мозку інтактних щурів при введенні оцтовокислого цинку

1 – контроль;

2 – 1-4 тижень введення цинку оцтовокислого.

* – $p \leq 0,05$ порівняно з показниками тварин контрольної групи

Встановлена нами активація NO-синтази клітин мозку щурів із сформованою алкогольною залежністю може відбуватись за рахунок індукції різних ізоформ ферменту: iNOS (індуційна NO-синтаза), яка продукує значно більше NO $\cdot$ у порівнянні з eNOS (ендотеліальна NO-синтаза) чи nNOS (нейрональна NO-синтаза). Відомо, що за умов запалення експресується індукційна форма NO-синтази. Існуючі на сьогодні літературні дані щодо впливу етанолу на активність NO-синтази клітин мозку щурів є неоднозначними. Відомо, що експресія iNOS запускається цитокінами та факторами росту і пов'язана із розвитком процесів запалення. Рядом дослідників було показано, що за умов розвитку хронічної алкогольної інтоксикації відбувається зростання вмісту IL1 та IL6 і посилюється цитокін-індукована експресія iNOS астроцитів [17]. Продемонстровано дозозалежний характер впливу етанолу на активність iNOS гліальних клітин *in vitro*: зростання активності ферменту при введенні низьких доз спирту та зниження при високих дозах. З іншого боку, при гострому введенні етанолу показано зниження поліп:С-індукованої NO-відповіді у мікроглії. Вважається, що ефект етанолу на iNOS мРНК відбувається не через накопичення ацетальдегіду і ацета-

ту, а через інгібування ядерного транскрипційного фактора (NF- κ B) і STAT-1 сигнальної системи [18].

Окрім того, порушення гомеостазу цинку ряд авторів пов'язує з порушеннями метаболізму металотіонеїну III, який залучений до розвитку запальних процесів в мозку [16].

Тому наступним етапом нашого дослідження було визначення активності індукційної форми синтази оксиду азоту в мозку щурів із сформованою алкогольною залежністю.

Нами встановлено, що на 4 тижень в мозку щурів із сформованою алкогольною залежністю активність iNOS досягала максимальних значень і була вище контрольних показників на 280% (рис. 4). З 5-го по 8-й тижень активність ферменту знижувалась, та на 8 тижень експерименту була нижче контролю. Застосування оцтовокислого цинку на початкових етапах досліджень (1 тижень) призводило до зниження активності iNOS на 30%, у порівнянні з групою тварин із сформованою алкогольною залежністю. В подальші терміни досліджень (2-4 тижні) активність ферменту зростала і на 4 тижень перевищувала контрольні показники на 28% і на 230% відповідно в порівнянні з групою тварин, які постійно вживали алкоголь.

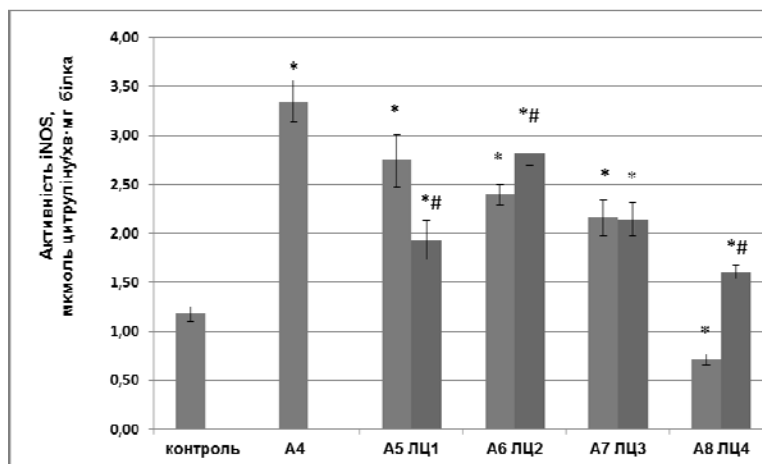


Рис. 4. Активність iNOS клітин мозку щурів при введенні оцтовокислого цинку за умов розвитку хронічної алкогольної інтоксикації

1 – контроль;

A4-A8 – 4-8 тижні хронічної алкоголізації;

ЛЦ1-ЛЦ4 – введення оцтовокислого цинку на 5-8 тижень хронічної алкоголізації.

* – $p \leq 0,05$ порівняно з показниками тварин контрольної групи

– $p \leq 0,05$ порівняно з показниками тварин експериментальної моделі

Отже, встановлене нами зростання загальної активності NO-синтази клітин мозку щурів із сформованою алкогольною залежністю відбувалось за рахунок індукції iNOS. У подальшому накопичення вмісту оксиду азоту у цих клітинах може бути одним із факторів посилення токсичної дії етанолу, який реалізується шляхом вторинного утворення токсичних аніон-радикалів та пероксинітритів.

Висновок

Таким чином, нами продемонстровано зростання активності NO-синтази у клітинах мозку щурів із сформованою алкогольною залежністю. Однак, застосування оцтовокислого цинку за досліджуваної патології хоча і знижувало, але не призводило до нормалізації активності NO-синтази до контрольних величин. Це може бути пов'язано із впливом цинку на експресію iNOS, яка вносить основний вклад в загальну активність NO-синтази. Отримані результати свідчать на користь можливого використання досліджуваної сполуки для корекції метаболічних порушень, викликаних хронічним надходженням етанолу.

Список використаних джерел

1. Fadda F., Rossetti Z.L. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. // *Prog. Neurobiol.* 1998; 56(4):p.385–431.
2. Морозов Ю.Е. Судебно-медицинское значение продуктов ферментативного окисления этанола в головном мозге трупов // Судебно-медицинская экспертиза, 2002. – Т 45, № 1. – С. 17–21.
3. Виктор И.В. Роль оксида азота и других свободных радикалов в ишемической патологии мозга // *Вестник Российской Академии медицинских наук*, 2000. – № 4. – С. 5–10.
4. Скальная М.Г., Нотова С.В. Макро-микроэлементы в питании современного человека: Эколого-физиологические и социальные аспекты. – М.: "РОСМЭМ", 2004. – 310 с.
5. Харченко О.І., Чайка В.О., Богун Л.І., Ковальова В.А., Остапченко Л.І. Вплив оцтовокислого цинку на фосфоліпідний склад плазматичних мембран різних органів щурів за умов хронічної алкогольної інтоксикації // *Фізика живого*. – Т. 17, №2. – 2009. – С. 134–136.
6. Гуртовенко В. М., Проскурнякова Т. В., Шумалов И. Н., Кудрявцев Р. В. Влияние цинка на показатели окисления и характер потребления этанола при алкогольной интоксикации в эксперименте // *Патол. физиол. и экспер. терапия*. – 1988. – №2. – С. 58–61.

Ю. Омельченко, асп., О. Сокур, д-р биол. наук., Л. Остапченко, д-р биол. наук
КНУ имени Тараса Шевченко, Киев

АКТИВНОСТЬ NO-СИНТАЗЫ МОЗГА КРЫС ИЗ СФОРМИРОВАННОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ЗАВИСИМОСТЬЮ В УСЛОВИЯХ ВВЕДЕНИЯ УКСУСНОКИСЛОГО ЦИНКА

Изучено влияние уксуснокислого цинка на общую активность NO-синтазы и iNO-синтазы в клетках головного мозга крыс с сформированной алкогольной зависимостью. Выявлена индукция NO-синтазы за счет ее индуцибельной изоформы в экспериментальной группе крыс, которые постоянно употребляли алкоголь на протяжении 8 недель. Применение уксуснокислого цинка не приводило к полной нормализации активности фермента, что может быть связано с преимущественным влиянием цинка на экспрессию iNOS.

Ключевые слова: NO-синтаза, мозг, уксуснокислый цинк, алкогольная зависимость.

Yu. Omelchenko, PhD stud., O. Sokur, DSc., L. Ostapchenko, DSc
Taras Shevchenko national university of Kyiv

ACTIVITY NO-SYNTHASE RAT BRAIN FROM FORMATION OF ALCOHOL DEPENDENCE UNDER INTRODUCTION ACETATE ZINC

The effect of zinc acetate on the overall activity of NO-synthase and iNO synthase in the brain cells of rats with the formed alcohol dependence was studied (investigated). The induction of NO-synthase due to its inducible isoform in the experimental group of rats that constantly drank alcohol for 8 weeks was revealed. Zinc acetate using did not lead to the normalization of enzyme activity, which may be associated with a zinc predominant influence on the expression of the iNOS.

Key words: NO-synthase, brain, zinc acetate, alcohol dependence.

7. Харченко Н.К. Роль изменений функциональной активности катехоламиновой и опиатной систем в механизме формирования и развития алкогольной зависимости // *Архив психиатрии*. – 1998. – №1(16). – с.123–128.

8. Ещенко Ю.А. Вміст цинку в клітинах при різних функціональних станах інсулярного апарату підшлункової залози: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.13 "Фізіологія людини і тварин". – Київ, 2004. – 19 с.

9. Salter M. Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent nitric oxide synthases / Mark Salter, Richard G. Knowles, Salvador Moncada // *FEBS Letters*. – 1991. – Vol. 291, № 1. – P. 145–149.

10. Increased activity and expression of Ca²⁺-dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats / So Yeon Chin, Kailash N. Pandey, Shang-Jin Shi [et al.] // *American Journal of Physiology. Renal Physiology*. – 1999. – Vol. 277, № 5. – P. F797–F804.

11. Davis R. L. Acute ethanol exposure modulates expression of inducible nitric-oxide synthase in human astroglia: evidence for a transcriptional mechanism / Davis R. L., Syapin P. J. // *Alcohol*. – 2004. – V. 32. – P. 195–202.

12. The neuronal nitric oxide synthase gene is critically involved in neurobehavioral effects of alcohol / [Spanagel R., Siegmund S., Cowen M. et al.] // *J Neurosci*. – 2002. – V. 22. – P. 8676–8683.

13. Crystal structures of zinc-free and -bound heme domain of human inducible nitric oxide synthase. Implications for dimer stability and comparison with endothelial nitric-oxide synthase / [Huiying Li, Raman C.X., Charles B. Glaser et al.] // *J Biol Chem*. – 1999. – V. 274(30). – P. 21276–21284.

14. Lieber C. S. Role of oxidative stress and antioxidant therapy in alcoholic and nonalcoholic liver diseases // *Adv Pharmacol*. – 1997. – V. 38. – P. 601–628.

15. Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center / [Raman C.S., Li H., Martasek P. et al.] // *Cell*. – 1998. – V. 95. – P. 939.

16. Eugenio Mocchegiani. Zinc-bound metallothioneins and immune plasticity: lessons from very old mice and humans // *Immun Ageing*. – 2007. – №2. – P. 4–7.

17. Syapin P. J. Alcohol and nitric oxide production by cells of the brain // *Alcohol*. – 1998. – V. 16. – P. 159–165.

18. Greenberg S. Ethanol metabolism is not required for inhibition of LPS-stimulated transcription of inducible nitric oxide synthase // *Alcohol*. – 1999. – V. 17. – P. 203–213.

Надійшла до редколегії 07.07.14

УДК 611.91+611.92 : 572.544+572.545

В. Верещака, д-р мед. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

РОЛЬ ГІПЕРТОНІЧНОЇ ХВОРОБИ У РОЗВИТКУ МОРФОЛОГІЧНИХ ЗМІН ШКІРИ: ГІСТОХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ

Морфологічним і біохімічним дослідженням підлягала шкіра 45 осіб обох статей зрілого віку (36 – 55 років), що страждали на гіпертонічну хворобу I – III ступеня. Встановлено, що гіпертонічна хвороба характеризується передчасним старінням шкіри, що є наслідком атеросклерозу. Зміни гемомікроциркуляторного русла шкіри характеризуються вогнищевою плазморагією і дистрофічними змінами ендотеліоцитів. Порушення процесів кератинізації, зміни базальної мембрани епідермісу, фіброз дерми, дегенерація еластичних і колагенових волокон мають вторинний характер і збільшуються пропорційно стадії гіпертонічної хвороби. Біохімічні зміни енергетичного балансу шкіри при гіпертонії виявляються зменшенням та зникненнями активності Ca^{2+} -АТФази та Mg^{2+} -АТФази на плазматичних мембранах базальних епідермоцитів, ендотеліоцитів мікросудин, перицитів, м'язів шкіри.

Ключові слова: гіпертонія, шкіра, гістохімічне дослідження.

Вступ. Проблема передчасного старіння шкіри людей, що страждають на гіпертонічну хворобу має не тільки суто медичне, а і загальнобіологічне значення, оскільки відображує роботу органа в умовах зміненого гомеостазу, зокрема артеріальної гіпертензії, рівень якої за даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) збільшується з кожним роком. Залишаються невивченими компенсаторні і репаративні механізми, що відбуваються у перифіричних тканинах, що зазнають дії підвищеного артеріального тиску [4, 9, 14]. Інволютивні зміни у вигляді передчасного старіння шкіри можуть виникати внаслідок склеротичних змін мікросудин, порушення реологічних властивостей крові, апоптозу клітин. Однак структурні механізми цих змін залишаються нез'ясованими. Є велика кількість праць [2, 6, 7, 10, 12], присвячена вивченню морфологічних змін шкіри при атеросклерозі. У більшості з них використовувалася світлова мікроскопія, яка дала змогу вивчити характер дистрофічних, запальних і репаративних процесів. Залишається відкритим питання з'ясування морфологічних проявів передчасного старіння шкіри за даними світлової й електронної мікроскопії у процесі переходу стадій гіпертонічної хвороби, а також його особливості залежно від статі. Гістохімічні дослідження стінок кровоносних мікросудин встановили, що енергетичний баланс ендотеліоцитів пов'язаний з гідролізом аденозинтрифосфату (АТФ) [8, 15]. Однак світлооптичні методи гістохімії не дають змоги визначити зони локалізації продуктів реакції з органелами і мембранами, що вимагає використання методів електронної гістохімії. Ми не знайшли інформації щодо активності Ca^{2+} - і Mg^{2+} -АТФази у шкірі осіб з різними стадіями гіпертонічної хвороби та впливу збільшення системного артеріального тиску на активність цих ферментів. Відсутність систематизованих досліджень з гістохімічних вивчення енергетичного обміну у клітинах шкіри при різних ступенях прояву артеріальної гіпертензії показало доцільність їх проведення з використання експериментальних, світлооптичних і електронно-гістохімічних методик.

Мета нашої роботи – дослідження гістохімічних особливостей шкіри осіб з різним ступенем прояву гіпертонічної хвороби та її вплив на розвиток передчасного старіння шкіри.

Матеріали та методи. Морфологічним і біохімічним дослідженням підлягала шкіра 45 осіб обох статей зрілого віку (36 – 55 років), що страждали на гіпертонічну хворобу I – III ступеня (МКХ 10 перегляду), яким були проведені планові оперативні втручання з приводу усунення дефектів передньої черевної стінки та її доброякісних новоутворень. Залежно від стадії ГХ пацієнти були розподілені на III групи, по 15 осіб у кожній. До контрольної групи увійшло 15 практично здорових осіб зрілого віку (36 – 55 років). До I групи увійшли особи, що

мали транзиторне підвищення артеріального тиску без органічного ураження серця та судин (ознаки відповідають I стадії ГХ). До II групи увійшли особи, що мали стійке та стабільне підвищення артеріального тиску, що супроводжується гіпертрофією лівого шлуночка серця (за даними рентгеноскопії, електрокардіографії, ехокардіографії) і змінами судин очного дна (генералізоване чи фокальне звуження судин сітківки, але без ознак ураження інших органів (ознаки відповідають II стадії ГХ). У хворих виявлялася мікроальбумінурія та/чи незначне підвищення концентрації креатиніну у плазмі крові (до 0,177 ммоль/л), атеросклеротичні зміни (бляшки) за даними ультразвукової сонографії чи ангіографії (у сонних артеріях, аорті, клубовій та стегнових артеріях). До III групи увійшли особи з ускладненою артеріальною гіпертензією (стенокардія, інфаркт міокарду, серцева недостатність, інсульт, транзиторне порушення мозкового кровотоку, гіпертонічна енцефалопатія, зміни сітківки у вигляді крововиливів чи ексудатів з набряком (чи без нього) зорового нерва, креатинін плазми вище 0,177 ммоль/л, ниркова недостатність, оклюзивні ураження артерій з клінічними проявами (ознаки відповідають III стадії ГХ). Шматочки шкіри отримували з пупкової ділянки за допомогою біопсійних лез фірми "Miltex Instrument Co" (США). Біопсію шкіри проводили на першій стадії глибини загального знеболювання, вибір місця був зумовлений використанням стандартного операційного доступу при хірургічних втручаннях. Доцільність використання саме цієї ділянки у нашій роботі підтверджують попередні дослідження про подібність морфологічних змін у несуміжних анатомічних зонах [11]. Всі обстежені дослідних груп в онтогенезі не підлягали надлишковій ультрафіолетовій інсоляції та не мали істотних коливань маси тіла. У них були відсутні ознаки патології ендокринної системи та захворювання внутрішніх органів. Морфофункціональні зміни проводили за умов суворої стандартизації. Схема обстеження і підбір матеріалу включали експертну оцінку історії хвороби спеціалістами різного профілю.

Отримані біоптати шкіри для досліджень на світлооптичному рівні фіксували в 10%-му розчині нейтрального формальдегіду та піддавали рутинній гістологічній обробці [5]. Гістологічні зрізи фарбували гематоксиліном і еозином, пікрофуксином за методом Ван Гісона після інкубації у розчині колагенази, а також без неї, пікро-індігокарміном, за методом Маллорі з використанням фосфорно-молібденової кислоти, за Касоном, резорцин-фуксином за Вейгертом, альдегідфуксином за Гоморі після обробки зрізів надощовою кислотою, а також без неї, гематоксиліном Верхгофа, толуїдиновим синім з обробкою контрольних зрізів тестикулярною гіалуронідазою, за методом Шиффа з використанням йодної кислоти після обробки амілазою слини в моди-

фікації Мак-Мануса, за допомогою імпрегнації сріблом за методом Фута, а також за Місіме, за методом Перлса з використанням реакції берлінської лазури за Лізоном, фарбування за Ганді і Майніні, за Коссом, за методом Макаллума, конго червоним, за Касоном, за Романовським – Гімзою, за методом Мая-Грюнвальда.

Середні діаметри, площу і об'єм гістологічних структур визначали за формулами, запропонованими Автанділовим [1].

Матеріал для електронно-мікроскопічних досліджень (30 біопатів шкіри, по 10 з кожної групи) подрібнювали на шматочки, товщиною до 1 мм і фіксували протягом 1,5-2 год при 3°C з триразовою зміною осміевої кислоти. Після фіксації шматочки відмивали в 0,1 моль/л фосфатному буфері з pH 7,4, зневоднювали в зростаючих концентраціях етанолу, абсолютному ацетоні або в оксиді пропілену з попередньою дофіксацією та контрастуванням насиченим розчином уранілацетату і ущільнювали у суміші епону та аралдиту. Напівтонкі зрізи товщиною 1 мкм забарвлювали 1%-м розчином толюїдинового синього для світлооптичного вивчення і орієнтації вибраної ділянки для наступного електронно-мікроскопічного дослідження. Ультратонкі зрізи готували на ультратомі "LKB" і вивчали на електронному мікроскопі Philips 400 T при прискорюючій напрузі 80 кВ.

Виходячи з того, що Ca^{2+} -АТФаза відіграє важливу роль у клітинному метаболізмі [8, 15], нами були проведені дослідження активності цього ферменту під впливом підвищеного артеріального тиску за методикою [13]. Матеріал подрібнювали на шматки 1 мм³ і фіксували впродовж 1 години у суміші 32% параформу, 0,25% глутарового альдегіду, 4% сахарози, трилону-100 на 0,1 М кокадилатному буфері (pH 7,4). Після фіксації промивали у 8% сахарозі на 0,1 М кокадилатному буфері (pH 7,3) протягом доби при 37°C. Середовище інкубації складалося з 8 мл тріс-малеатного буфера (pH 7,4), 8,8 мл бідистильованої води, 3,6 мл 5%-го розчину декстрози, 16 мг левамизолу, 11 мг хлориду кальцію, 0,6 мг нітрату свинцю. Одночасно проводили контрольні досліді: інкубацію матеріалу у середовищі з субстратом і додаванням 18 мг АТФ, а також без нього. Після зневоднення матеріалу у зростаючих концентраціях етанолу та пропіленоксиду, тканину заклали у епон-аралдит за загальноприйнятою методикою. В основі ензимістохімічного методу лежить вивчення ферментативної реакції [3]. При цьому виявляється не сам фермент, а його активність. Гістохімічна реакція дослідження ферментативної активності складається з двох етапів – власне ферментативної реакції і утворення кінцевого продукту (нерозчинного хромогену) за схемою: субстрат → первинний продукт реакції → реакція "захвату" → кінцевий продукт реакції (нерозчинний хромоген).

Для визначення Mg^{2+} -АТФазної активності з солями свинцю за Гоморі у модифікації Бухвалова [3] свіжевидалені шматочки шкіри розміром 0,5 – 1 мм³ фіксували при 4°C в 2%-му формальдегіді на 0,1 М фосфатному буфері (pH 7,2 – 7,4) протягом 2 год. Промивали при 4°C, тричі змінюючи 8,5%-й розчин сахарози впродовж 2 год. Інкубували 1 год при 37°C у середовищі такого складу (у дужках вказано кінцеву концентрацію): АТФ (натрієва сіль) – 12 мг (2 моль/л), дистильована вода – 5,6 мл, 0,2 М тріс-малеатний буфер – 4 мл (80 моль/л), 4,3 % ацетат магнію – 0,1 мл (2 моль/л) сахароза – 850 мг (0,25 моль/л), 2% нітрат свинцю – 0,3 мл (2 моль/л). Розчин солі свинцю (II) додавали крапельною останнім при інтенсивному помішуванні. Зрізи промивали у 8,5% сахарозі, контрастували у 1% тетроксиду осмію, гексацианофератом калію на 0,1 М фосфатному буфері (pH 7,0 – 7,4) протягом 1 год, занурювали у

70%-й спирт на 12 год при 4°C, зневоднювали і заливали у епон-аралдит, готували ультратонкі зрізи. Локалізацію активності Mg^{2+} -АТФазі визначали за електронно-щільними гранулами фосфату свинцю. Для точного визначення характеру реакції було проведено два контролю: матеріал фіксували у 1%-му розчині тетраоксиду осмію протягом 20 хв з наступною обробкою за вищезазначеною рецептурою (Mg^{2+} -АТФаза активність не виявлялась), матеріал фіксували одночасно з основним, але у середовище не додавали АТФ (Mg^{2+} -АТФазна активність не виявлялась).

Результати та їх обговорення. На світлооптичному рівні виявлено, що у осіб контрольної групи шкіра мала будову, що притаманна зрілому віку. Роговий шар епідермісу був утворений 2–5 рядами лусочок заповнених кератином. Їх щільність мала певні відмінності, які виявлялися утворенням пустот, ділянок ущільнення, зон локальної десквамації. Зернистий шар складався з 2–3 шарів кератиноцитів ромбоподібної форми, які мали щільне розташування. У їх цитоплазмі спостерігалися гранули кератогаліну, що мали ознаки базофілії. Остистий шар був представлений кератиноцитами полігональної форми з вираженими міжклітинними просторами. Базальні епідермоцити мали видовжену форму і центрально розташовані ядра з помірно мітотичною активністю. Приблизно чверть клітин гермінативного шару мала округлу форму, їх ядра повторювали контури цитолемі і були зміщені до базальної мембрани. Дермальні сосочки добре контурувалися, однак мали локуси сплюснення. Фібробласти дерми були середнього розміру, характеризувалися помірно базофілією цитоплазми та синтетичною активністю. Колагенові волокна чітко контурувалися і були орієнтовані у напрямку, паралельному поверхні шкіри. Виявлялися поодинокі ділянки зі змінами структури колагенових пучків, що виявлялися їх розволокненням та утворенням аморфних мас. Еластичні волокна сосочкового і сітчастого шарів дерми помірно виражені, мали вигляд блискучих гомогенних тонких ниток з ділянками фрагментації. Окситаланові й елауїнові волокна не ідентифікувалися. Тканинні базофілі звичайної будови, переважно локалізувалися навколо мікросудин дерми і гіподерми. У дермі спостерігалася значна кількість волоссяних фолікулів, сальних залоз і мікросудин. Середня площа перерізу артеріол і капілярів сосочкового шару становила $63,21 \pm 4,24$ і $11,2 \text{ мкм}^2 \pm 1,43 \text{ мкм}^2$ відповідно. Об'єм ядер ендотеліоцитів артеріол сітчастого шару дерми був $76,31 \text{ мкм}^3 \pm 12,44 \text{ мкм}^3$, а капілярів – $63,81 \text{ мкм}^3 \pm 8,94 \text{ мкм}^3$. У гіподермі виявлялися артеріоли м'язового типу, їх гілки проходили у дерму, утворюючи субдермальну артеріолярну сітку. Товщина базальної мембрани капілярів шкіри коливалася від 190 нм до 270 нм. Відкладення солей кальцію, гемосидерину, амілоїду, нейтральних та кислих глікозаміногліканів у шкірі не було. Під дією колагенази деградація колагену не відбувалася.

Електронно-мікроскопічно у цитоплазмі базальних епідермоцитів була помірна кількість вільних рибосом, полісом, тонофіламентів та гранул меланіну. Мітохондрії мали видовжену структуру з вираженими кристами. Канали ендоплазматичного ретикулума добре контурувалися, на них локалізувалася незначна кількість рибосом. Каріолема мала поодинокі пори, хроматин був рівномірно розподілений по ядру. Клітини остистого шару мали багатокутну форму, вирости їх цитоплазми пальцеподібної форми занурені між ідентичними виступами навколишніх клітин і були представлені помірним числом тонофібрил та десмосом. Зернисті кератиноцити характеризувалися щільною цитоплазматичною сіткою за рахунок значного вмісту цитоплазматичних включень

та тонофібрил вираженої щільності. Рогові лусочки мали гомогенізований вміст і були з'єднані напівзруйнованими демосомами. Базальна мембрана епідермісу добре контурувалася, мала рівномірні контури з поодинокими ділянками витончення. У прозорій зоні між базальною мембраною дерми і мальпігієвим шаром виявлялися локуси гомогенізації. В дермі чітко візуалізувалися поперечно, повздовжньо і косо зрізані пучки колагенових фібрил, які мали ділянки вікової деструкції у вигляді розволокнення та уламків. Фібробласти були видовженими, містили ядро з 1 – 2 ядерцями та рівномірним розподіленням хроматину, помірну кількість поперечно і косо зрізаних каналів гранулярного ендоплазматичного ретикулума, на поверхні яких були розташовані поодинокі рибосоми, а також пластинчастий комплекс, незначне число мітохондрій і вільно розташованих рибосом. Поряд з цитолемою спостерігалася значна кількість піноцитарних пухирців. Тканинні базифілі полігональної форми із типовим ядром і цитоплазматичним вмістом. Більшість ендотеліоцитів мікросудин дерми мали матрикс помірної щільності, цитоплазма була представлена поодинокими мітохондріями, пучками проміжних мікофіламентів, помірною кількістю піноцитарних везикул по люмінальній і базальній поверхнях цитолем. Нуклеоплазма мала помірну електронну щільність, яка дещо збільшувалася поряд з поодинокими ядерними порами. У місцях контактів ендотеліоцитів щільності не виявлялися. Люмінальна і базальна поверхні цитолем чітко контурувалася, були рівними, не утворювали крипт, однак мали ділянки ущільнення. Субендотеліальна зона ідентифікувалася у вигляді тонкої смужки з поодинокими зонами розширення. Перицити оточували капіляри, вміст їх цитоплазми був типовим. Поруч з судинами виявлялася значна кількість морфологічно незмінених колагенових волокон.

Встановлено, що активність Ca^{2+} -АТФази та Mg^{2+} -АТФази у базальних епідермоцитах виявлялася у вигляді поодиноких зерен і грудок преципітату на бокових ділянках цито- та каріолем. У фібробластах дерми помірна активність Ca^{2+} -АТФази проявлялася на поверхні цитолем, гранулярного ендоплазматичного ретикулума, ядра, ядерця і мітохондрій. У ендотеліоцитах капілярів виражене відкладення преципітату виявлялося на люмінальній і помірне на базальній поверхнях цитолем у вигляді тонких смужок. На мембранних структурах їх цитоплазми активність Ca^{2+} -АТФази мала певні відмінності, що були пов'язані з секреторною активністю. Перицити виявляли незначну Ca^{2+} -АТФазну активність на люмінальній і базальній поверхнях цитолем. Активність Mg^{2+} -АТФази на цитолемі фібробластів, м'язовому шарі артеріол була помірною.

У осіб I групи відмічалася витончення епідермісу. Зміни щільності, які були поодинокими у контролі, виявлялися у 2 – 3 рази частіше. Сенільний кератоз і акантоліз у сосочковому шарі виявлявся щілинами, утворенням значної кількості пухирців. Базальні епідермоцити мали структуру подібну до контролю, однак кількість мітотичних фігур у цих клітинах зменшувалася, що свідчило про пригнічення регенераторної функції шкіри. Певні зміни виявлялися у мікросудинах шкіри: ендотелій артеріол і капілярів мав набряк, їх ядра мали збільшений об'єм ($138,21 \pm 31,39$, $124,6 \text{ мкм}^3 \pm 19,22 \text{ мкм}^3$ відповідно), середня площа перерізу артеріол і капілярів сосочкового шару була збільшеною ($79,42 \pm 8,55$, $14,07 \text{ мкм}^2 \pm 2,65 \text{ мкм}^2$ відповідно). Кількість кровоносних мікросудин дерми була помірно зменшеною, їх стінки мали ознаки сплюснення, склерозу і часткової облітерації, звуження просвіту мікросудин. Набряк ендотеліоцитів венул відбувався за рахунок пристінкової адгезії

формених елементів крові та їх тромбозу. Поряд з мікросудинами виявлялися локуси відкладення гемосидерину. Кількість функціонуючих капілярів зменшувалася, вони звужувалися та деформувалися. Їх базальна мембрана була потовщеною, а її переріз коливався від 280 нм до 305 нм. Стінки артеріол і венул були потовщеними внаслідок гіпертрофії м'язової оболонки. У стінках артеріол і базальних мембран капілярів накопичувалися глікозаміноглікани, кальцій. Витончення дерми відбувалося в основному за рахунок сосочкового шару, де відбувалося сплюснення сосочків. Колагенові волокна мали ознаки ущільнення, витончення, гомогенізації, фрагментації та згрубіння. Вміст солей кальцію у структурі волокна збільшувався за рахунок плазматичного просочування, що виявлялося утворенням преципітату на його поверхні. Поряд з колагеновими волокнами визначалася помірна кількість аргірофільних, окситаланових і елауїнових волокон, що свідчило про порушення обміну у сполучній тканині. Дегенеративні зміни еластичних волокон виявлялися їх витонченням, хаотичним розташуванням та фрагментацією. Встановлено, що у базальних епідермоцитах активність Ca^{2+} -АТФази була низькою, а Mg^{2+} -АТФази збільшувалася, що виявлялося значною кількістю зерен преципітату у зонах контакту сусідніх клітин. Активність Ca^{2+} -АТФази на мембранних структурах цитоплазми ендотеліоцитів капілярів сосочкового шару дерми була значною. У фібробластах дерми активність Ca^{2+} -АТФази не мала істотних відмінностей порівняно з контролем. Активність Mg^{2+} -АТФази у ендотеліоцитах, перицитах була значною.

У осіб II групи товщина шару рогових лусочок збільшувалася внаслідок зменшення швидкості їх відлущування. В базальних епідермоцитах проявлялись ознаки вакуольної дегенерації цитоплазми та ядер, яка виявлялася змінами їх форми, гіпер- та гіпохромією та каріопікнозом. Кількість рядів остистого шару пропорційно зменшувалося порівняно з контролем і I групою. Виявлялися витягнуті та сплюснені базальні кератиноцити. Зміни меланогенезу виявлялися збільшенням кількості промеланосом, меланосом і гранул меланіну. Кількість еластичних волокон в дермі була пропорційно зменшеною порівняно зі значеннями у контролі і I групі, вони мали хаотичне розташування та поліморфізм структури. Ідентифікувалося значне число окситаланових і елауїнових волокон, що були розташовані по всій глибині дерми. Колагенові волокна по всій її глибині мали виражений набряк з ознаками гомогенізації колагенових волокон і утворенням еозинофільних мас поліморфного складу. Виявлялися локуси фіброзу за рахунок незрілого колагену. Після інкубації зрізів у розчині колагенази відбувалася деструкція колагенових волокон з утворенням локусів їх дезорганізації і розчинення, утворення уламків колагенових фібрил і гомогенних мас, а також зменшення інтенсивності забарвлення, що пов'язане з їх гідролітичним розщепленням [3]. Слід зазначити, що у осіб контрольної і I груп не було деструкції колагену під дією колагенази. Тобто зміни обміну колагенових білків при прогресуванні гіпертонічної хвороби призводять до зменшення резистентності колагенових волокон до дії цього ферменту. Зміни структури мікросудин були подібними до результатів, отриманих у осіб I групи, відмінність полягала у значній кількості мікроаневризму, венулярних сакуляцій, мікрокрововиливів через стінку мікросудин. Склеротичні зміни артеріол виявлялися звуженням і утворенням ділянок облітерації. Порушення їх проникності характеризували набряк ендотелію, виражене плазматичне просочування, склероз та гіаліноз. Внаслідок набухання ендотеліоцитів і потовщення базальних мембран значно зменшувалася просвіт

капілярів порівняно з I групою. Редукція капілярного русла була пов'язана з їх облітерацією. У венулах виявлялись ознаки вазодилатації, стазу, тромбозу, периваскулярного набряку. В стінках мікросудин накопичувались нейтральні, а у периваскулярному просторі кислі глікозаміноглікани. Навколо мікросудин виявлялись лейкоцитарні інфільтрати та мікрокрововиливи. Середня площа перерізу артеріол і капілярів сосочкового шару дещо збільшилася відносно попередньої групи і становила $83,4 \text{ мкм}^2 \pm 5,6 \text{ мкм}^2$ і $16,44 \text{ мкм}^2 \pm 3,1 \text{ мкм}^2$ відповідно. Ядра артеріол і капілярів мали об'єм, який практично не відрізнявся від значень I групи ($140,6 \text{ мкм}^3 \pm 12,2 \text{ мкм}^3$, $119,9 \text{ мкм}^3 \pm 13,4 \text{ мкм}^3$ відповідно). В основі патологічних змін мікросудин шкіри при гіпертонічній хворобі лежить, на нашу думку, процес інфільтрації стінок мікросудин тригліцеридами, глікозаміногліканами і ліпопротеїдами, що містяться у плазмі. Порушення проникності стінок мікросудин зумовлене гіалінозом базальної мембрани, інсудацією судинної стінки компонентами плазми, облітерацією капілярів з утворенням зон ішемії і фіброзу, що призводить до лімфоцитарної інфільтрації та порушення транскapілярного обміну. Неоангіогенез на фоні фіброзу є компенсаторним механізмом, який спрямований на стабілізацію мікроциркуляції, але його ефективність викликає сумніви. Нервові волокна дерми були витонченими. Виявлялася гіпертрофія сальних залоз. На поверхні колагенових волокон спостерігалися дрібні зерна солей кальцію. Проявлялись ознаки атрофії волоссяних фолікулів та сальних залоз. При забарвленні конго червоним амілоїд не виявлявся.

Ультраструктурні зміни базальних епідермоцитів осіб II групи виявлялися вакуолізацією цитоплазми, гомогенізацією тонофібрилярного апарату, мієліно- та ліпідоподібними структурами, збільшеним вмістом меланіну, дегенеративними ознаками мітохондріального апарату. Товщина базальної мембрани епідермісу коливалася в межах 250 – 380 нм. Над ділянками сосочкового шару дерми, що мали ознаки фіброзу, ідентифікувалися погано контуровані і різко видовжені базальні епідермоцити з ексцентрично розташованим ядром, зменшеним вмістом органел, гомогенізацією і вакуолізацією цитоплазми, утворенням аморфних та електроннощільних мас, що свідчило про порушення обмінних процесів у базальному шарі епідермісу і атрофічні зміни. Виявлялося ущільнення субендотеліального простору артеріол дерми за рахунок плазматичного просочування. Ідентифікувалися дрібні артеріоли з щілеподібним просвітом і нерівномірною поверхнею ендотеліоцитів по базальній поверхні. Люмінальна поверхня цитолемі цих клітин утворювала крипти. Їхня цитоплазма була нерівномірно гомогенізованою, вміст органел зменшеним, субендотеліальний простір був звуженим. Більшість клітин мало помірно виражену цитоплазматичну активність з боку базальної поверхні цитолемі, що виявлялася виросами і кавеолами. Зміни ендоплазматичного ретикулума виявлялися звуженням просвіту цистерн і частковою втратою гранул. У цитоплазмі ендотеліоцитів ідентифікувалася велика кількість мікропіноцитарних пухирців різного діаметру, які мали тенденцію до зливання і утворення везикулоподібних конгломератів з напівзруйнованими мембранами. Мітохондрії мали ознаки дегенерації у вигляді вакуолізації їх вмісту, ділянок просвітлення і ущільнення матриксу, руйнування крист, утворення мієліноподібних структур. Виявлялися капіляри з ознаками каріорексису, ущільнення цитоплазми і цитолемі. Спостерігалася розшарування базальної мембрани артеріол, венул і зміни периендотеліального простору капілярів у вигляді розширення та

звуження, проліферація їх ендотелію, деструкції перичитів. Ознаки апоптозу у капілярах були вираженими: виявлялося зменшення вмісту органел (ендоплазматичного ретикулума, вільних та зв'язаних рибосом, мітохондрій, лізосом), крипти по базальній і люмінальній поверхнях цитолемі, що мала слабо виражену її активність, локуси гомогенізованої і вакуолізованої цитоплазми, та розширення периендотеліального простору. Дрібні артерії мали ознаки склерозу: потовщення, ущільнення та багат шаровість м'язової оболонки, звуження їх просвіту, дегенеративні зміни ядер ендотеліоцитів, що мали конденсований і фрагментований хроматин, значну кількість крипт і кавеол по люмінальній та базальній поверхнях цих клітин, тромбоз мікросудини. Фібробласти мали ознаки вираженої синтетичної активності. Їх цитоплазма містила вакуолі різного діаметру, тубоподібні структури, гіпертрофовані мітохондрії зі зміненими кристами. Ядра фібробластів мали інвагінації, хроматин був конденсований. Спостерігалася значна кількість колагенових волокон різного ступеня зрілості, що мали хаотичне розташування. Кількість еластичних волокон була зменшеною. Тканинні базофіли були розташовані переважно в глибоких відділах дерми. Форма їх округла, овальна, витягнута, полігональна. У цитоплазмі виявлялася велика кількість цитоплазматичних вакуолей, електроннощільних включень і специфічних гранул, що мали неправильну форму та неоднорідну будову.

На мембранах базальних епідермоцитів активність Ca^{2+} -АТФази була дуже слабкою. У капілярах дерми цей показник був помірно вираженим по зовнішній поверхні базальної ділянки цитолемі і слабо вираженим по люмінальній її поверхні. Продукт реакції був пухким, мав зони конгломерації. Преципітат був розкиданий також по цитоплазмі ендотеліоцитів. У просвітлених капілярах активність Ca^{2+} -АТФази спостерігалася у вигляді великих поодиноких зерен преципітату. У склерозованих артеріях спостерігалася мінімальна активність ферменту на базальній поверхні ендотеліоцита. У фібробластах дерми АТФаза активність була поміною по його цитолемі та на рибосомах. При вивченні Mg^{2+} -АТФазної активності у морфологічних структурах шкіри активність ферменту ледь визначалася.

У осіб III групи гістологічні зміни на світлооптичному рівні були подібними до попередньої групи, але ступінь їх виявлення був значно більшим. У тканинах дерми привалював фіброз, лімфоцитарна інфільтрація. Кількість тканинних базофілів зменшувалася у порівнянні з попередньою групою, вони мали хаотичне розташування. Ідентифікувалася значна кількість окситаланових та елауїнових волокон. Волоссяні фолікули і потові залози мали ознаки дегенеративних змін. Середня площа перерізу артеріол і капілярів сосочкового шару дещо зменшилася відносно попередньої групи за рахунок фіброзу і становила $68,4 \text{ мкм}^2 \pm 5,1 \text{ мкм}^2$ і $13,5 \text{ мкм}^2 \pm 4,2 \text{ мкм}^2$ відповідно. Ядра артеріол і капілярів зменшували свій об'єм ($110,5 \text{ мкм}^3 \pm 14,1 \text{ мкм}^3$, $89,1 \text{ мкм}^3 \pm 9,3 \text{ мкм}^3$ відповідно). У дермі ідентифікувалися локуси відкладення солей кальцію, гемосидерину, амілоїду, нейтральних та кислих глікозаміногліканів. Під дією колагенази деструкція колагену була значною, аргірофільні волокна превалювали. Електронномікроскопічні зміни у тканинах шкіри були подібними до попередньої групи. Слід лише зазначити наявність дегенеративних змін у фібробластах, що виявлялося збільшеною кількістю вакуолей різного діаметру, каріопікнозом. На мембранах базальних епідермоцитів активність Ca^{2+} -АТФази не була поміченою. У капілярах дерми цей по-

казник був дуже слабким, що виявлялося утворенням хаотичних осередків по зовнішній поверхні базальної ділянки цитолемі. У склерозованих артеріях активність ферменту не виявлялася. У фібробластах дерми АТ-Фаза активність була дуже низькою. При вивченні Mg^{2+} -АТФазної активності у морфологічних структурах шкіри активність ферменту не визначено.

Висновки:

Гіпертонічна хвороба характеризується передчасним старінням шкіри, що є наслідком атеросклерозу. Зміни гемомікроциркуляторного русла шкіри характеризуються вогнищевою плазморагією і дистрофічними змінами ендотеліоцитів. Порушення процесів кератинізації, зміни базальної мембрани епідермісу, фіброз дерми, дегенерація еластичних і колагенових волокон мають вторинний характер і збільшуються пропорційно стадії гіпертонічної хвороби. Біохімічні зміни енергетичного балансу шкіри при гіпертонії виявляються зменшенням та зниженнями активності Ca^{2+} -АТФази та Mg^{2+} -АТФази на плазматичних мембранах базальних епідермоцитів, ендотеліоцитів мікросудин, перицитів, м'язів шкіри.

Перспективи подальших досліджень полягають у визначенні закономірностей морфофункціональних змін у шкірі і паренхіматозних органах.

Список використаних джерел

1. Автандилов Г.Г. Основы количественной патологической анатомии: Учеб. пособие. – М.: Медицина, 2002. – 240 с.
2. Демьяненко И.А., Васильева Т.В., Галкин И.И., Егоров М.В., Ильинская О.П., Манских В.Н., Федоров А.В., Макарова О.В. Исследование репаративных процессов при заживлении полнотелых кожных ран у старых мышей на фоне длительного приема 10-(6'-пластохинонил) децилтрифенилфосфония // Морфологические ведомости. – 2012. – №2. – С. 24–33.
3. Зварич Е.Н. Ca^{2+} -АТФ-аза плазматических мембран. Структура и функции. – Биологические мембраны. – 1991. – Т.8, №6. – С. 565–585.

4. Крупаткин А.И. Оценка локальной эффекторной функции сенсорных афферентов кожи конечностей с помощью лазерной доплеровской флоуметрии // Рос. Физиол. Журнал им. И.М. Сеченова. – 2002. – Т. 88, №5. – С. 658–662.
5. Микроскопическая техника: Руководство / Под ред. Д.С. Саркисова и Ю.Л. Перова. – М.: Медицина, 1996. – 544 с.
6. Тихонова И.В., Танканар А.В., Косякова Н.И., Чемерис Н.К. Исследование эндотелийзависимых колебаний кровотока в микроциркуляторном русле кожи человека // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2006. – Т. 21, №12. – С. 1200–1211.
7. Debbabi H., Uzan L., Mourad Jj., Safar M., Levi Bi., Tibrica E. Increased skin capillary density in treated essential hypertensive patients // Am J. Hypertens. – 2006. – 19, №5. – P. 477–483.
8. Denda M., Fujiwara S., Hibino T. Expression of voltage-gated calcium channel subunit alpha 1 C in epidermal keratinocytes and effects of agonist and antagonists of the channel on skin barrier homeostasis // Exp. Dermatol. – 2006. – 15, №6. – P. 455–460.
9. Feihl F., Liaudet L., Waeber B. The macrocirculation and microcirculation of hypertension // Curr Hypertens Rep. – 2009. – 11, №3. – P. 182–189.
10. Gryglewska B., Nęcki M., Cwynar M., Baron T., Grodzicki T. Local heat stress and skin blood flowmotion in subjects with familial predisposition or newly diagnosed hypertension // J. Blood Pressure. – 2010. – №1. – P. 1–7.
11. Li L., Mac-Mary S., Sainthillier J.M., Nouveau S., de Lacharriere O., Humbert P. Age-related changes of the cutaneous microcirculation in vivo // J. Gerontology. – 2006. – 52, №3. – P. 142–153.
12. Lindstedt I.H., Edvinsson M.L., Edvinsson L. Reduced responsiveness of cutaneous microcirculation in essential hypertension—a pilot study // J. Blood Press. – 2006. – 15, №5. – P. 275–280.
13. Mayahara H., Fujimoto K., Ando T. A new one-step method for the cytochemical localization of ouabain-sensitive, potassium-dependent p-nitrophenylphosphatase activity // Histochem. – 1980. – №67. – P. 125–138.
14. Mitchell G.F. Effects of central arterial aging on the structure and function of the peripheral vasculature: implications for end-organ damage // J. Appl Physiol. – 2008. – 105, №5. – P. 1652–1660.
15. Muller E.J., Caldelari R., Kolly C. et al. Consequences of depleted SERCA2-gated calcium stores in the skin // J Invest Dermatol. – 2006. – Vol. 126, №4. – p. 721–731.

Надійшла до редколегії 04.07.14

В. Верещака, д-р мед. наук

КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

РОЛЬ ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ В РАЗВИТИИ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ КОЖИ: ГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Морфологическим и биохимическим исследованиям подлежала кожа 45 человек обоего пола зрелого возраста (36 – 55 лет), страдающих гипертонической болезнью I – III степени. Установлено, что гипертоническая болезнь характеризуется преждевременным старением кожи, является следствием атеросклероза. Изменения гемомикроциркуляторного русла кожи характеризуется очаговой плазморагией и дистрофическими изменениями эндотелиоцитов. Нарушение процессов кератинизации, изменения базальной мембраны эпидермиса, фиброз дермы, дегенерация эластических и коллагеновых волокон имеют вторичный характер и увеличиваются пропорционально стадии гипертонической болезни. Биохимические изменения энергетического баланса кожи при гипертонии оказываются уменьшением и исчезновением активности Ca^{2+} -АТФазы и Mg^{2+} -АТФазы на плазматических мембранах базальных эпидермоцитов, эндотелиоцитов микрососудов, перицитов, мышц кожи.

Ключевые слова: гипертония, кожа, гистохимическое исследования.

V. Vereshchaka, DSc

Taras Shevchenko national university of Kyiv

THE INFLUENCE OF HYPERTENSION ON THE DEVELOPMENT OF MORPHOLOGICAL CHANGES IN SKIN: HISTOCHEMICAL INVESTIGATION

The skin of 45 patients of both sexes, at a mature age, was selected for morphological and biochemical investigations. All those patients suffered from hypertension (I – III degrees). The hypertension was found to be characterized with premature skin aging which was the result at atherosclerosis. The changes of skin haemomicrocirculator channel are characterized with local plasmorrhagia and dystrophic changes endotheliocytes. The ruining of keratinization processes, changes of basal membrane in epidermis, dermal fibrosis, degeneration of elastic fibers have the secondary characters. All these processes increase according to the degree of hypertension. Biochemical changes of skin energy balance in the case of hypertension are associated with decreasing the activity of Ca^{2+} -ATPase and Mg^{2+} -ATPase on plasmatic membranes of basal epidermocytes, endotheliocytes of microblood vessels of pericytes and skin muscles.

Key words: hypertension, skin, histochemical investigation.

УДК 577.112.7

Я. Гармаш, асп., Д. Мінченко, наук. співроб.,
А. Харькова, асп., О. Мінченко, проф.
Інститут біохімії НАН України, Київ

ЕКСПРЕСІЯ МРНК G6PD, TALDO1, TKT, PGLS ТА RPIA У КЛІТИНАХ ГЛІОМИ З ПРИГНІЧЕНОЮ ФУНКЦІЄЮ СИГНАЛЬНОГО ЕНЗИМУ ERN1 ЗА УМОВ ДЕФІЦИТУ ГЛЮКОЗИ

Оскільки пентозо-фосфатний цикл метаболізму глюкози відіграє важливу роль у рості злоякісних пухлин, нами проведено вивчення експресії генів основних ензимів цього циклу (G6PD, TKT, TALDO1, PGLS та RPIA) на рівні мРНК у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченою функцією ERN1 (from endoplasmic reticulum to nuclei-1), основного сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулу, в залежності від рівня глюкози у середовищі вирощування клітин. Встановлено, що рівень експресії генів TALDO1 та PGLS у клітинах гліоми знижувався за умов пригнічення функції сигнального ензиму ERN1, в той час як рівень експресії інших генів пентозо-фосфатного циклу при цьому істотно не змінювався. Також показано, що рівень експресії генів G6PD, TKT та PGLS підвищується, а гена RPIA знижується, у клітинах гліоми за умов дефіциту глюкози, причому виявлені зміни в експресії цих генів залежать від функції сигнального ензиму ERN1. Таким чином, результати даної роботи вказують на те, що у клітинах гліоми лінії U87 за умов пригнічення функції сигнального ензиму ERN1 знижувався рівень експресії лише двох із п'яти досліджених генів пентозо-фосфатного циклу, що за дефіциту глюкози у середовищі вирощування клітин гліоми по-різному змінювався рівень експресії більшості досліджених генів і що ці зміни залежали від опосередкованої ERN1 сигнальної системи стресу ендоплазматичного ретикулу.

Ключові слова: пентозо-фосфатний цикл, метаболізм глюкози, злоякісні пухлини, експресія генів.

Вступ. Пентозо-фосфатний цикл метаболізму глюкози відіграє важливу роль у регуляції різноманітних процесів в організмі як в нормі, так і за різних патологічних процесів, зокрема у рості злоякісних пухлин, і є залежним від стресу ендоплазматичного ретикулу [1]. Відомо, що блокада ERN1, основного сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулу, призводить до зниження інтенсивності процесів проліферації клітин та пригнічення росту пухлин через зміни в експресії генів, які відповідають за контроль клітинного циклу, апоптозу, гліколізу і низки інших процесів [2 – 8]. У зв'язку з цим дослідження рівня експресії основних генів, що контролюють пентозо-фосфатний цикл метаболізму глюкози, зокрема G6PD (глюкозо-6-фосфатденгідрогенази), TKT (транскетолази), TALDO1 (трансальдолази 1), PGLS (6-фосфоглюконолактази) та RPIA (рибозо-5-фосфатізомерази) [9 – 11], є досить актуальним. Ці ензими є надзвичайно важливими, оскільки забезпечують утворення пентоз, необхідних для синтезу нуклеїнових кислот, і посилення процесів проліферації та росту пухлин, причому трансальдолаза є ключовим ензимом пентозо-фосфатного шляху і значною мірою контролює баланс метаболітів в ньому [12].

Дефіцит поживних речовин є важливим фактором росту злоякісних пухлин, оскільки він задіяний в індукції стресу ендоплазматичного ретикулу, а його сигнальні системи змінюють експресію великої кількості генів, в тому числі і генів, що контролюють процеси проліферації та малигізації [13, 14]. Стрес ендоплазматичного ретикулу є відповіддю на накопичення не згорнутих або не правильно згорнутих протеїнів у ендоплазматичному ретикулумі, що опосередковується трьома сенсорно-сигнальними системами, локалізованими в ендоплазматичному ретикулумі: PERK (PRK-like ER kinase), ERN1 (from endoplasmic reticulum to nuclei-1) та ATF6 (activating transcription factor 6), але ERN1 (від ендоплазматичного ретикулу до ядра-1) є головним шляхом [15, 16]. Встановлено, що активація стресу ендоплазматичного ретикулу призупиняє вхід протеїнів, синтезованих *de novo*, до ендоплазматичного ретикулу і сприяє як фолдингу протеїнів в ендоплазматичному ретикулумі, так і їх деградації, відповідно для виживання клітин або їх смерті через асоційовані із стресом ендоплазматичного ретикулу механізми [13, 17, 18]. Таким чином, він приймає участь у ранній реакції клітин на акумуляцію у люмені ендоплазматичного ретикулу не згорнутих або не правильно згорнутих протеїнів як за фізіологічних, так і патологічних умов [13, 14].

Виявлено два різних каталітичних домени у біфункціональному сенсорно-сигнальному ензимі ERN1: серин/треонінова кіназа та ендорибонуклеаза, які опосередковують ERN1 сигналінг. Асоційована з ERN1 кіназна активність аутофосфорилує цей ензим, що є необхідним моментом його димеризації та активації ендорибонуклеазного домену. Останній є відповідальним за деградацію певних мРНК та ініціацію альтернативного сплайсингу пре-XBP1 мРНК [14]. Зрілий сплайс-варіант мРНК XBP1 (XBP1s) кодує синтез транскрипційного фактора, який контролює експресію сотень генів, що мають відношення до стресу ендоплазматичного ретикулу [7, 17]. Більше того, XBP1s має також ряд додаткових функцій, особливо у регуляції метаболізму глюкози [18, 19]. Так, протеїн-кіназа p38 MAP фосфорилує альтернативний сплайс-варіант XBP1 і посилює його міграцію до ядра. Крім того, регуляторна субодинація фосфатидилінозитол 3-кінази взаємодіє з XBP1 і також збільшує його ядерну транслокацію [18]. Недавно було показано, що XBP1s взаємодіє з транскрипційним фактором FOXO1 (Forkhead box O1) і направляє його для деградації, опосередкованої протеосою [19]. В той же час, було встановлено, що інгібітор кінази ERN1 може активувати ендорибонуклеазу цього ензиму, захищаючи клітини від стресу ендоплазматичного ретикулу. Можливо, що ця активація ендорибонуклеази ERN1 є результатом взаємодії ERN1 сигнального шляху з іншими сенсор-сигнальними системами стресу ендоплазматичного ретикулу в умовах пригнічення кіназної активності ERN1.

Злоякісні гліоми є надзвичайно агресивними пухлинами і характеризуються вираженим ангиогенезом та посиленою інвазією клітин в нормальну паренхіму мозку [13]. Як гіпоксія, так і чинники, що імітують ефекти ішемії, зокрема дефіцит глюкози, є асоційованими з ростом гліом і локально активують адаптивну відповідь, яка сприяє виживанню пухлинних клітин і посилює їх агресивність [3, 13]. Краще розуміння механізмів залежності клітин від ішемічних чинників є необхідною умовою для розробки терапевтичних стратегій пригнічення росту пухлин шляхом блокади регуляторних механізмів, зокрема шляхом можливого впливу на ключові регуляторні ензими пентозо-фосфатного шляху.

Метою даної роботи було вивчення експресії генів, що кодують синтез ключових ензимів пентозо-фосфатного шляху (G6PD, TKT, TALDO1, PGLS та RPIA) у клітинах гліоми лінії U87 з повним пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1 (виключені як кіназна, так і ендорибонуклеазна активності) за умов дефі-

циту глюкози у середовищі для вивчення залежності експресії цих генів від функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1, ключового у відповіді клітин на стрес ендоплазматичного ретикулулу.

Матеріали та методи. Клітини гліоми лінії U87 були отримані із ATCC (США) і росли у середовищі DMEM (Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium; Gibco, Invitrogen, США) з високою концентрацією глюкози (4,5 г/л), що містило додатково 2 мМ глутаміну, 10% ембріональної сироватки телят (Equitech-Bio, Inc., США), пеніцилін (100 одиниць/мл; Gibco) та стрептоміцин (0,1 мг/мл; Gibco) при 37°C в інкубаторі з 5% CO₂. У цій роботі були використані дві сублінії клітин гліоми. Одну з них було отримано шляхом селекції клонів, стабільно трансфікованих вектором pcDNA3.1, який був використаний для створення домінант-негативних конструкцій, що містили кДНК сенсорно-сигнального ензиму ERN1 без кіназного та ендорибонуклеазного доменів (dnERN1). Сублінія клітин гліоми, трансфікованих вектором була використана в якості контрольних клітин гліоми, що позначені на рисунках як контроль 1. З ним порівнювали ефект дефіциту глюкози, а також ефект пригнічення функції ензиму ERN1, на експресію генів пентозо-фосфатного циклу (*G6PD*, *TALDO1*, *TKT*, *PGLS* та *RPIA*) у цих контрольних клітинах гліоми. Друга сублінія була отримана шляхом селекції клонів, стабільно трансфікованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 у векторі pcDNA3.1. У цих клітинах гліоми була повністю пригнічена як кіназна, так і ендорибонуклеазна активності, що було оцінено по пригніченню фосфорилювання ERN1 та утворенню альтернативного сплайс-варіанту XBP1 за умов стресу ендоплазматичного ретикулулу, індукованого тунікамідом (10 мкг/мл – 2 години) у попередній роботі [20]. Ця сублінія клітин була використана як контроль 2 при вивченні ефекту дефіциту глюкози на експресію генів пентозо-фосфатного циклу саме у цих клітинах. Дефіцит глюкози створювали шляхом заміни середовища DMEM з глюкозою на середовище без глюкози (Gibco) і витримували протягом 16 годин.

РНК із клітин гліоми виділяли як описано раніше [20]. Осад РНК промивали 75 % етанолом, розчиняли у воді, вільній від рибонуклеаз, пересаджували етанолом для позбавлення препаратів РНК залишків реагенту Trisol, знову розчиняли у воді і використовували для синтезу комплементарної ДНК.

Рівень експресії генів *G6PD*, *TALDO1*, *TKT*, *PGLS* та *RPIA* у клітинах гліоми визначали методом кількісної полімеразної реакції, використовуючи набір реагентів SYBRGreen Mix (AB gene, Велика Британія) та апарат "Mx 3000P QPCR" (Stratagene, США). Синтез кДНК проводили за допомогою QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN, Німеччина) згідно протоколу виробника. Для ампліфікації кДНК *G6PD* (glucose-6-phosphate dehydrogenase) були використані такі праймери: прямий (5'-GAGGCCGTGTACACCAAGAT-3' та зворотний (5'-TACCCAAGGCCGTACTTGTC-3'). Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 1430 – 1439 та 1644 – 1625 кДНК *G6PD* людини (GenBank номер NM_000402). Розмір ампліфікованого фрагмента 215 п.н.з. Ампліфікацію кДНК *TKT* (transketolase) проводили за допомогою прямого (5'-

GACAACCTTGTGGCCATTCT-3') та зворотного (5'-TCTGCTCAGCCATGTTTTTG-3') праймерів, які відповідають послідовності 1530 – 1549 та 1834 – 1815 кДНК *TKT* людини (GenBank номер NM_001064). Розмір ампліфікованого фрагмента 283 п.н.з. Для ампліфікації кДНК *TALDO1* (transaldolase 1) були використані такі праймери: прямий (5'-GGCTGTGACTTCCTCACCAT-3' та зворотний (5'-CTCAGGGATGCGCTACTTTC-3'). Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 795 – 814 та 1076 – 1057 кДНК *TALDO1* людини (GenBank номер NM_006755). Розмір ампліфікованого фрагмента 282 п.н.з. Ампліфікацію кДНК *PGLS* (6-phosphogluconolactonase, 6PGL) проводили за допомогою прямого 5'-CTGCTCACTCTTCCCAGACC-3' та зворотного (5'-TCCAGTTGCCACAAAGATGA-3') праймерів, які відповідають послідовності 515 – 534 та 665 – 646 кДНК *PGLS* людини (GenBank номер NM_012088). Розмір ампліфікованого фрагмента 151 п.н.з. Для ампліфікації кДНК *RPIA* (5-phosphate isomerase A) були використані такі праймери: прямий – 5'-AGTGCTGGGAATTGGAAGTG-3' та зворотний – 5'-CGATCACGATGAAGCGACTA-3'. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 335 – 354 та 627 – 608 кДНК *RPIA* людини (GenBank номер NM_144563). Розмір ампліфікованого фрагмента 293 п.н.з. Ампліфікацію кДНК бета-актину (*ACTB*) проводили за допомогою прямого – 5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3' та зворотного – 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3' праймерів. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 747 – 766 та 980 – 961 кДНК *ACTB* людини (GenBank номер NM_001101). Розмір ампліфікованого фрагмента 234 п.н.з. По рівню експресії мРНК бета-актину оцінювали кількість РНК, взятої для аналізу. Праймери були отримані з компанії "Sigma-Aldrich" (США).

Аналіз результатів дослідження експресії генів *G6PD*, *TALDO1*, *TKT*, *PGLS* та *RPIA* виконували з допомогою спеціальної комп'ютерної програми "Differential expression calculator" а статистичний аналіз – з використанням програмного забезпечення OriginPro 7.5. Значення експресії генів *PLK1*, *PLK2*, *PLK3* та *PLK4* нормалізували по рівню експресії бета-актину і представляли у відсотках від контролю (100 %). Представлені середні значення $\pm m$ чотирьох незалежних експериментів.

Результати дослідження та їх обговорення. Як видно із даних, приведених на рис. 1А, пригнічення функції кіназної та ендорибонуклеазної активностей сенсорно-сигнального ензиму ERN1, основного сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулулу, знижує у клітинах гліоми лінії U87 рівень експресії таких генів пентозо-фосфатного циклу як *TALDO1* та *PGLS*, у порівнянні з контрольними клітинами гліоми, трансфікованими вектором pcDNA3.1 (рис. 1А). Разом з тим, рівень експресії генів *G6PD*, *TKT* та *RPIA* істотно не залежить від функції сигнального ензиму ERN1, оскільки за умов пригнічення активності сигнального ензиму ERN1 істотних змін у рівнях експресії всіх цих генів не було виявлено (рис. 1А).

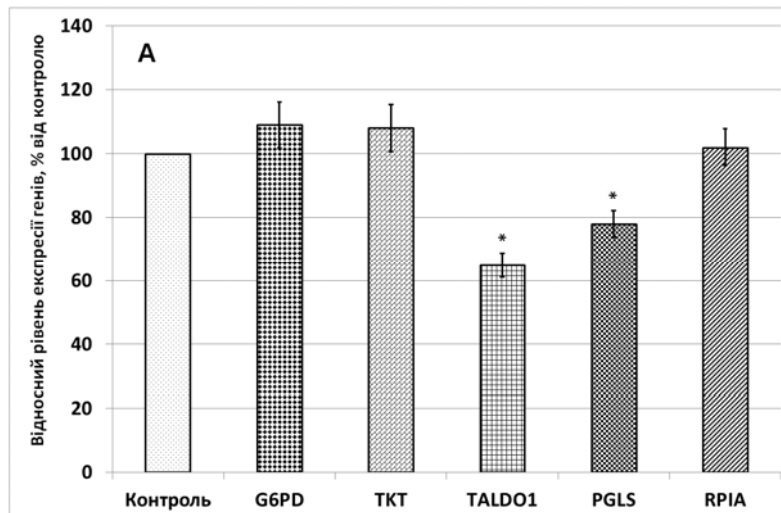


Рис. 1А

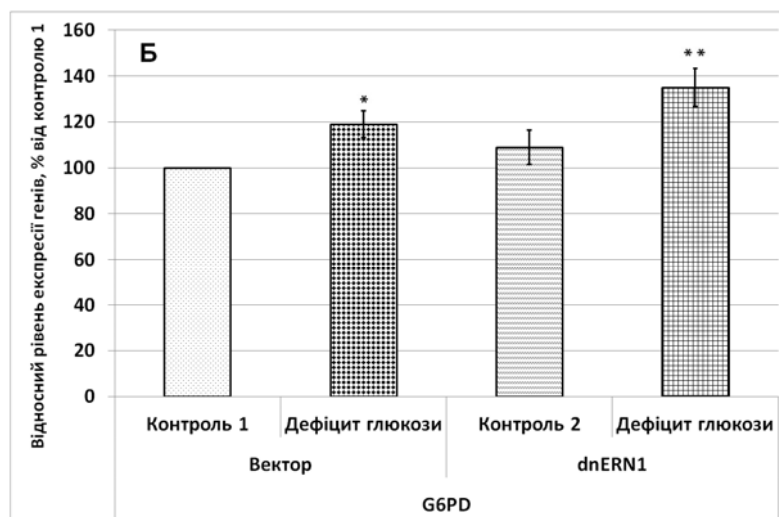


Рис. 1Б

Рис. 1. Відносний рівень експресії генів *G6PD*, *TALDO1*, *TKT*, *PGLS* та *RPIA* у клітинах гліоми лінії U87, стабільно трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму ERN1 (dnERN1) на основі вектору pcDNA3.1 та клітин, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Контроль) (А), а також гена *G6PD* (glucose-6-phosphate dehydrogenase) за умов дефіциту глюкози у середовищі (Б) по даним кількісної полімеразної ланцюгової реакції. Величину рівня експресії цих мРНК нормалізували по експресії мРНК бета-актину і порівнювали з контролем, який був прийнятим за 100 %; $n = 4$; * – $P < 0,05$ при порівнянні з контролем 1; ** – $P < 0,05$ при порівнянні з контролем 2

Таким чином, зменшення рівня експресії генів *TALDO1* та *PGLS*, а особливо гена *TALDO1*, як ключового гена пентозо-фосфатного циклу, за умов виключення функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1 може призводити до зниження інтенсивності синтезу рибози і, відповідно, нуклеотидів, і може бути причетним до пригнічення процесів проліферації клітин гліоми без функціонального ERN1 [4, 5, 7, 8].

На рис. 1А представлені результати дослідження впливу дефіциту глюкози на рівень експресії гена *G6PD* у контрольних клітинах гліоми та в клітинах з повним

пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1. Встановлено, що дефіцит глюкози у середовищі призводить до посилення експресії цього гена у контрольних клітинах гліоми на 19 % у порівнянні з контролем 1, а у клітинах з пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1 ефект дефіциту глюкози на рівень експресії цього гена був дещо більшим (+ 24 %). Аналогічні дані були отримані при вивченні дії дефіциту глюкози на рівень експресії іншого гена пентозо-фосфатного циклу – TKT (рис. 2А).

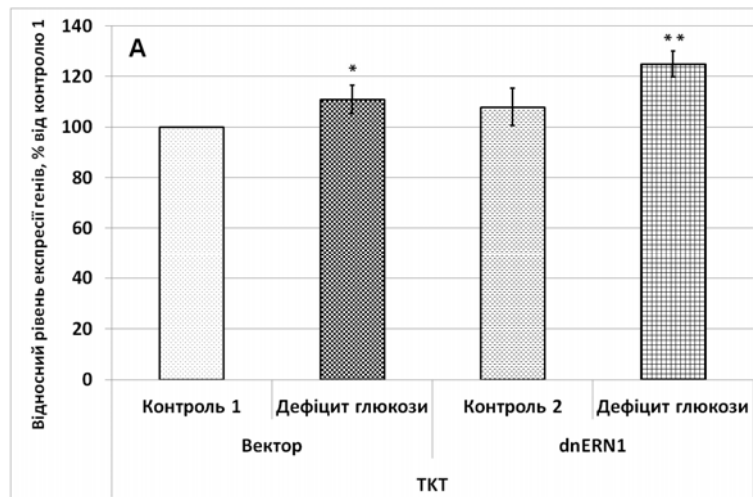


Рис. 2А

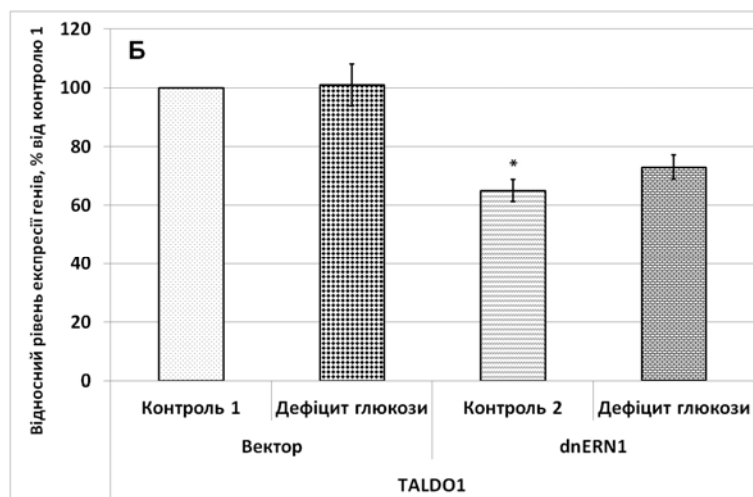


Рис. 2Б

Рис. 2. Відносний рівень експресії генів TKT (transketolase) та TALDO1 (transaldolase; Б) у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором рсDNA3.1 (Контроль) та клітин, стабільно трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму ERN1 (dnERN1) за умов дефіциту глюкози у середовищі по даним кількісної полімеразної ланцюгової реакції, де TKT (А), а TALDO1 (Б). Величину рівня експресії цих мРНК нормалізували по експресії мРНК бета-актину і порівнювали з контролем, який був прийнятим за 100 %; n = 4; * – P < 0,05 при порівнянні з контролем 1; ** – P < 0,05 при порівнянні з контролем 2

Так, за умов дефіциту глюкози у середовищі спостерігається зростання рівня експресії цього гена у контрольних клітинах гліоми на 11 % у порівнянні з контролем 1, в той час як у клітинах з пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1 ефект дефіциту глюкози на рівень експресії цього гена був також більшим (+ 16 %), що переконливо свідчить про залежність регуляції експресії цих генів концентрацією глюкози у середовищі від функції сигнального ензиму ERN1.

Дослідження гена експресії гена *TALDO1* у клітинах гліоми за умов дефіциту глюкози показало, що рівень його експресії за цих експериментальних умов істотно не змінюється (рис. 2Б), що може вказувати на важливість цього ензиму у функціонуванні пентозо-фосфатного шляху не лише як джерела рибозо-5-фосфату і нуклеотидів, а і для підтримання рівня

NADPH, необхідного для синтезу ліпідів, а також відновленого глутатіону для захисту сульфгідрильних груп і цілісності клітин від оксидативного стресу. На рис. 3А представлені результати дослідження впливу дефіциту глюкози на рівень експресії гена *PGLS* у контрольних клітинах гліоми та в клітинах з повним пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1. Встановлено, що дефіцит глюкози у середовищі призводить до збільшення рівня експресії цього гена у контрольних клітинах гліоми на 16 % у порівнянні з контролем 1, а у клітинах з пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1 ефект дефіциту глюкози на рівень експресії цього гена був значно більшим. Так, за умов пригнічення функції сигнального ензиму ERN1 рівень експресії гена *PGLS* у клітинах гліоми збільшувався на 37 % (рис. 3А).

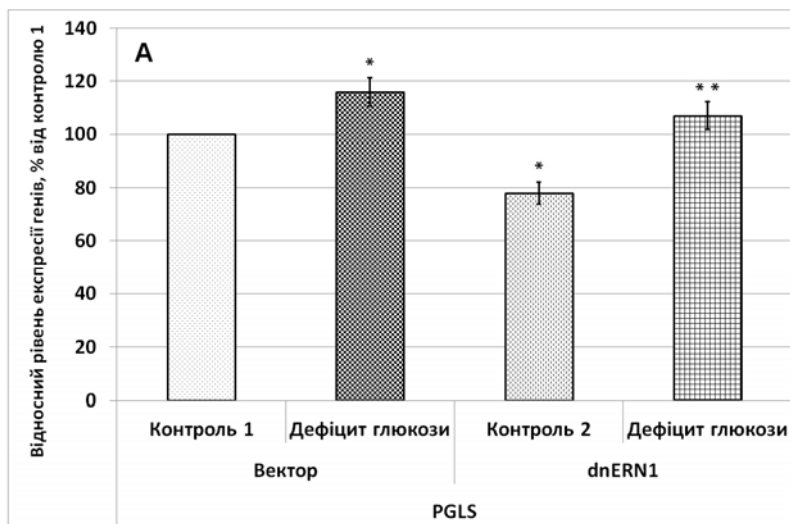


Рис. 3А

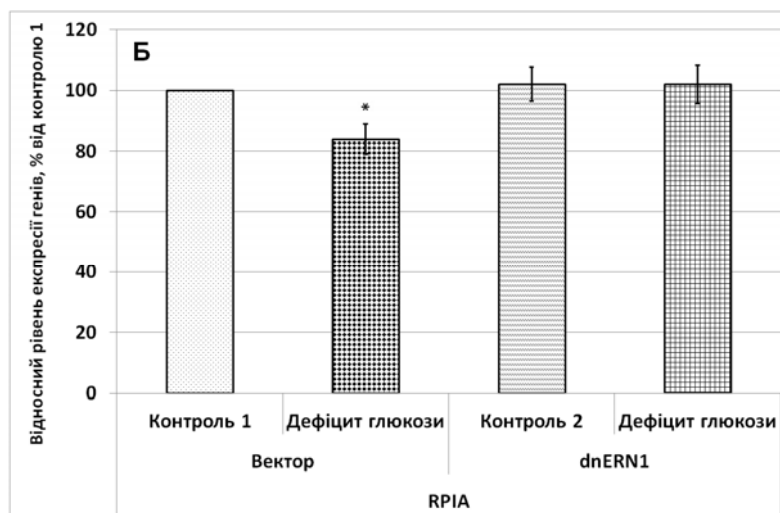


Рис. 3Б

Рис. 3. Відносний рівень експресії генів PGLS (6-phosphogluconolactonase; А) та RPIA (5-phosphate isomerase А; Б) у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Контроль) та клітин, стабільно трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму ERN1 (dnERN1) за умов дефіциту глюкози у середовищі по даним кількісної полімеразної ланцюгової реакції, де PGLS (А), а RPIA (Б). Величину рівня експресії цих мРНК нормалізували по експресії мРНК бета-актину і порівнювали з контролем, який був прийнятим за 100 %; n = 4; * – P < 0,05 при порівнянні з контролем 1; ** – P < 0,05 при порівнянні з контролем 2

Разом з тим, серед досліджених генів пентозо-фосфатного шляху метаболізму глюкози був виявлений ген, рівень експресії якого знижувався у клітинах гліоми, але лише у тих клітинах, що мали нативний ERN1 (рис. 3Б). Це ген рибозо-5-фосфатізомерази (RPIA), причому у клітинах гліоми з пригніченою функцією ензиму ERN1 рівень його експресії істотно не змінювався за умов відсутності у середовищі глюкози у порівнянні з контролем 2. Ці дані свідчать про різно-направлений характер змін рівня експресії генів пентозо-фосфатного шляху за умов дефіциту глюкози, хоча рівень експресії гена ключового ензиму цього шляху, трансальдолази 1, при цьому істотно не змінюється. Враховуючи дані про те, що гіпоксія і ішемія є важливими чинниками росту злоякісних пухлин [3, 4, 7], посилення експресії частини генів пентозо-фосфатного шляху за умов дефіциту глюкози може в деякій мірі пояснити ефект ішемії.

Таким чином, результати цих досліджень вказують на залежність експресії частини генів пентозо-фосфатного шляху метаболізму глюкози у клітинах гліоми лінії U87 від функціональної активності ERN1, основного сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулуму, а також чутливість їх експресії до дефіциту глюкози у середовищі, причому ефект дефіциту глюкози на рівень експресії більшості досліджених генів змінювався у клітинах гліоми з пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1. Більше того, зниження рівня експресії генів *TALDO1* та *PGLS* у клітинах гліоми з виключеною функцією сигнального ензиму ERN1 повністю узгоджується з пригніченням росту пухлин з цих клітин *in vivo* [4, 7, 8], оскільки посилення експресії генів пентозо-фосфатного шляху метаболізму глюкози корелює з посиленою проліферацією клітин.

Висновки

1. Встановлено, що пригнічення функцій біфункціонального сенсорно-сигнального ферменту ERN1 (від ендоплазматичного ретикулу до ядра-1), який є основною сигнальною системою стресу ендоплазматичного ретикулу, зменшує рівень експресії генів пентозо-фосфатного циклу *TALDO1* та *PGLS* у клітинах гліоми лінії U87, але при цьому рівень експресії генів *G6PD*, *TKT* та *RPIA* істотним чином не змінюється.

2. Показано, що рівень експресії генів *G6PD*, *TKT* та *PGLS* збільшується у клітинах гліоми за умов дефіциту глюкози у середовищі і залежить від функції сигнального ферменту ERN1.

3. Показано, що рівень експресії гена *TALDO1*, ключового гена пентозо-фосфатного циклу, істотно не змінюється за умов дефіциту глюкози у середовищі в обох типах клітин гліоми, а гена *RPIA* – знижується, але лише у контрольних клітинах гліоми.

4. Результати досліджень свідчать про залежність експресії частини ключових генів пентозо-фосфатного циклу від функції сигнального ферменту ERN1, а також від рівня глюкози у середовищі, причому сигнальний фермент стресу ендоплазматичного ретикулу ERN1 змінює ефект глюкози на експресію більшості цих генів.

Список використаних джерел

1. Minchenko D.O., Garmash I.A., Bashta Y.M. et al. // *Int. J. Genomic Med.* – 2013. – Vol. 1, N 1. – P. 104 (1-5).
2. Minchenko D., Hubenya O., Terletsky B. et al. // *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska.* – 2010. – 23, N 3. – P. 179-184.

3. Drogat B., Auguste P., Nguyen D.T. et al. // *Cancer Res.* – 2007. – 67. – P. 6700 – 6707.
4. Auf G., Jabouille A., Guérit S. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010. – 107, N 35. – P. 1555 – 15558.
5. Minchenko D.O., Karbovskiy L.L., Danilovskiy S.V. et al. // *Nat. Sci.* – 2012. – 4, N 1. – P. 38-46.
6. Minchenko D.O., Karbovskiy L.L., Danilovskiy S. V. et al. // *Am. J. Mol. Biol.* – 2012. – 2, N 1. – P. 21-31.
7. Minchenko O.H., Kubaichuk K.I., Minchenko D.O., Kovalevska O.V., Kulnich A.O., Lypova N.M. Molecular mechanisms of ERN1-mediated angiogenesis. *Int. J. Physiol. Pathophysiol.* – 2014. – 5, N 1. – P. 1-22.
8. Auf G., Jabouille A., Delugin M. et al. // *BMC Cancer.* – 2013. – 13, N 1. – P. 597.
9. Pan S., World C.J., Kovacs C.J., Berk B.C. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2009. – 29, N 6. – P. 895-901.
10. Wamelink M.M., Struys E.A., Jakobs C. // *J. Inher. Metab. Dis.* – 2008. – 31, N 6. – P. 703-717.
11. Berry G.T. // *J. Inher. Metab. Dis.* – 2008. – 31, N 6. – P. 661.
12. Basu R., Barosa C., Basu A. et al. // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2011. – 300, N 2. – P. E296-E303.
13. Moenner M., Pluquet O., Bouhecaille M., Chevet E. // *Cancer Res.* 2007. – 67, N 22. – P. 10631 – 10634.
14. Zhang K., Kaufman R.J. // *J. Biol. Chem.* – 2004. 279, N 25. – P. 25935 – 25938.
15. Aragón T., van Anken E., Pincus D. et al. // *Nature.* – 2009. – 457, N 7230. – P. 736 – 740.
16. Fels D.R., Koumenis C. // *Cancer Biology & Therapy.* – 2006. – 5, N 7. – P. 723 – 728.
17. Hollien J., Lin J.H., Li H. et al. // *J. Cell. Biol.* – 2009. – 186, N 3. – P. 323 – 331.
18. Lee J., Sun C., Zhou Y. et al. // *Nature Medicine.* – 2011. – 17, N 10. – P. 1251 – 1260.
19. Zhou Y., Lee J., Reno C.M. et al. // *Nature Medicine.* – 2011. – 17, N 3. – P. 356 – 365.
20. Minchenko D.O., Kubaichuk K.I., Hubenya O.V. et al. *Adv. Biol. Chem.* – 2011. – 2, N 2. – P. 198 – 206.

Надійшла до редколегії 17.04.14.

Я. Гармаш, асп., Д. Минченко. науч. сотр., А. Харькова. асп., А. Минченко. проф.
Институт биохимии НАН Украины, Киев

ЭКСПРЕССИЯ мРНК G6PD, TALDO1, TKT, PGLS И RPIA В КЛЕТКАХ ГЛИОМЫ С ПОДАВЛЕННОЙ ФУНКЦИЕЙ СИГНАЛЬНОГО ЭНЗИМА ERN1 В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА ГЛЮКОЗЫ

Поскольку пентозо-фосфатный цикл метаболизма глюкозы играет важную роль в росте злокачественных опухолей, нами проведено изучение экспрессии генов основных ферментов этого цикла (*G6PD*, *TKT*, *TALDO1*, *PGLS* и *RPIA*) на уровне мРНК в клетках глиомы линии U87 с подавленной функцией ERN1 (from endoplasmic reticulum to nuclei -1), основного сенсорно-сигнального фермента стресса эндоплазматического ретикула, в зависимости от уровня глюкозы в среде выращивания клеток. Установлено, что уровень экспрессии генов *TALDO1* и *PGLS* в клетках глиомы снижался в условиях угнетения функции сигнального фермента ERN1, в то время как уровень экспрессии других генов пентозо-фосфатного цикла при этом существенно не менялся. Также показано, что уровень экспрессии генов *G6PD*, *TKT* и *PGLS* повышается, а гена *RPIA* снижается в клетках глиомы в условиях дефицита глюкозы, причем обнаружены изменения в экспрессии этих генов зависят от функции сигнального фермента ERN1. Таким образом, результаты данной работы указывают на то, что в клетках глиомы линии U87 в условиях угнетения функции сигнального фермента ERN1 снижался уровень экспрессии только двух из пяти исследованных генов пентозо-фосфатного цикла, что при дефиците глюкозы в среде выращивания клеток глиомы по-разному менялся уровень экспрессии большинства исследованных генов и эти изменения зависели от опосредованной ERN1 сигнальной системы стресса эндоплазматического ретикула.

Ключевые слова: пентозо-фосфатный цикл, метаболизм глюкозы, злокачественные опухоли, экспрессия генов.

I. Garmash, PhD stud., D. Minchenko, research., A. Kharkova, PhD stud., O. Minchenko, prof.
Palladin institute of biochemistry of National Academy of Sciences of Ukraine NASU

EXPRESSION OF G6PD, TALDO1, TKT, PGLS AND RPIA MRNA IN GLIOMA CELLS WITH BLOCKADE OF ERN1 SIGNALING ENZYME FUNCTION IN GLUCOSE DEPRIVATION CONDITION

Pentose-phosphate cycle of glucose metabolism plays an important role in tumor growth. We studied the gene expressions at mRNA level of basic enzymes of this cycle (*G6PD*, *TKT*, *TALDO1*, *PGLS* and *RPIA*) in U87 glioma cells with suppressed function of ERN1 (from endoplasmic reticulum to nuclei-1), the major sensor and signaling enzyme of endoplasmic reticulum stress, upon glucose level in the growing medium. It was shown that the level of *TALDO1* and *PGLS* gene expressions in glioma cells is significantly decreased upon suppression of ERN1 signaling enzyme function. At the same time, the expression level of other genes of pentose-phosphate cycle did not change significantly. It was also shown that the expression level of *G6PD*, *TKT* and *PGLS* genes is increased, but *RPIA* gene is decreased in glioma cells upon glucose deprivation. Moreover, the changes in the expression level of these genes is dependent upon ERN1 signaling enzyme function. Thus, these results demonstrate that in glioma cells upon suppression of ERN1 signaling enzyme function is decreased the expression level of only two from five studied genes of pentose-phosphate cycle and that glucose deprivation conditions is induced in glioma cells variable changes in the expression of most investigated genes in dependence from ERN1 signaling enzyme function.

Key words: Pentose-phosphate cycle, glucose metabolism, gene expressions, tumor growth.

УДК 591.1:612.3:612.6

Н. Скочко, інж. 2-ї кат., Є. Торгалло, канд. біол. наук, Т. Берегова, д-р біол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ**ВІКОВІ ЗМІНИ СЕКРЕЦІЇ ГІДРОХЛОРИДНОЇ КИСЛОТИ ТА ПЕПСИНУ У ШЛУНКУ ЩУРІВ**

У порівнянні з щурами ювенільного віку у щурів всіх інших вікових груп (юнацький, зрілий, літній і старечий вік) секреція гідрохлоридної кислоти (НСІ) в шлунку була достовірно більшою. Найбільшою вона була у щурів юнацького віку. У порівнянні з щурами ювенільного віку дебіт НСІ шлункової секреції, стимульованої карбахоліном, у щурів 6-ти та 18-ти місячного віку був більшим, у щурів раннього зрілого та старечого віку був таким же. Дебіт пепсину базальної секреції у щурів ювенільного і юнацького віку був однаковим. При досягненні щурами зрілого віку дебіт пепсину в базальному шлунковому соці падав і залишався меншим у щурів літнього і старечого віку. Дебіт пепсину шлункової секреції, стимульованої карбахоліном, залишався на одному рівні у щурів ювенільного, юнацького і зрілого віку. Лише у щурів літнього і старечого віку він зменшувався.

Ключові слова: гідрохлоридна кислота, пепсин, старіння.

Вступ. До початку 90-х років минулого століття вважалося, що зі зростанням віку секреція гідрохлоридної кислоти в шлунку людей прогресивно зменшується внаслідок втрати парієтальних клітин, що є результатом атрофічних гастритів [1]. Падіння секреції кислоти і атрофічні зміни в слизовій оболонці шлунка при старінні спостерігались також у гризунів [1-4]. Проте, починаючи з відкриття у 1982 р. *Helicobacter pylori* ця парадигма змінилась через велику кількість робіт, в яких доведено, що саме *Helicobacter pylori* інфікування викликає атрофічні зміни в слизовій оболонці шлунка [5], а у старих людей секреція гідрохлоридної кислоти в шлунку не змінюється, якщо у них немає атрофічних змін в слизовій оболонці шлунка та *Helicobacter pylori* інфікування [6-8]. Не дивлячись на це, ретельний аналіз літератури останніх років вказує на неоднозначність у результатах і висновках щодо стану секреторної функції шлунка в залежності від віку. Так, є дані про відсутність вікових змін в базальній секреції гідрохлоридної кислоти в шлунку щурів та зменшенні стимульованої секреції кислот в шлунку щурів зрілого (17 місяців) і старечого віку (24 місяці) [5]. В цій же роботі автори зкорегували отримані показники з урахуванням маси тіла щурів і показали, що концентрація базальної та стимульованої кислоти в ммоль $H^+/2$ год/мг маси тіла з віком падає. В іншій роботі показано, що з віком секреція гідрохлоридної кислоти в шлунку людей зростає, а секреція пепсину – падає [9]. На користь цієї роботи можна навести дані щодо зростання експресії ключового фермента синтезу гідрохлоридної кислоти H^+-K^+-ATP фази в парієтальних клітинах слизової оболонки шлунка здорових людей, старших за 60 років у порівнянні з молодими людьми [10], а також дані про зменшення секреції пепсину з віком [6]. Протилежні дані отримані на людях групою дослідників на чолі з Коркушко О.В. [11-13]. Вони показали, що при старінні зменшується виділення гідрохлоридної кислоти як в базальному, так і стимульованому гістаміном і пентагастріном шлунковому секреті. Перелік робіт з даної тематики можна продовжувати, але повної в дану проблему ясності вони так не вносять. Ми також досліджували секрецію гідрохлоридної кислоти і пепсину в шлунку щурів різних вікових груп [14-15]. Проте, опубліковані результати не включали дані, отримані на щурах юнацького та старечого віку.

Метою роботи було дослідити базальну та стимульовану карбахоліном секрецію гідрохлоридної кислоти і пепсину в шлунку щурів всіх вікових груп.

Об'єкт та методи досліджень. Дослідження проведені в умовах хронічного експерименту на 99 білих нелінійних щурах, самках, які народжені різними самками в один день. Всі експерименти виконували у відповідності до вимог комісії з біоетики ННЦ "Інститут біології"

та згідно з "Загальними етичними принципами експериментів на тваринах" (Київ, 2001), що узгоджується з положеннями "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних наукових цілей" (Страсбург, 1986).

У віці 3 (ювенільний вік), 6 (юнацький вік), 12 і 18 (зрілий вік), 21 (літній вік) та 24 (старечий вік) рандомізовано відбирали тварин для проведення експериментальних процедур. Щурів наркотизували уретаном в дозі 1,15 г/кг ваги (внутрішньочеревинно). У тварин усіх вікових груп в умовах гострого експерименту методом перфузії ізольованого шлунка за Гхошем та Шільдом [16] в 10-ти хвилинних пробах перфузату електротрометрично визначали загальну кислотність за допомогою іономіра ЭВ-74 з використанням 0,01N розчину гідроокису натрію (NaOH) та концентрацію пепсину колориметричним методом за Тін [17]. Кількість NaOH, що йшла на титрування перфузату в 10-ти хвилинній пробі, дорівнювала дебіту гідрохлоридної кислоти, що виділялася в шлунку за даний період часу. Дебіт пепсину визначали з урахуванням об'єму перфузату, який збирали упродовж кожної 10-хвилинної проби.

Після 120 хв реєстрації базальної секреції гідрохлоридної кислоти та пепсину щурам вводили стандартний стимулятор секреції неселективний агоніст мускаринових і ацетилхолінових рецепторів – карбахолін (0,01 мг/кг, внутрішньочеревинно). Після введення карбахоліну експеримент тривав ще 120 хв, що було обумовлено тривалістю дії карбахоліну. Кількість NaOH, що йшла на титрування перфузату в 10-ти хвилинній пробі, дорівнювала дебіту гідрохлоридної кислоти, що виділялася в шлунку за даний період часу. Після визначення дебіту гідрохлоридної кислоти та дебіту пепсину шлункового соку, що виділявся упродовж 10 хв, визначали дебіт гідрохлоридної кислоти та дебіт пепсину базальної шлункової секреції за 120 хв, а також стимульованої шлункової секреції за 120 хв.

Статистичну обробку даних проводили з використанням пакету математичних програм StatisticSoft 6.0. У зв'язку з невеликим об'ємом вибірок, для перевірки розподілу на нормальність було застосовано W тест Шапіро-Віллка. Ймовірність похибки першого роду $\alpha > 0,05$. Порівняння даних проводилося за допомогою для t-критерію Стюдента для незалежних вибірок. Дані представлені у вигляді $M \pm m$.

Результати та їх обговорення. В результаті проведених досліджень встановлено, що у щурів 3-х місячного віку дебіт гідрохлоридної кислоти базальної шлункової секреції складав $12,95 \pm 1,92$ мкмоль/120 хв ($n=17$) (табл.1).

Таблиця 1. Дебіт гідрохлоридної кислоти базальної і стимульованої карбахоліном шлункової секреції у щурів різних вікових груп (M±m)

Вік тварин, місяці	Дебіт гідрохлоридної кислоти базальної шлункової секреції (мкмоль/120 хв)	Дебіт гідрохлоридної кислоти стимульованої карбахоліном шлункової секреції (мкмоль/120 хв)
3	12,95±1,92 (n=17)	70,12±11,00 (n=8)
6	65,85±5,38** (n=8)	107,4±9,54* (n=8)
12	30,78±5,55* (n=8)	89,33±13,12 (n=8)
18	34,75±9,42* (n=8)	246,43±49,11** (n=7)
21	49,23±10,39* (n=6)	214,77±39,08** (n=6)
24	32,10±5,68* (n=7)	87,02±51,35 (n=7)

Примітка:

* – $p < 0,05$ порівняно зі щурами 3 місячного віку;** – $p < 0,01$ порівняно зі щурами 3 місячного віку;• – $p < 0,05$ порівняно зі щурами 6-ти місячного віку.

У віці 6, 12, 18, 21 та 24 місяці дебіт складав 65,85±5,38 мкмоль/120 хв (n=8), 30,78±5,55 мкмоль/120 хв (n=8), 34,75±9,42 мкмоль/120 хв (n=8), 49,23±10,39 мкмоль/120 хв (n=6) та 32,10±5,68 мкмоль/120 хв (n=7), відповідно. Таким чином, найбільш інтенсивною секреція гідрохлоридної кислоти мала місце у щурів юнацького віку, яка за інтенсивністю була в 5 разів ($p < 0,05$) більшою, ніж у щурів ювенільного віку. У тварин 12-ти місячного віку дебіт гідрохлоридної кислоти шлункового соку був у 2,5 рази ($p < 0,05$) більшим, ніж у щурів ювенільного віку, проте у 2,1 рази ($p < 0,05$) меншим порівняно зі щурами юнацького віку. Між дебітом гідрохлоридної кислоти базальної шлункової секреції у щурів зрілого, пізнього зрілого, літнього та старечого віку статистично достовірної різниці не було.

У щурів 3-х місячного віку дебіт гідрохлоридної кислоти шлункової секреції, стимульованої карбахоліном, складав 70,12±11,0 мкмоль/120 хв (n=8) (табл.1).

Не дивлячись на те, що одержані нами результати не завжди співпадають з даними інших авторів, ми ні в

якому разі не ставимо під сумнів результати інших досліджень. Ми вважаємо, що такі розбіжності виникли в результаті того, що наші дослідження охопили всі вікові періоди у щурів. А у випадку зрілого віку ми навіть виділили ранній (12 місяців) і пізній (18 місяців) зрілий вік. І якщо у випадку базальної секреції гідрохлоридної кислоти різниці між раннім і пізнім зрілим віком не було, то за умов стимульованої карбахоліном секреції різниця в дебіті гідрохлоридної кислоти була дуже великою.

У щурів 6-ти, 21-го та 24-х місячного віку дебіт гідрохлоридної кислоти стимульованої карбахоліном шлункової секреції був на 53,2% ($p < 0,05$), 251,4% ($p < 0,01$) та 206,3% ($p < 0,01$) відповідно більшим порівняно зі щурами ювенільного віку (рис.3).

У тварин 12-ти та 24-х місячного віку дебіт кислоти статистично достовірно не відрізнявся від щурів 3-х та 6-ти місячного віку.

Дебіт пепсину базальної шлункової секреції у щурів 3-х місячного віку складав 2,22±0,33 мг/120 хв (n=10) (табл.2).

Таблиця 2. Дебіт пепсину базальної і стимульованої карбахоліном шлункової секреції у щурів різних вікових груп (M±m)

Вік тварин, місяці	Дебіт пепсину базальної шлункової секреції (мг/120 хв)	Дебіт пепсину стимульованої шлункової секреції (мг/120 хв)
3	2,22±0,33 (n=10)	2,74±0,14 (n=10)
6	2,19±0,39 (n=8)	2,82±0,31 (n=8)
12	1,36±0,09** (n=8)	2,64±0,16 (n=8)
18	1,78±0,35* (n=8)	2,45±0,15 (n=7)
21	1,67±0,19* (n=6)	2,01±0,17* (n=6)
24	1,60±0,17* (n=7)	1,99±0,16* (n=7)

Примітка:

* – $p < 0,05$ порівняно зі щурами 3 місячного віку;** – $p < 0,01$ порівняно зі щурами 3 місячного віку;

У віці 6-ти місяців дебіт пепсину базальної секреції у щурів достовірно не зменшився у порівнянні з тваринами 3-х місячного віку і становив 2,19±0,39 мг/120 хв (n=8). Таким чином секреція пепсину залишається на одному рівні, аж до досягнення щурами зрілого віку. У зрілому віці вона зменшується у середньому на 29,3% ($p < 0,05$) і у тварин раннього зрілого віку дебіт пепсину складав 1,36±0,09 мг/120 хв (n=8), у пізньому зрілому віці – 1,78±0,35 (n=8). Між значеннями дебіту пепсину, що виділявся з шлунковим соком, у щурів у віці 12-ти, 18-ти, 21-го та 24-х місяців статистично достовірної різниці не було.

Також нами було встановлено, що у 3-х місячних щурів дебіт пепсину за умов стимулюючої дії карбахоліну становив 2,74±0,14 мг/120 хв (n=10) (табл.2). У тварин 6-ти, 12-ти та 18-ти місячного віку секреція пепсину у шлунковому соці за умов стимулюючого впливу карбахоліну достовірно не змінювалась у порівнянні зі ювенільними щурами. Достовірно зменшення дебіту пепсину стимульованої карбахоліном шлункової секреції по-

рівняно зі щурами ювенільного віку спостерігалось лише у щурів 21-го та 24-х місячного віку відповідно на 26,7% ($p < 0,05$) та 27,4% ($p < 0,05$).

Так як карбахолін, як і медіатор парасимпатичної нервової системи ацетилхолін, взаємодіє з нікотиновими і мускариновими ацетилхоліновими рецепторами, зменшення дебіту пепсину в шлунковому соці, стимульованому карбахоліном, узгоджується з висновком О.В. Коркушка [13] про те, що при старінні знижується вплив парасимпатичного відділу автономної нервової системи на шлунок.

Висновки:

1. У порівнянні з щурами ювенільного віку у щурів всіх інших вікових груп секреція гідрохлоридної кислоти в шлунку була статистично достовірно більшою. Найбільшою вона була у щурів юнацького віку.

2. Дебіт гідрохлоридної кислоти шлункової секреції, стимульованої карбахоліном, у щурів юнацького та пізнього зрілого віку був більшим за даний показник у по-

рівнянні з щурами ювенільного віку. У щурів раннього зрілого та старечого віку дебіт гідрохлоридної кислоти шлункової секреції, стимульованої карбахоліном, був таким же, як і у щурів ювенільного віку.

3. Дебіт пепсину базальної секреції у щурів ювенільного і юнацького віку тримається на одному рівні. При досягненні щурами зрілого віку дебіт пепсину в базальному шлунковому секреті падає і залишається меншим у щурів літнього і старечого віку в порівнянні з щурами ювенільного і юнацького віку.

4. Дебіт пепсину шлункової секреції, стимульованої карбахоліном, залишається на одному рівні у щурів ювенільного, юнацького віку і зрілого віку. Лише у щурів літнього і старечого віку він зменшується.

Список використаних джерел

1. Effect of aging on gastric acid secretion, serum gastrin, and antral gastrin content in rats / T.Khalil [et al.] // Dig Dis Sci. – 1988. – Vol. 33, № 12. – P. 1544-1548.
2. Morphological and biochemical changes in gastric mucosa of aging rats / A.P. Majumdar [et al.] // Dig Dis Sci. – 1990. – Vol. 35. – P. 1364-1370.
3. Maitra R.S. Gastric secretion during aging in pyloric-ligated rats and effects of pentagastrin / R.S.Maitra, E.A.Edgerton, A.P.Majumdar // Exp Gerontol. – 1988. – Vol. 23. – P. 463-472.
4. Morphologic changes in gastric mucosa of aging rats / D.Hollander [et al.] // Dig Dis Sci. – 1989. – Vol. 34. – P. 1692-1700.
5. The Effect of Cochin chinamomordica Seed Extract on Gastric Acid Secretion and Morphological Change in Aged Rat Stomach / H.J.Jo [et al.] // Gut and Liver. – 2013. – Vol. 7, № 5. – P. 560-568.
6. Effects of aging and gastritis on gastric acid and pepsin secretion in humans: a prospective study / M.Feldman [et al.] // Gastroenterology. – 1996. – Vol. 110, № 4. – P. 1043-1052.

7. Gastric acid secretion of normal Japanese subjects in relation to Helicobacter pylori infection, aging, and gender / K. Iijima [et al.] // Scand J Gastroenterol. – 2004. – Vol. 39, № 8. – P. 709-716.

8. Change in function of gastric acid secretion by aging / K. Yakabi [et al.] // Nihon Rinsho. – 2010. – Vol. 68. – № 11. – P. 2001-2005.

9. Effect of age on gastric acid secretion and serum gastrin concentrations in healthy men and women / M. Goldschmidt [et al.] // Gastroenterology. – 1991. – Vol. 101, № 4. – P. 977-990.

10. H⁺/K⁺ ATPase expression in human parietal cells and gastric acid secretion in elderly individuals / W. Zhang [et al.] // J Dig Dis. – 2013. – Vol. 14, № 7. – P. 366-372.

11. Коркушко О.В. Трансформація шлункової секреції при фізіологічному старінні людини (базальна секреція) / О.В. Коркушко, Д.М. Якименко // Сучасна гастроентерол. – 2003. – № 2 (12). – С. 19 – 24.

12. Коркушко О.В. Трансформація шлункової секреції при фізіологічному старінні людини: секреція, стимульована гістаміном та пентагастрином / О.В. Коркушко, Д.М. Якименко // Сучасна гастроентерол. – 2003. – № 3 (13). – С. 34 – 39.

13. Некоторые данные о возрастной клинической физиологии желудка / О.В. Коркушко [и др.] // Сучасна гастроентерол. – 2010. – № 4 (54). – С. 17 – 25.

14. Скочко Н.С. Секреція гідрохлоридної кислоти в шлунку щурів різного віку / Н.С. Скочко, Є.О. Торгалло, Т.В. Берегова // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. – 2012. – № 5 (113). – С. 102-108.

15. Скочко Н.С. Секреторна функція шлунка у щурів різних вікових груп за умов стандартної дієти та дієти з додаванням пробіотика / Н.С. Скочко, Т.В. Берегова, Є.О. Торгалло // Вісник проблем біології і медицини. – 2013. – Вип. 3. – Т. 1 (102). – С. 200-204.

16. Ghosh M.N. Continuous recording of acid gastric secretion in the rat. / N. Ghosh, H.O. Schild // Br. J. Pharmacol. – 1958. – № 13. – P. 54-61.

17. Тин В. П. Метод определения пепсина в желудочном соке с использованием колориметрии / В. П. Тин // Лаб. дело. – 1986. – № 11. – С. 656-657.

Надійшла до редколегії 26.06.14

Н. Скочко, инж. 2-й кат., Е. Торгалло, канд. биол. наук, Т. Береговая, д-р биол. наук КНУ имени Тараса Шевченка, Киев

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СЕКРЕЦИИ ГИДРОХЛОРИДНОЙ КИСЛОТЫ И ПЕПСИНА В ЖЕЛУДКЕ КРЫС

По сравнению с крысами ювенильного возраста у крыс всех других возрастных групп (юношеский, зрелый, пожилой и старческий возраст) секреция гидрохлоридной кислоты (HCl) в желудке была достоверно больше. Наибольшей она была у крыс юношеского возраста. По сравнению с крысами ювенильного возраста дебит HCl желудочной секреции, стимулированной карбахолином, у крыс 6-ти и 18-ти месячного возраста был больше, у крыс раннего зрелого и старческого возраста был таким же. Дебит пепсина базальной секреции у крыс ювенильного и юношеского возраста был одинаковым. При достижении крысами зрелого возраста дебит пепсина в базальном желудочном соке падал и оставался меньше у крыс пожилого и старческого возраста. Дебит пепсина желудочной секреции, стимулированной карбахолином, оставался на одном уровне у крыс ювенильного, юношеского и зрелого возраста. Только у крыс пожилого и старческого возраста он уменьшался.

Ключевые слова: гидрохлоридная кислота, пепсин, старение.

N. Skochko, ing. 2 k., E. Torgalo, PhD., T. Beregova, DSc.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

AGE-RELATED CHANGES IN GASTRIC SECRETION OF HYDROCHLORIC ACID AND PEPSIN IN RATS

Secretion of hydrochloric acid (HCl) in rats' stomach of young, mature, elderly and senile rats was significantly higher compare to juvenile rats. It was the greatest in young rats. Carbacholin stimulated acid output in 6 and 18 month old rats was increased, in earlymatured and senile was the same as in juvenile rats. Basal pepsin output (BPO) of juvenile and young rats was the same. BPO of mature rats decreased and remained lower in elderly, senile compare to juvenile rats. Carbacholin stimulated pepsin output (SPO) didn't differ in juvenile, young and mature rats. Only in senile and elderly rats SPO decreased.

Key words: hydrochloric acid, pepsin, aging.

УДК: 576

В. Бекмухамедова, студ., О. Вороніна, канд. біол. наук, Т. Фалалєва, д-р біол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ДОКЛІНІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ГОСТРОЇ ТОКСИЧНОСТІ ПРЕПАРАТУ "КОКАРНІТ" НА ЩУРАХ

Старіння населення планети, висока ступінь урбанізації, погіршення екологічного становища сприяють збільшенню кількості людей з захворюваннями багатьох систем організму. Кокарніт – препарат, який покращує метаболізм та енергозабезпечення тканин, це комплекс метаболічних речовин та вітамінів. На основі проведеного морфологічного дослідження гострої токсичності препарату "Кокарніт" була виявлена дозозалежна реакція печінки та нирок щурів – зі збільшенням дози наростали патологічні ефекти. Можна сказати, що дози 200, 400, 600 та 800 мг/кг не справляли токсичної дії на тканини печінки та нирок, а доза 1000 мг/кг (яка в 1000 разів перевищує терапевтичну) приводили до незначних дистрофічних змін в печінці та нирках. Отже, відповідно до загальноприйнятої класифікації токсичності, даний препарат можна віднести до групи малотоксичних засобів (IV клас токсичності).

Ключові слова: Кокарніт, гостра токсичність, печінка, нирки, щури.

Вступ. Створення нових лікарських препаратів – закономірний процес, обумовлений пошуком найбільш ефективних засобів для лікування захворювань. В

даний час для корекції порушень все більш широке застосування знаходять препарати – метаболіти. Дія їх заснована на відновленні біохімічних реакцій обміну

© Бекмухамедова В., Вороніна О., Фалалєва Т., 2014

речовин, порушених патологічним процесом. Біоенергетичні властивості метаболічних препаратів і здатність впливати на універсальні ланки в обміні речовин забезпечують їм широкий спектр захисної дії та відновного впливу на метаболічну адаптацію і гомеостаз організму. Одним з представників таких препаратів є Кокарніт (World Medicine).

Кокарніт – кардіонейропротектор, який широко використовується в інших країнах для лікування серцево-судинних (ішемічна хвороба серця, кардіоміопатії, міокардити) та нервових (неврити, нейропатії, невралгії різного походження) захворювань, стимулятор гемопоєзу. Застосування кокарніту призводить до посилення процесів окислення глюкози і підвищення синтезу АТФ в кардіоміоцитах, зменшується утворення вільних радикалів, недоокислених продуктів обміну, нормалізуються трансмембранні іонні потоки, зменшується внутрішньоклітинний ацидоз. Збалансування внутрішньоклітинного гомеостазу сприяє безпосередньому поліпшенню ізотропної функції кардіоміоцитів, і міокарда в цілому. Поліпшення скоротливості, у свою чергу, відіграє певну роль у підтримці артеріального тиску і поліпшенні перфузії органів, у тому числі печінки [1, 2, 3].

Метою роботи було вивчення гострої токсичності препарату Кокарніт на тканини печінки та нирки, як головних елімінуючих органів.

Матеріали та методи. Дослідження були проведені на статевозрілих білих щурах. До часу введення досліджуваної речовини тварини протягом 5 днів проходили акліматизацію в умовах процедурної кімнати. Проводили попереднє індивідуальне мічення інтактних тварин і рандомізований розподіл на 6 груп по 12 щурів.

Препарат розчиняли в 0,5% розчині лідокаїну гідрохлориду, та вводили щурам внутрішньом'язево в дозах 200, 400, 600, 800 та 1000 мг/кг ваги тіла. Дані дози були обрані у зв'язку з тим, що найбільш токсичний компонент Кокарніта – кокарбоксілаза (60 % маси препарату) має $LD_{50} > 500$ мг/кг для щурів (Material Safety Data Sheet, SIGMA – ALDRICH). Таким чином, вказані дози відповідають 120 – 600 мг / кг в перерахунку на кокарбоксілазу. Максимальна доза була розрахована, виходячи з максимальної розчинності препарату в референс-зразку з концентрацією розчину – 150 мг/мл. Спостереження за тваринами проводилося впродовж двох тижнів після введення лікарського засобу. Після 14-денного спостереження за фізіологічними змінами, всі тварини підлягали миттєвій декапітації. Для гістологічного дослідження печінку та нирки фіксували в 10% розчині формаліну; парафінові зрізи фарбували гематоксиліном Бюмера та еозином.

Результати і обговорення. Протягом двох тижнів летальний результат був зафіксований тільки в групі, якій вводили Кокарніт в дозі 1000 мг/кг (8,3% смертності). Таким чином, $LD_{50} > 1000$ мг/кг. У перші два дні спостереження у контрольної групи щурів відзначали слабкість, сонливість, втрату апетиту, незначне зниження температури тіла, анестезію. На четверту добу спостереження всі фізіологічні показники повернулися до норми. Спостереження за щурами дозових груп у перші 4 дні показало зміну типу дихання на черевне або змішане, зниження рухової активності, сонливість, анестезію, вазоконстрикцію, зниження температури тіла, зне-

воднення організму. Під час вивчення щурів, які отримали 800, 1000 мг/кг Кокарніта, також спостерігали зміни кольору сечі на безбарвну.

На 5-14 день після введення тест-зразка ефект препарату на фізіологічні показники щурів був дозозалежним. У щурів, яким вводили 200 мг/кг Кокарніта, вже на 6-7 день спостереження видимих ознак впливу препарату на зовнішній вигляд, рухову активність, серцево-судинну систему зареєстровано не було. У групі щурів, які отримали дозу 400 – 1000 мг/кг Кокарніта, анестезія спостерігалася протягом 7 днів після введення препарату. У групі тварин, яким вводили Кокарніт в дозі 400 мг/кг ознаки впливу препарату на організм зникли на 9 день спостереження. У групі щурів, які отримали дозу 800 мг/кг і 1000 мг/кг Кокарніта, зниження температури тіла, зневоднення організму, зміна типу дихання відзначали протягом перших 8 днів спостереження. З 9-ї доби спостерігалася поступова нормалізація перерахованих показників, що супроводжувалося нормалізацією дихання, сну, поведінкових реакцій.

Визначення маси органів щурів, що померли або були виведені з експерименту через 14 днів після введення препарату, показало дозозалежне збільшення відносної маси печінки і нирок, що свідчить про розвиток набряків у них.

У контрольної групи щурів печінка має типову будову. Структурною одиницею печінки є нечітко виражена печінкова часточка. Гепатоцити утворюють тяжі, що галузяться до центральної вени. Синусоїди містять формені елементи крові. Гепатоцити мають округло – полігональну форму, з округлими ядрами, які мають чітко окреслені ядерець.

При мікроскопічному дослідженні препаратів печінки в дозі препарату 200, 400 мг/кг спостерігались не різко виражене набрякання гепатоцитів, збільшення об'ємів ядер і місцями ущільнення цитоплазми. Міжтрабекулярні простори звужені, кровonosні судини (міждолькові артерії і центральні вени) заповнені кров'ю.

При введенні дози препарату 600, 800 мг/кг гепатоцити дещо зменшені в розмірах, а їх цитоплазма ущільнена, але без ознак дистрофічних змін. При дозі 800 мг/кг судини повнокровні і виражені крововиливи. При дозі препарату 1000мг/кг зменшення об'єму клітин ще більш виражене, міжтрабекулярний простір розширений і кровonosні судин повнокровні. В деяких місцях виражене повнокров'я і мікродеструкція клітин.

Отже, морфологічне дослідження печінки показало, що введення "Кокарніту" в дозах 200, 400 та 600 мг/кг приводить до незначного набряку гепатоцитів, збільшення розмірів ядер, звуження міжтрабекулярних просторів. Кровonosні судини (міждолькові артерії та центральні судини) наповнені кров'ю. При введенні препарату в дозах 800 та 1000 мг/кг в гепатоцити були зменшені в розмірах, міжтрабекулярні простори розширені. При дослідженні дози 1000 мг/кг спостерігалась мікродеструкція клітин та виражене повнокров'я.

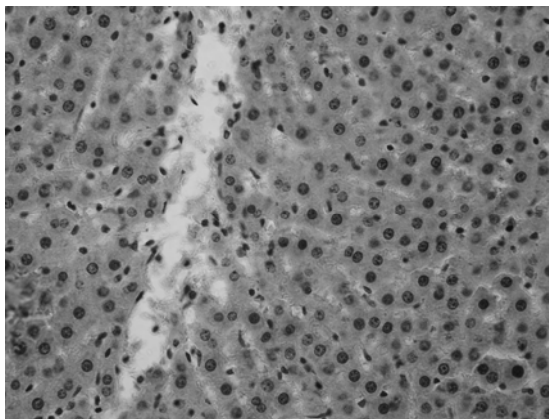


Рис.1. Мікрофотографія зрізу печінки другої групи щурів (Кокарніт в дозі 200 мг/кг). Заб.гем-еоз. Х400

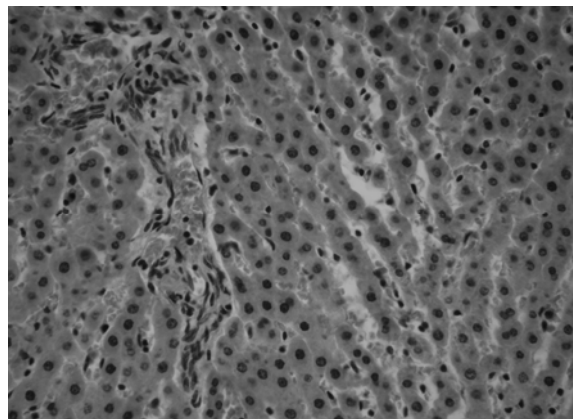


Рис.2. Мікрофотографія зрізу печінки шостої групи щурів (Кокарніт в дозі 1000 мг/кг). Заб.гем-еоз. Х400

У контрольної групи щурів нирки мають загальні морфологічні особливості. Структурно-функціональні одиниці нирки – нефрони – складаються із капсули Шумлянського-Боумана, судинного клубочка, що в ній розміщений, та канальця, різні частини якого виконують різні функції. Судинний клубочок разом з капсулою функціонує як орган ультрафільтрації і утворює гломерулярний апарат нирок. Ниркові канальці утворюють тубулярний апарат нирок.

У нирках контрольних щурів базальні мембрани канальців та капсул Шумлянського-Боумана добре виражені. Капілярні петлі клубочків утворюють сферичну структуру, вільно розташовану у капсулі. Вони мають рівномірне помірне або інтенсивне кровонаповнення. Просвіт між вісцеральним і парієтальним листками капсули Шумлянського-Боумана незначний.

При введенні препарату в дозі 200 мг/кг спостерігалось виражене набрякання епітелію звивистих, а також прямих канальців. В порожнинах канальців зустрічається зернистий вміст. При дозі 400 мг/кг спостерігалось ще більш виражене набрякання епітелію звивистих, а також

прямих канальців. При дозі препарату 600мг/кг об'єм епітеліальних клітин знижувався, ядра ставали гіперхромними, а просвіти канальців збільшувались, але були без вмісту. При дозі препарату 800 мг/кг клітини набрякали. В клубочках збільшувався вміст крові. Просвіти канальців без вмісту. При дозі препарату 1000 мг/кг клітини знов ставали збільшеними в об'ємі, з'являлись лімфоїдні скупчення, клубочки переповнені кров'ю, а в порожнині багатьох канальців визначався хлоп'євидний вміст.

Отже, при гістологічному дослідженні нирок після введення "Кокарніту" в дозах 200, 400 та 600 мг/кг було відмічено набряк епітелію звивистих та прямих канальців. В порожнинах канальців спостерігався зернистий вміст. При введенні дози 800 мг/кг просвіти канальців збільшувались, об'єм епітеліоцитів зменшувався, ядра ставали гіперхромними. При дослідженні дози 1000 мг/кг клітини знов ставали збільшеними в розмірах, з'являлись лімфоїдні скупчення, клубочки були переповнені кров'ю, а в порожнині багатьох канальців виявлявся хлоп'євидний вміст.

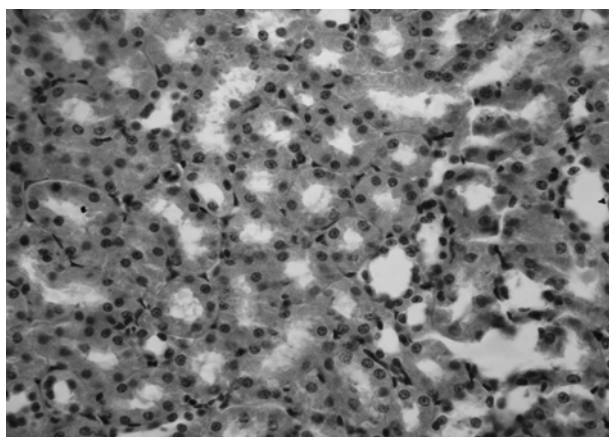


Рис.3. Мікрофотографія зрізу нирки щура другої групи (Кокарніт в дозі 200 мг/кг). Заб.гем-еоз. Х400

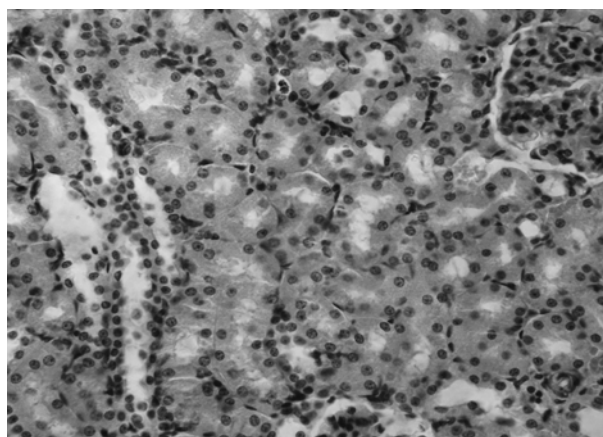


Рис.4. Мікрофотографія зрізу нирки щура шостої групи (Кокарніт в дозі 1000 мг/кг). Заб.гем-еоз. Х400

Таким чином, проведені дослідження гострої токсичності препарату "Кокарніт" дозволяють віднести препарат за сумою діючих речовин відповідно до загальноприйнятої класифікації токсичності до класу малотоксичних речовин (IV клас токсичності).

Висновки:

1. Визначення маси органів щурів показало дозозалежне збільшення відносної маси печінки і нирок, що свідчить про розвиток набряків у них.

2. Морфологічне дослідження печінки показало, що введення "Кокарніту" в дозах 200, 400 та 600 мг/кг при-

водить до незначного набряку гепатоцитів, збільшення розмірів ядер, звуження міжтрабекулярних просторів. Кровоносні судини (міждолькові артерії та центральні судини) наповнені кров'ю. При введенні препарату в дозах 800 та 1000 мг/кг в гепатоцити були зменшені в розмірах, міжтрабекулярні простори розширені. При дослідженні дози 1000 мг/кг спостерігалась мікродеструкція клітин та виражене повнокров'я.

3. При гістологічному дослідженні нирок після введення "Кокарніту" в дозах 200, 400 та 600 мг/кг було відмічено набряк епітелію звивистих та прямих каналь-

ців. В порожнинах каналців спостерігався зернистий вміст. При введенні дози 800 мг/кг просвіти каналців збільшувались, об'єм епітеліоцитів зменшувався, ядра ставали гіперхромними. При дослідженні дози 1000 мг/кг клітини знов ставали збільшеними в розмірах, з'являлись лімфоїдні скупчення, клубочки були переповнені кров'ю, а в порожнині багатьох каналців виявлявся хлоп'євидний вміст.

4. Отримані данні дозволяють віднести даний препарат відповідно до загальноприйнятої класифіка-

ції токсичності до групи малотоксичних засобів (IV клас токсичності).

Список використаних джерел

1. Трисветова Е.Л., Лихачева А.Е. Кокарнит – новый комплекс метаболитических веществ // Мед. новости, 2008. – 10. – С.32-38.
2. Новые лекарственные средства в кардиологии: Кокарнит // Кардиология в Беларуси, 2009. – 2(03). – С.18-19.
3. Абдулаев Т.А., Марданов Б.У., Бекбулатова Р.Ш. Применение кокарнита у больных хронической сердечной недостаточностью в клинической практике / Методические рекомендации. Под ред. Курбанова Р.Д. – Республиканский специализированный центр кардиологии МЗ РУз, 2012. – 21 с.

Надійшла до редколегії 25.06.14

В. Бекмухамедова, асп., Е. Воронина, канд. биол. наук, Т. Фалалеева, д-р биол. наук
КНУ им. Тараса Шевченко, Киев

ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ПРЕПАРАТА "КОКАРНИТ" НА КРЫСАХ

Старение населения планеты, высокая степень урбанизации, ухудшение экологической обстановки способствуют увеличению количества людей с заболеваниями многих систем. Кокарнит – препарат улучшающий метаболизм и энергообеспечение тканей, это комплекс метаболитических веществ и витаминов. На основе проведенного морфологического исследования острой токсичности препарата "Кокарнит" была обнаружена дозозависимая реакция печени и почек крыс – с увеличением дозы нарастали патологические эффекты. Можно сказать, что дозы 200, 400, 600 и 800 мг / кг не оказывали токсического действия на ткани печени и почек, а доза 1000 мг/кг (которая в 1000 раз превышает терапевтическую) приводили к незначительным дистрофическим изменений в печени и почках. Итак, согласно общепринятой классификации токсичности, данный препарат можно отнести к группе малотоксичных средств (IV класс токсичности).

Ключевые слова: Кокарнит, острая токсичность, печень, почки, крысы.

V.Bekmukhamedova, PhD stud., O.Voronina, PhD., T.Falalyeyeva, DSc.
Kyiv National Taras Shevchenko University, Kyiv

PRECLINICAL STUDY OF ACUTE TOXICITY "COKARNIT" IN RATS

The aging population, high urbanization, deteriorating environmental situation help to increase the number of people with diseases of many systems. Cokarnit – a drug that improves energy metabolism and tissue, a complex metabolic substances and vitamins. On the basis of morphological studies of acute toxicity "Cokarnit" was found dose-dependent response of the liver and kidney of rats – with increasing doses grew pathological effects. We can say that doses of 200, 400, 600 and 800 mg/kg shall not have toxic effects on liver and kidney tissue, and the dose of 1000 mg/kg (which is 1000 times greater than therapeutic) resulted in minor degenerative changes in the liver and kidneys. These data can be attributed to the drug according to the standard classification of toxicity to the group of low-toxicity drugs (class IV toxicity).

Keywords: Cokarnit, acute toxicity, liver, kidney, rats.

УДК 578.7

О. Бояльська, асп., А.Бойко, проф.
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ,

І. Киричук, заступник начальника Головного управління Держсанепідслужби України
у Житомирській області,

О. Шпита, начальник Житомирського міськрайонного управління Головного управління Держсанепідслужби України
у Житомирській області

ПОШИРЕННЯ ВІРУСУ ГРИПУ СЕРЕД РІЗНИХ ГРУП НАСЕЛЕННЯ ЖИТОМИРСЬКОЇ ОБЛАСТІ

Проведено порівняння епідемічної ситуації на грип у епідемічних сезонах 2009-2010 рр. та 2010-2011 рр. Показано, що у структурі штамів вірусів грипу виявлених методом ПЛР у реальному часі домінуючим збудником є вірус грипу А (H₁N₁) пандемічний: у епідсезоні 2009-2010 рр. складав 80,48%, а у 2010-2011 рр. 66,13% від загальної кількості виявлених вірусів грипу. Максимально ураженими віковими групами у епідемічних сезонах 2009-2010 рр. та 2010-2011 рр. є: 21 – 30 р. – 17% та 42,7%; 31 – 40 р. – 34,1% та 17%; 41 – 50 р. – 21,9% та 12% відповідно. Також зареєстровано зниження кількості лабораторно підтверджених випадків на наявність вірусу грипу серед тяжких хворих з попереднім клінічним діагнозом пневмонія з 78% (епідемічний сезон 2009-2010 рр.) до 38,7% (епідемічний сезон 2010-2011 рр.).

Ключові слова: віруси грипу А та В, пандемія, епідемічна ситуація, ПЛР у реальному часі, вікові групи.

Вступ. Грип та інші гострі респіраторні інфекції (ГРІ) відносяться до найбільш розповсюджених хвороб людини, які впродовж багатьох років за частотою переважають всі інші інфекційні захворювання, разом узяті. В Україні щорічно на грип та інші ГРЗ хворіють 10–14 млн. осіб, що становить 25–30% усієї та близько 75–90% інфекційної захворюваності у країні [1, 2, 3, 4, 5].

Експерти Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) відмічають, що ця найпоширеніша в людській популяції група захворювань в останні роки має постійну тенденцію до збільшення. Соціальні причини, пов'язані з глобальним процесом постійного зростання урбанізації, більш тісні контакти людей практично в будь-якій точці земної кулі та посилення міжконтинентальних

міграційних процесів сприятимуть подальшому поширенню ГРЗ [3, 4, 5, 6, 7].

На сьогодні грипу відводиться перше місце як проблемі, що не має радикального вирішення, оскільки пов'язана, перш за все, з генетичними ресурсами самого вірусу.

Епідемії грипу, що виникають в Україні майже кожен рік, є частиною глобального епідемічного процесу [2]. Часта активізації епідемічного процесу пов'язана з мінливістю вірусів грипу А та В та появою за останні 10–15 років нових та значно різних варіантів за антигенами – В (Ямагата)16/88 та А (Сідней) 5/97. З іншого боку – одночасна циркуляція у світі з 1977 року двох підтипів вірусу грипу А – А(H₁N₁), А(H₃N₂) [9, 10].

Пандемії виникають тільки раз у 10 – 40 років. Остання пандемія виникла у 2009 року і була викликана вірусом грипу A(H₁N₁) пандемічним вірусом-реасортантом вірусів грипу людини, птахів та свиней, завдяки чому активно поширився серед людей у країнах різних континентів [2].

Отже, віруси грипу і надалі залишаються актуальними збудниками захворювань, і тому метою нашого дослідження було визначення поширення вірусу грипу серед різних груп населення Житомирської області. Основне завдання даної роботи – визначити домінуючий циркулюючий тип вірусу грипу серед обстежених осіб, його поширення серед груп ризику, а саме серед хворих з ускладненнями.

Матеріали та методи досліджень. Матеріалом для дослідження були зразки клінічного матеріалу – проби носоглоткових змивів, мазків із зіву, носоглотки та носу, секційного матеріалу, відібрані у перші 3 доби та не пізніше 5-ї доби хвороби від хворих з підозрою на грип та інші ГРВІ (гострі респіраторні вірусні інфекції). Пацієнти знаходились на лікуванні у дитячих та дорослих інфекційних стаціонарах лікарень Житомирської області. Секційний матеріал від померлих відбирався у обласному патолого-анатомічному бюро та бюро судово-медичної експертизи.

Лабораторна діагностика була проведена методом ПЛР у реальному часі (полімеразна ланцюгова реакція).

Для детекції вірусів грипу типів А та В використовували набори для екстракції (Total RNA Mini Kit Spin Format, Bio-Rad, США) та зворотної транскрипції (iScript cDNA Synthesis Kit, Bio-Rad, США), набори праймерів та зондів відповідних маркерів – Univ inf A, sw A, sw H1, H1, H3, Univ inf B, PHКаза Р (Biosearch, США). Панель реагентів (Biosearch) для визначення вірусів грипу типів А та В методом ПЛР з детекцією у реальному часі складається з праймерів та зондів, що специфічно розрізняють генетичні сигнатури різних патогенних штамів. Ця панель складається з подвійно-міченого BHQ зонду, прямого та зворотнього праймеру для детекції на приладі ПЛР у реальному часі вірусних штамів грипу. Всі зонди мічені FAM і Black hole Quencher (BHQ) барвниками. Всі зонди та праймери очищені методом HPLC.

Для правильної ідентифікації вірусу грипу A(H₁N₁) пандемічного оптимальним є аналіз декількох цільових генів. Найбільш важливими є такі гени-мішені: ген, кодуючий матричний білок вірусу грипу типу А; ген, кодуючий гемаглютинін вірусу грипу A (H₁N₁)swl, та ген, кодуючий гемаглютинін вірусу сезонного грипу A H1/H3, а для ідентифікації вірусу грипу В цільовим є ген мат-

ричного білку (BM2). Зонди, що використовувались мали таку будову:

1. Зонди TaqMan® відмічені на 5'-кінці репортерною групою – 6- карбоксифлуоресцеїну (FAM) та гасителем, Black hole Quencher 1 (BHQ1) (Biosearch Technologies, Inc., Новато, Каліфорнія) на 3'-кінці.

2. Зонди TaqMan® відмічені на 5'-кінці репортерною групою – 6- карбоксифлуоресцеїну (FAM) та гасяться внутрішнє на модифікованому "Т" залишку за допомогою BHQ1, за допомогою модифікованого 3'-кінця для попередження нарощування зонду Taq-полімеразою.

Дослідження проведені за протоколом полімеразної ланцюгової реакції з зворотною транскрипцією у реальному часі для виявлення і дослідження грипу A(H₁N₁) від центру по контролю та профілактиці захворювань (CDC) США (версія 2009) представленою BOO3.

Результати та їх обговорення. З метою моніторингу вірусу грипу серед різних груп населення Житомирської області в період з 2009 року по 2011 рік надійшло 561 проби носоглоткових змивів, мазків із зіву, носу, носоглотки від хворих з тяжким перебігом ГРВІ та проби секційного матеріалу від померлих осіб (215 проб за епідемічний період 2009-2010 рр. та 346 проби за епідемічний період 2010-2011 рр.). Тяжкий перебіг хвороби з більшою вірогідністю несприятливого її закінчення частіше розвивався у хворих з серцево-судинною патологією, цукровим діабетом, з надлишковою (понад 20 %) масою тіла та вагітних жінок, що дозволило віднести хворих таких категорій до груп ризику щодо несприятливих наслідків захворювання на пандемічний грип.

В результаті проведення досліджень методом ПЛР у режимі реального часу (полімеразної ланцюгової реакції) були отримані результати: із 215 протестованих зразків в епідемічному сезоні 2009-2010 рр. у 41 зразка визначено фрагменти нуклеїнових кислот вірусів грипу типу А, що становить 19,07% від загальної кількості обстежених хворих та епідсезоні 2010-2011 рр. досліджено 346 зразків, з них у 124 зразків визначено фрагменти нуклеїнових кислот вірусів грипу типів А та В, які становлять 29,41 %.

Результати проведених досліджень свідчать про широке розповсюдження грипу серед різних груп населення Житомирської області. Максимально ураженими віковими групами у епідемічних сезонах 2009-2010 рр. та 2010-2011 рр. є: особи віком 21 – 30 р. – 17% та 42,7%; особи віком 31 – 40р. – 34,1% та 17,7%; особи віком 41 – 50р. – 21,9% та 12%; особи віком 51 – 60р. – 7,3% та 8%; особи віком 61 – 70р. – 2,4% та 3,2% відповідно, тобто молоді працездатні люди (рис.1).

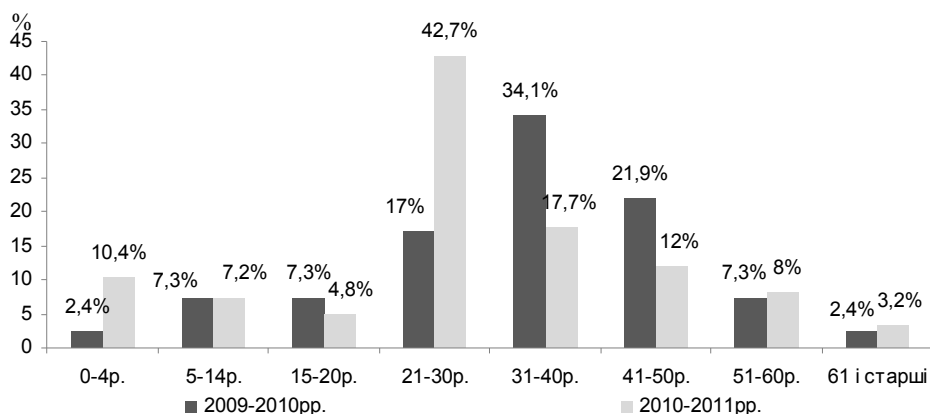


Рис.1. Вікова структура обстежених осіб в Житомирській області, у яких методом ПЛР у р.ч. виявлено вірус грипу

В епідемічному сезоні 2009-2010 рр. в епідемічний процес були залучені переважно особи віком від 21 до 50 років, тобто ті, що народились більш як через 20 років після останньої значної епідемії грипу A(H₁N₁) у 1977 році. Можна припустити, що це було пов'язано з тим, що збудник нового грипу A(H₁N₁) пандемічного за антигенними властивостями сильно відрізнявся від сезонного грипу останніх десятиліть, тому захворювання охопило більшість молодого неімунного покоління. Завдяки вчасним обмежувальним заходам (введення позачергових канікул) було уповільнено поширення вірусу грипу серед дитячого населення. За літературними джерелами під час сезонних епідемій грипу більша частина хворих припадає саме на дитяче населення та людей похилого віку.

В епідемічному сезоні 2010-2011рр. триває залучення в епідемічний процес осіб віком від 21 до 30 років, тобто можливо тих, які ще не перехворіли на грип А у минулому сезоні. Серед цих осіб є також вагітні та люди з хронічними захворюваннями. Ці категорії населення відносяться до груп ризику щодо несприятливих наслідків захворювання на пандемічний грип. Як стверджують джерела ВООЗ, в країнах, що розвиваються, за рахунок низького рівня життя кількість молодих людей з різними хронічними захворюваннями постійно росте. Також збільшився відсоток випадків виявлення вірусу грипу серед дітей віком від 0 до 4 років. На нашу думку, це відбувається тому що в цьому сезоні крім вірусу грипу А також циркулював вірус грипу В, який за даними фахівців уражує переважно дитяче населення.

Аналіз етіологічної структури виявлених вірусів грипу у епідемічному сезоні 2009 – 2010 рр. показав, що у 41 лабораторно підтвердженому випадку на наявність вірусу грипу був виявлений вірус грипу типу А – 41 випадок (100%), в т.ч. вірус грипу А (H₁N₁) пандемічний – 33 випадки (80,48%) та неідентифікований вірус грипу А – 8 випадків (19,51%), а у епідемічному сезоні 2010-2011рр. – вірус грипу А, в т.ч. вірус грипу А (H₁N₁) пандемічний був виявлений у 82 випадках (66,13%) та вірус грипу типу В – у 42 (33,87%). Таким чином, питома вага лабораторно підтверджених випадків грипу A(H₁N₁) пандемічний серед обстежених осіб у порівнянні епідемічних сезонів 2009-2010рр. та 2010-2011 рр. зменшилась – з 80,48% до 66,13% від загальної кількості позитивних. Ці дані говорять, що вірус грипу А залишається

домінуючим серед інших циркулюючих субтипів вірусу грипу на протязі двох епідемічних сезонів, але кількість населення, що перехворіло грипом A(H₁N₁) пандемічний поступово збільшується.

Особливістю постпандемічного сезону 2010-2011 рр. було те, що на його початку серед населення Житомирської області поширювався грип В, а всередині та на завершення сезону – грип А, а саме грип A(H₁N₁) пандемічний.

До вірусологічної лабораторії надходили проби від хворих з попередніми клінічними діагнозами: грип, пневмонія, ГРВІ та інші. Так як пандемічний вірус грипу A(H₁N₁) здатен уражувати нижні відділи дихальних шляхів та викликати специфічну грипозну геморагічну пневмонію, тому в епідемічному сезоні 2009-2010 р.р. найбільша питома вага лабораторно підтверджених випадків на наявність вірусу грипу була серед хворих з попереднім діагнозом пневмонія, у яких був виявлений вірус грипу А, в т.ч. вірус грипу A(H₁N₁) пандемічний. Протягом епідемічного сезону 2009-2010р.р. від пандемічного грипу та його ускладнень померло 12 осіб, що складає 6,97% від загальної кількості обстежених осіб.

А вже у епідемічному сезоні 2010-2011рр. більший відсоток лабораторно підтверджених випадків на наявність вірусу грипу була серед хворих з попереднім діагнозом грип та пневмонія. У них був виявлений вірус грипу А, в т.ч. A(H₁N₁) пандемічний та грипу В. В цьому сезоні зареєстровано 3 летальних випадки, що складає 0,87% від загальної кількості обстежених осіб, тобто кількість померлих від грипу та його ускладнень зменшилась.

Таким чином, кількість позитивних випадків на наявність вірусу грипу серед тяжких хворих з попереднім клінічним діагнозом пневмонія від загальної кількості у порівнянні епідемічних сезонів 2009-2010 рр. з 2010-2011 рр. знизилась з 78% до 38,7% (рис. 2).

Висновки. Можна зробити висновок, що епідемічний сезон 2009-2010 рр. був особливий. В цьому сезоні з'явився новий за антигенними структурами вірус – реасортант, до якого у населення не було імунітету. На жаль кількість населення щепленого проти сезонного грипу була дуже мала, а для профілактики пандемічного грипу вакцина з'явилася занадто пізно. Саме населення вчасно не зверталось за медичною допомогою, що призвело до тяжких ускладнень, які інколи закінчувались летально.

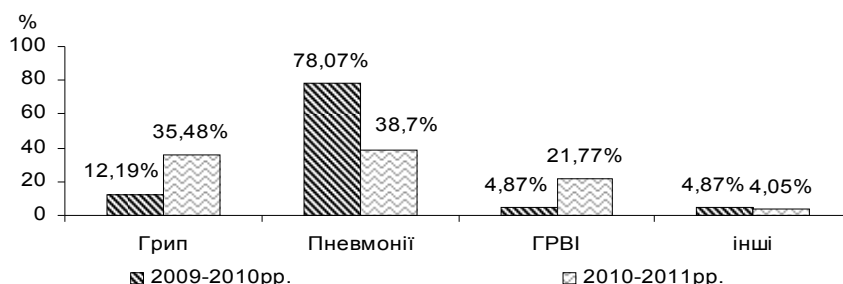


Рис. 2. Виявлення вірусу грипу у обстежених осіб методом ПЛР у реальному часі

В епідемічному сезоні 2010-2011 рр. пандемічний вірус грипу залишився домінуючим серед вірусів грипу, виділених від хворих на грип. Можна зауважити, що кількість перехворілого та вакцинованого населення в цьому сезоні значно збільшилась. Була проведена вчасно лабораторна діагностика, завдяки чому був правильно виставлений діагноз хворим та назначене їм коректне етіотропне лікування. На нашу думку, всі ці дії і призвели до зниження, як кількості тяжких хворих, так і кількості летальних випадків.

Таким чином, не дивлячись на значні досягнення в області вивчення проблем захворювання на грип, ця тема і надалі залишається актуальною. Здійснення вірусологічного моніторингу необхідно для визначення об'єму та своєчасного проведення протиепідемічних та профілактичних заходів. Визначення типу збудника в період епідемічного підйому захворюваності на грип та ГРВІ, своєчасна лабораторна діагностика має вирішальне значення для діагностики природи захворювань,

визначення етіотропної терапії та проведення проти-епідемічних заходів.

Список використаних джерел

1. Порівняльна характеристика сезонних епідемій грипу останнього десятиліття та пандемічного підйому / Доан С.І., Міроненко А.П., Голубка О.С. та ін. // Профілактична медицина. – 2010. – №4(12). – С. 19-23.
2. Дивочка В.А., Боженко А.И., Михальчук В.Н. Биологическое обоснование антипротеиназной терапии гриппа "ART-V". – 2011. – 315 с.
3. Гендон Ю.З. Вакцины и химиопрепараты для профилактики гриппа // Вопросы вирусологии. – 2007. – № 1. – С. 4–10.
4. Европейское руководство ВОЗ по эпиднадзору за гриппом среди людей, 2009 г.
5. Печінка А.М., Дземан М.І. Гострі респіраторні захворювання: питання клінічної діагностики та лікування (лекція) // Український медичний часопис. – 2010. – 5 (79). – IX/X. – С. 94-103.

6. Поздняков С. Розробка протигрипозних засобів: досвід, здобутки, перспективи / С. Поздняков // СЕС профілактична медицина. – 2009. – №5. – С. 24 – 27.
7. Фролов А.Ф., Задорожна В.И. Молекулярная эпидемиология вирусных и прионных инфекций. – К.: ДИА, 2010. – 41-144с.
8. Jackson David, Ruth A. Elderfield and Wendy S. Barclay Molecular studies of influenza B virus in the reverse genetics era // Journal of General Virology. – 2011. – 92. – P. 1–17.
9. Echevarria-Zuno S., Mejia-Arangure J.M., Mar-Obeso A.J. et al. Infection and death from influenza A H1N1 virus in Mexico: a retrospective analysis. Lancet. – 2009. – V. 374. – P. 2072 – 2079.
10. Авдеев С.Н. Тяжелые формы пандемического гриппа A/H1N1 2009 // Пульмонология и аллергология. – 2010. – №4. – С. 2 – 10.

Надійшла до редколегії 12.05.14

О. Бояльская, асп., А. Бойко, проф.
КНУ имени Тараса Шевченка, Киев,
И. Киричук, заместитель начальника Главного управления Госсанэпидслужбы Украины
в Житомирской области,
А. Шпита, начальник Житомирского горрайонного управления Главного управления Госсанэпидслужбы
в Житомирской области

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ВИРУСА ГРИППА СРЕДИ РАЗНЫХ ГРУПП НАСЕЛЕНИЯ ЖИТОМИРСКОЙ ОБЛАСТИ

Проведено сравнение эпидемической ситуации по гриппу в эпидемиологических сезонах 2009-2010 гг. и 2010 – 2011 гг. В структуре штаммов вирусов гриппа, выявленных методом ПЦР в реальном времени, доминирующим возбудителем является вирус гриппа A(H₁N₁) пандемический : в эпидсезоне 2009-2010 гг. составлял 80,48 %, а в 2010-2011 гг. 66,13 % от общего количества выявленных вирусов. Максимальный уровень распространенности гриппа в эпидсезонах 2009-2010 гг. и 2010-2011 гг. выявлен в таких возрастных группах : 21 – 30 р. – 17 % и 42,7 %; 31 – 40 р. – 34,1 % и 17 %; 41 – 50 р. – 21,9 % и 12 % соответственно. Также зарегистрировано снижение количества лабораторно подтвержденных случаев на наличие вируса гриппа среди тяжелых больных с предварительным клиническим диагнозом пневмония.

Ключевые слова: вирусы гриппа А и В, пандемия, эпидемическая ситуация, ПЦР в реальном времени, возрастные группы.

O. Boyalska, PhD stud., A. Boyko, Prof
Taras Shevchenko national university of Kyiv, Kyiv,
I. Kyrychuk, Deputy Chief of Main Department of State Sanitary and Epidemiological Service of Ukraine
in Zhytomyr region,
O. Shpyta, Chief of Zhytomyr city – district management of Main Department
of State Sanitary and Epidemiological Service of Ukraine

THE SPREAD OF INFLUENZA VIRUS AMONG DIFFERENT POPULATIONS OF ZHYTOMYR REGION

The comparison of epidemic situation of influenza epidemic season in 2009-2010 and 2010-2011 was carried out. The structure of strains of influenza viruses detected by PCR in real time dominant pathogen is a virus influenza A (H₁N₁) pandemic: in the 2009-2010 influenza season was 80,48% and in the 2010-2011 influenza season – 66,13% of the total. Maximum age groups affected during the 2009-2010 and 2010-2011 seasons are: 21 – 30 years – 17% and 42,7%; 31 – 40 years – 34,1% and 17%; 41 – 50 years – 21,9% and 12% respectively. Decrease number of laboratory-confirmed cases of the presence of the influenza virus is registered in severe patients with pre-clinical diagnosis pneumonia.

Key words: influenza viruses A and B, pandemic, epidemic situation, real-time PCR, age group.

УДК 611.8.611.9-057.87

О. Добростан, асп., О. Плиска, д-р мед. наук
Національний педагогічний університет імені Михайла Петровича Драгоманова, Київ,
Н. Філімонова, канд. фіз.-мат. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ СТАН ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВОВОЙ СИСТЕМЫ (ЦНС) СТУДЕНТОК З РІЗНИМ ІНДЕКСОМ МАСИ ТІЛА В ДИНАМІЦІ ПЕРШОГО РОКУ НАВЧАННЯ

Значна інтенсифікація навчального процесу, нові емоційні переживання негативно впливають на психофізіологічний стан першокурсників. Організм намагається пристосуватися до нових для нього умов, шляхом зміни рівня функціонування регуляторних механізмів. Адаптація являє собою складний багаторівневий психофізіологічний процес і супроводжується значним напруженням компенсаторно-приспосувальних систем організму студентів. Найбільш чутливими індикаторами адаптації вважається центральна нервова система. Одним з факторів, який зумовлює особливості протікання процесів адаптації у студентів є індекси маси тіла. Були обстежені студентки першого курсу з різним індексом маси тіла. Досліджували за допомогою комп'ютерної експрес-методики основні психофізіологічні параметри. Отримані дані показали, що в динаміці навчального року спостерігаються зміни функціонального стану центральної нервової системи у першокурсниць усіх груп. Зокрема у студенток з надмірною масою тіла певні показники до завершення експерименту покращувалися і це можливо пояснюється тим, що незначне збільшення маси тіла може мати позитивне значення як додатковий метаболічний резерв. В зв'язку з чим постає питання про зміну меж індексу маси тіла.

Ключові слова: студентки, індекс маси тіла, нервова система, адаптація.

Вступ. В умовах сучасного реформування і модернізації системи вищої професійної освіти обґрунтовану тривогу викликає стабільна тенденція до зростання загальної соматичної захворюваності молоді України. Значна інтенсифікація навчального процесу, нові форми і методи навчання, збільшення обсягу самостійної роботи студентів, за рахунок скорочення програми з

навчальних дисциплін, нові емоційні переживання негативно впливають на психофізіологічний стан першокурсників [1,3]. Організм намагається пристосуватися до нових для нього умов, шляхом зміни рівня функціонування регуляторних механізмів. Адаптація є складним багаторівневим психофізіологічним процесом і супроводжується значним напруженням компенсаторно-

приспосувальних систем організму студентів [4]. Найбільш чутливими індикаторами адаптації вважається центральна нервова система (ЦНС). Тому динаміку функціонального стану організму оцінюють за параметрами її змін [12]. Але, за однакових умов не у всіх однаково відбувається процес адаптації. Ряд авторів вважають, що на появу зрушень фізіологічних показників впливає малорухомий спосіб життя, неправильний режим харчування та неякісне харчування [2,3]. Одним з факторів, який зумовлює особливості протікання процесів адаптації у студентів є індекс маси тіла (ІМТ). Наслідками недостатньої маси тіла є надмірне збудження, гіперактивність, нервозність і дратівливість [11]. У дітей та підлітків, страждаючих на ожиріння, спостерігають численні зміни з боку як ендокринної системи так і практично всіх органів та систем [5]. Зміни в роботі ендокринної системи не можуть не позначатися на роботі центральної нервової системи. І все це, імовірно, свідчить про те, що функціональний стан ЦНС у людей з різним ІМТ різний.

Метою роботи: дослідити зміни функціонального стану ЦНС у першокурсниць з різним ІМТ в динаміці першого року навчання.

Об'єкт і методи дослідження. Для досягнення поставленої мети, обстежено 117 студенток 1-го курсу Національного педагогічного університету імені М.П. Драгоманова в стаціонарних умовах протягом року навчання. Обстеження проводили в шість етапів: на початку навчального року – 1-е вимірювання (результати якого були взяті за контроль), друге – проводили в середині першого семестру (кінець жовтня), третє – в кінці першого семестру (середина грудня), четверте – на початку другого семестру (другий тиждень лютого), п'яте – в середині другого навчального семестру (кінець березня), шосте – в кінці навчального року (кінець травня). З метою визначення ІМТ проводили антропометричні вимірювання зросту та визначення маси тіла. Розраховували ІМТ за формулою: $ІМТ = \text{маса тіла (кг)} / \text{ріст}^2 (\text{м})$. На даний час це загальноприйнятий критерій оцінки, який рекомендується для оцінки маси тіла у дітей і дорослих [6].

Функціональний стан ЦНС досліджували за допомогою комп'ютерної експрес-методики оцінки основних психофізіологічних параметрів людини, розробленою Н.Б.Філімоновою, Г.М. Чайченком [13]. За допомогою даної комп'ютерної програми визначали наступні показники: величину латентного періоду (ЛП) сенсомоторних реакцій, швидкість простої сенсомоторної реакції (ПРСР), коефіцієнт сили (КС) нервової системи, функціональний рівень системи (ФРС) та рівень функціональних можливостей (РФМ), функціональну рухливість нервових процесів (ФРНП).

В основі різноманітних методик визначення коефіцієнту сили нервової системи лежить вимірювання величини латентного періоду (ЛП) сенсомоторних реакцій при багаторазовому повторенні подразників, оскільки швидкість цих реакцій (при рівності інших умов) є мірою збудливості ЦНС. Виходячи з методики повторної дії подразника в першому субтесті обстежуваному на екрані комп'ютера послідовно пред'являлося зображення – 100 квадратів, на появу кожного з яких він мусив якомога швидше натиснути на відповідну клавішу. При цьому визначали ШПРСР як середнє значення 100 вимірів ЛП. Середньоквадратичне відхилення СІГМА (мс) обчислювали за формулою:

$$\sigma_{\text{лп}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{100} (\text{лп}_i - \text{шпср})^2}{100}}$$

На основі отриманих даних визначали за методикою В.С.Мерліна [3] КС нервової системи як відношення середніх значень ЛП 20-ти останніх та 20-ти перших реакцій. Крім того, за методикою Т.Д.Лоскутової [7] обчислювали ФРС та РФМ для оцінки функціонального стану ЦНС. Величина ФРС тим більше, чим вище функціональний рівень ЦНС, так як чим вищий тонус ЦНС, тим легше організовується функціональна система, яка реалізує дану реакцію.

Наступний субтест проводили за методикою А.Е.Хільченка [13]. Показником рухливості нервових процесів за А.Е.Хільченком є гранично швидкий темп пред'явлення подразників, при якому обстежуваний може правильно диференціювати їх, припускаючи не більше 5% помилок на серію із 100 подразників. Методика Хільченка А.Е. потребує диференціації подразників в сенсорній, а реакцій – в руховій сфері: на один подразник обстежуваний має натискати кнопку правою рукою, на інший – лівою. Причому пальці рук вже знаходяться на кнопках, що виключає їх пошук, наявність в програмі як позитивних, так і гальмівних подразників, дає можливість оцінити здатність піддослідного не лише до швидкого перемикання з однієї позитивної реакції на іншу, але і до негайного переходу від гальмування до збудження, і навпаки. Для цього на моніторі комп'ютера обстежуваному пред'являли у випадковій послідовності 3 види зображень – коло, квадрат та трикутник. При появі квадрата на екрані потрібно було якомога швидше натискати відповідну клавішу правою рукою, трикутника – лівою, кола – нічого не натискати. Подразники починають подаватись з інтервалом в 500 мс. Кожна правильна реакція зменшує час пред'явлення зображення на 10 мс, а помилкова – збільшує. Перші 30 подразників даються на адаптацію. Програма зупиняється, коли кількість помилок в останніх 10 реакціях досягає 50%. Значення ЛП останніх 10 реакцій відкидаються, а показник ФРНП визначається як середнє значення передостанніх 10 ЛП. Статистичний аналіз даних проводився за допомогою пакету STATISTICA 8.0 (StatSoft, USA, 2001). Критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез приймався рівним $p=0,05$. Нормальність розподілів змінних перевірялась тестом Шапіро-Вілка. Оскільки розподіл практично всіх параметрів був відмінний від нормального ($p<0,05$), для порівняння двох залежних вибірок було застосовано критерій Вілксона, для опису вибіркового розподілу вказували медіану (M_e) і нижній (25%) та верхній (75%) квартилі: M_e [25%; 75%].

Результати та їх обговорення. Відповідно до ІМТ першокурсниць поділили на три групи: контрольна (КГ) – з нормальною масою тіла (ІМТ від 19 до 24,5) $n=54$, група НаМ – з надмірною масою тіла (ІМТ від 25 до 29,9) $n=32$ і група НеМ – з недостатньою масою тіла (ІМТ від 16,5 до 18,5) $n=31$. Досліджені нами психофізіологічні параметри, як інтегративні критерії адаптаційних можливостей ЦНС, можливо розглядати як такі, що відображають ступінь пристосування організму до оточуючого середовища.

Для виявлення змін функціонального стану ЦНС, дані отримані під час першого дослідження у вересні, вважали вихідними або "контрольними". Надалі здійснили порівняльний аналіз з даними отриманими під час другого, третього і наступних досліджень. Після проведення досліджень було проаналізовано динаміку змін психофізіологічних показників у першокурсниць різних груп протягом навчального року. В таблиці № 1, наведені показники функціонального стану першокурсниць КГ протягом навчального року.

Таблиця 1. Показники функціонального стану першокурсниць КГ протягом навчального року

Етапи досл.	Перший етап	Другий етап	Третій етап	Четвертий етап	П'ятий етап	Шостий етап
показник	M_e [25%; 75%]	M_e [25%; 5%]	M_e [25%; 75%]	M_e [25%; 75%]	M_e [25%; 75%]	M_e [25%; 75%]
КС	1,01[0,87;1,16]	1,01[0,86;1,12]	0,96[0,86;1,10]	1[0,89;1,1]	1,04[0,87;1,11]	0,97[0,88;1,12]
ФРС, сек ⁻²	4,24[4,02;5,4]	4,33[4,06;5,43]	4,17[3,66;5,43]	4,13[3,93;5,43]	4,12[3,73;5,38]	4,1[3,6;4,38]**
РФМ, сек ⁻²	3,55[2,9;4,6]	3,40[2,94;4,77]	3,45[2,22;4,64]	3,37[2,71;4,73]	3,29[2,68;4,6]	3,16[2,24;3,6]***
ПРС, мс	273[249,6;315,4]	277[246,6;313,2]	280[249,7;321,9]	287[262;323,6]	290[266;338,5]***	290,3[268;340]***
Сигм ЛП, мс	114,7[80,9;138,4]	119,8[86;157,7]	121[84,5;180,9]	122,5[85;189,8]*	133[93,8;209]***	129[75,5;201,6]**
ФРНП, мс	554[470;702]	562[476;744]	558[450;630]**	526[466;606]	560[454;614]	554[450;614]

* – $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,05$

В таблиці № 2, представлені показники функціонального стану першокурсниць НаМ протягом навчального року.

Таблиця 2. Показники функціонального стану першокурсниць НаМ протягом навчального року

Етапи досл.	Перший етап	Другий етап	Третій етап	Четвертий етап	П'ятий етап	Шостий етап
показник	M_e [25%; 75%]	M_e [25%; 5%]	M_e [25%; 75%]	M_e [25%; 75%]	M_e [25%; 75%]	M_e [25%; 75%]
КС	0,95[0,8;1,05]	0,94[0,83;1,1]	0,98[0,81;1,13]	0,98[0,89;1,18]	0,98[0,8;1,17]	1,03[0,87;1,16]
ФРС, сек ⁻²	4,6[4,07;5,4]	4,78[3,6;5,4]	4,15[3,87;5,4]	4,2[3,6;5,4]	4,2[3,67;5,38]	5,16[4,1;5,4]
РФМ, сек ⁻²	3,6[3,04;4,69]	3,78[2,1;4,79]	3,2[2,48;4,56]	3,38[2,17;4,9]	3,2[2,5;4,6]***	4,25[3,17;4,75]
ПРС, мс	265,7[235;303]	272[247,6;331]**	293,6[248,9;334]***	301[250;332]***	291[263;317]***	285,7[239;329,7]
Сигм ЛП, мс	102,4[76;131,6]	113,28[89;161]***	137[77,9;215,9]***	137[102,9;189,6]**	140,57[94;190]**	124[86;198]***
ФРНП, мс	610[468;888]	530[462;734]	578[516;724]	518[446;564]***	492[426;568]**	500[396;634]**

* – $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,05$

В таблиці № 3, представлені показники функціонального стану першокурсниць НеМ протягом навчального року.

Таблиця 3. Показники функціонального стану першокурсниць НеМ протягом навчального року

Етапи досл.	Перший етап	Другий етап	Третій етап	Четвертий етап	П'ятий етап	Шостий етап
показник	M_e [25%; 75%]	M_e [25%; 5%]	M_e [25%; 75%]	M_e [25%; 75%]	M_e [25%; 75%]	M_e [25%; 75%]
КС	1,03[0,89;1,14]	0,87[0,84;1,06]**	0,98[0,81;1,16]	0,95[0,84;1,1]	1[0,88;1,15]	0,93[0,83;1,12]
ФРС, сек ⁻²	4,3[4,05;5,4]	4,37[3,89;5,4]	4,35[4,1;5,4]	4,1[3,8;5,4]	4,3[4,02;5,38]	4,1[3,85;5,4]
РФМ, сек ⁻²	3,3[2,96;4,8]	3,5[2,6;4,7]	3,38[3,1;4,7]	3,16[2,87;4,7]	3,18[2,85;4,5]	3,28[2,58;4,54]
ПРС, мс	268[233;301]	273[223,8;302]	279 [243,6;305]	278,9[253;336]***	298,6[235,9;347,6]***	299,5[265;359]**
Сигм ЛП, мс	82,2[70,5;128]	94,8[63,6;161]	122,5[85,8;169]*	123[85,8;167,9]*	133,9[88;220,8]*	148[94;248,6]**
ФРНП, мс	586[446;886]	546[490;710]	494[454;562]***	550[442;642]	470[390;630]	514[446;586]

* – $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,05$

Виявили в різних групах різну динаміку змін функціонального стану ЦНС протягом першого року навчання.

На початку навчального року у КГ було виявлено наступні показники сили нервової системи: КС=1,01[0,87; 1,16], у НаМ – КС=0,95[0,83; 1,05], в НеМ – КС=1,03[0,89; 1,14]. При цьому КС залишились значущо незмінним на всіх етапах дослідження в КГ і НаМ. У той же час в НеМ на другому етапі дослідження виявили значуще зниження КС з подальшою стабілізацією. Сила нервової системи, є показником стійкості до психофізіологічних навантажень [10]. На основі цього можна сказати про те, що студентки КГ і НаМ можуть краще витримувати довготривалі і великі навантаження ніж першокурсниця НеМ. Відомо, що чим вищий функціональний рівень ЦНС, тим величина ФРС більша [7]. При першому дослідженні виявили, що у КГ ФРС=4,24[4,02;5,43] сек⁻², першокурсниця з надмірною масою тіла мають ФРС=4,62[4,07;5,43] сек⁻², у НеМ ФРС=4,32[4,05;5,43] сек⁻². В динаміці дослідження у КГ спостерігали стабільні значення ФРС, значуще зниження величини ФРС, виявили на шостому етапі дослідження. У НеМ і НаМ – значущих змін не виявили. При порівнянні ФРС між першокурсницями КГ і НаМ під час останнього дослідження встановили, що студентки з надмірною масою тіла мають значуще краший ФРС ($p \leq 0,01$). Це може вказувати на те, що першокурсниця з надмірною масою тіла відчувають менші труднощі в організації необхідної функціональної системи для виконання певного завдання ніж представниці КГ. У тісній взаємозалежності з ФРС знаходиться показник РФМ.

На першому етапі дослідження у КГ РФМ=3,55[2,9;4,6] сек⁻², в НаМ на початку навчального року РФМ=3,62[3,04;4,69] сек⁻², у НеМ РФМ=3,3[2,96;4,78] сек⁻². На п'ятому етапі в НаМ, а на шостому в КГ зафіксували значуще зниження РФМ. При порівнянні РФМ в усіх групах на шостому етапі дослідження, значущі відмінності ($p \leq 0,01$) зафіксували між НаМ і КГ і встановили, що у студенток з надмірною масою тіла РФМ краший. Це в свою чергу може свідчити про те, що представниці КГ мають більші можливості формування функціональної системи, адекватної завданню, і більшу здатність достатньо довго її утримувати. При першому вимірюванні у першокурсниць контрольної групи ПРС=273,26 [249,65;315,39] мс, у НаМ ПРС=273,26 [249,65;315,39] мс, в студенток з недостатньою масою тіла ПРС=268,17 [233,17;301,13] мс. В динаміці навчального року в усіх груп швидкість ПРС зменшувалась: виявили значуще зниження швидкості ПРС вже на другому етапі в першокурсниць НаМ, на четвертому етапі в студенток НеМ, при п'ятому дослідженні в КГ. Час простої сенсомоторної реакції є інтегральним показником швидкості проведення збудження, по різних ланках рефлекторної дуги, і такий шлях проведення збудження дозволяє розглядати час простої сенсомоторної реакції в якості критерію збудливості центральної нервової системи [8]. Аналіз отриманих даних показав, що збудливість нервової системи протягом дослідження значуще зменшувалася, що в свою чергу говорить про настання втоми. Середньоквадратичне відхилення на початку навчального року становило у КГ $\sigma_{\text{лп}}=122,53$ [85,45;189,83] мс, в

НаМ $\sigma_{\text{лп}}=102,35$ [76,20;131,58] мс, в НеМ $\sigma_{\text{лп}}=82,24$ [70,45;128,28] мс. Уже на другому етапі дослідження у НаМ встановили значуще зростання значення середньоквадратичного відхилення, на третьому – фіксували таку тенденцію і у НеМ. У КГ встановили значуще зростання значення середньоквадратичного відхилення на 4 етапі. Зростання значення показника тривало до кінця навчального року. Тож виявлено, що в динаміці навчального року значення середньоквадратичного відхилення зростало, що свідчило про підвищення варіабельності ПСР, що в свою чергу узгоджується з даними за ФРС.

В розумінні М.В. Макаренка ФРНП характеризується здатністю вищих відділів ЦНС забезпечувати максимально можливий для даного індивідуума рівень швидкості з виконання розумового навантаження з безпомилкового диференціювання позитивних та гальмівних сигналів, які слідує один за другим, і отже, вимагають як екстреного переключення дій, так і часті зміни в часі збудливого процесу гальмівним і навпаки. [8] Показник даної властивості, за уявленнями Макаренка М.В., відображає комплексну реакцію нервової системи і це дозволяє використовувати ФРНП як показник адаптації до нового середовища [8]. На початку навчального року ФРНП мав такі значення у КГ ФРНП=554,26 [470;702] мс, в НаМ ФРНП=610 [468;888] мс, в НеМ ФРНП=586,26 [446;886] мс. На третьому етапі дослідження у КГ встановили значуще погіршення ФРНП з наступною стабілізацією, у НеМ спостерігали значуще покращення ФРНП лише на третьому етапі дослідження, а на наступних етапах покращення не виявили. При порівнянні ФРНП КГ і НеМ отриманих на третьому етапі дослідження, виявили що ФРНП у першокурсниць з нормальною масою тіла значуще ($p \leq 0,01$) гірший ніж у першокурсниць з недостатньою масою тіла. У першокурсниць з надмірною масою тіла функціональна рухливість нервових процесів протягом періоду досліджень покращувалася. Значущі зміни фіксували на четвертому етапі з подальшою стабілізацією, що може свідчити про їх кращу здатність адаптуватися до нових умов в порівнянні з КГ і НеМ.

На основі отриманих даних можна говорити про те, що при певних обставинах незначне збільшення маси тіла (в тому числі і при інфекційних захворюваннях, в ослаблених післяопераційних хворих) може мати позитивне значення як додатковий метаболічний резерв. Подібні припущення з'явилися і в сучасній науковій літературі [15,16]. Враховуючи той факт, що на сучасному етапі більшість продуктів масового вживання містять надмірну кількість гормонів, антибіотиків та інших біологічно активних добавок, то зрозуміло, що вживання таких продуктів не може не відобразитися на здоров'ї людини. Безумовно, це також впливає і на загальну масу тіла. Тому маса тіла більшості населення розвинутих країн світу, що вживають ці продукти підвищена. Відпо-

відно змінюється індекс маси тіла. В зв'язку з чим постає питання про зміну меж даного показника.

Висновки:

Аналіз результатів показав: в динаміці навчального року спостерігаються зміни показників функціонального стану ЦНС у першокурсниць усіх груп. Зокрема у студенток з надмірною масою тіла ФРС, РФМ, ФРНП до завершення експерименту покращувалися і це, можливо, пояснюється тим, що незначне збільшення маси тіла може мати позитивне значення як додатковий метаболічний резерв. В зв'язку з чим постає питання про зміну меж індексу маси тіла.

Список використаних джерел

1. Агаджанян Н.А. Изучение образа жизни, состояния здоровья и успеваемости студентов при интенсификации образовательного процесса / Н.А. Агаджанян, Т.Ш. Миннибаев, А.Е. Северин // Гигиена и санитария. – 2005. – №3. – С.48-52.
2. Агаджанян Н.А. Проблемы адаптации и учение о здоровье / Н.А. Агаджанян, Р.М. Баевский, А.П. Берсенева. – М.: РУДН, 2006. – 283 с.
3. Апанасенко Г.Л. Охрана здоровья здоровых. Некоторые проблемы теории и практики / Валеология. Диагностика, средства и практика обеспечения здоровья. – СПб.: Наука, 1993. – Вып. 1. – С. 49-60.
4. Артеменков А.А. Изменение вегетативных функций у студентов при адаптации к умственным нагрузкам / А.А. Артеменков // Гигиена и санитария. – 2007. – №2. – С.62-69.
5. Большова О.В. Ожиріння в дитячому та підлітковому віці. / О.В. Большова // Здоров'я України. – 2008. – № 18/1. – С.50-53.
6. Гірина О.М. Поширеність ожиріння як чинник ризику соматичної патології серед підлітків / О.М. Гірина, А.В. Громович // Практикуючий лікар. – 2012. – № 2. – С.32-35.
7. Лоскутова Т.Д. Оценка функционального состояния центральной нервной системы человека по параметрам простой двигательной реакции / Т.Д. Лоскутова // Физиол. журн. СССР. – 1975, т. LXI. – №1. – С.3-11.
8. Макаренко М.В. Основи професійного відбору військових спеціалістів та методики вивчення індивідуальних психофізіологічних відмінностей між людьми: [посіб.] / М.В. Макаренко. – Київ: Черкаський ЦНТЕІ, 2006. – 395 с.
9. Макачук М.Ю. Пропорція золотого перетину в здійсненні сенсомоторної реакції та реакції вибору як психофізіологічна характеристика здатності до обробки інформації в ЦНС людини / М.Ю. Макачук, Н.Б. Філімонова // Фізика живого – 2003. – Т.11. – № 2 – С.5-13.
10. Мурик С.Э. Типология И.П. Павлова и перспективы её развития / С.Э. Мурик // Интеллектуальные и материальные ресурсы Сибири. Сборник научных трудов. Иркутск, 2003. – С.141-152.
11. Сюбен Д. Гарлоу Менструація і менструальні розлади / Сюбен Д. Гарлоу // Новости медицины и фармации: Акушерство, гинекология, репродуктология. – 2009. – № 296.
12. Спицин А.П. Оценка адаптации студентов младших курсов к учебной деятельности / А.П. Спицин // Гигиена и санитария. – 2007. – №4. – С.54-55.
13. Філімонова Н.Б. Комп'ютерна експрес-методика для визначення психофізіологічного стану людини / Н.Б. Філімонова // В кн.: Матеріали II Міжнародної наук.-метод. конф. "Культура здоров'я як предмет освіти". Херсонський держ. пед. ун-т., 2000 р. – с.204-209.
14. Філімонова Н.Б. Особливості обробки зорової вербальної та невербальної інформації в оперативній пам'яті людини / Н.Б. Філімонова, Т.В. Куценко, М.Ю. Макачук // Фізика живого – 2006 – Т.14. – № 3. – С. 75 – 86.
15. Flegal K. Association of allcause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: A systematic review and meta-analysis / K.Flegal, B. Kit, H. Orpana, B. Graubard // JAMA – 2013 – Т. 309. – С.71-82.
16. Heymsfield S. Does body mass index adequately convey a patients mortality risk? / S.Heymsfield, W.Cefalu // JAMA – 2013 – Т. 309. – С.87-88.

Надійшла до редколегії 15.04.14

О. Добрян, асп., А. Плиск, д-р мед. наук

Национальный педагогический университет имени Михаила Петровича Драгоманова, Киев,

Н. Филимонова, канд. физ.-мат. наук

КНУ имени Тараса Шевченко, Киев

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ (ЦНС) СТУДЕНТОК С РАЗНЫМ ИНДЕКСОМ МАСЫ ТЕЛА В ДИНАМИКЕ ПЕРВОГО ГОДА ОБУЧЕНИЯ

Значительная интенсификация учебного процесса, новые эмоциональные переживания негативно влияют на психофизиологическое состояние первокурсников. Организм пытается приспособиться к новым для него условиям, путем изменения уровня функционирования регуляторных механизмов. Адаптация представляет собой сложный многоуровневый психофизиологический процесс и сопровождается значительным напряжением компенсаторно – приспособительных систем организма студентов. Наиболее чувствительными индикаторами адаптации считается центральная нервная системы. Одним из факторов, который предопределяет особенности протекания процессов адаптации у студентов есть индексы массы тела. Были обследованы студентки первого курса с разным индексом массы тела. Исследовали с помощью компьютерной экспрес – методики оценки основные психофизиологические параметры. Полученные данные свидетельствуют о том, что в динамике учебного года наблюдаются изменения функционального состояния центральной нервной системы у первокурсниц всех групп. В частности у студенток с избыточной массой тела опреде-

ленные показатели к концу эксперимента улучшались и это возможно объясняется тем, что незначительное увеличение массы тела может иметь положительное значение как дополнительный метаболический резерв. В связи с чем возникает вопрос об изменении границ индекса массы тела.

Ключевые слова: студентки, индекс массы тела, нервная система, адаптация.

O. Dobrostan, PhD stud, A. Pluska, doc.med.s.

National Pedagogical University named after Mikhail Petrovich Drahomanova Department of anatomy, physiology and school hygiene, Kyiv, Ukraine,

N. Filimonova, PhD phys.-math.s

Kyiv National Shevchenko University, Kyiv

THE FEATURES OF THE NERVOUS SYSTEM OF THE FIRST YEAR FEMALE STUDENTS (FRESHMEN) WITH WITH DIFFERENT BODY MASS INDEX

Intensification of the learning process, new emotional experiences negatively affect the psychophysiological state freshmen. The body tries to adapt to the new conditions for it by changing the level of functioning regulatory mechanisms. Adaptation is a complex multi-level process and psychophysiological stress is accompanied by significant compensatory-adaptive systems of the body of students. The most sensitive indicators of adaptation is considered a central nervous system. One of the factors that determines the peculiarities of adaptation processes in students is body mass index. Were surveyed first-year students with different body mass index. Studied using computer techniques express the basic physiological parameters. The data showed that the dynamics of the school year there are changes in the functional state of the central nervous system in the freshman class of all groups. Specifically, students are overweight certain values before the end of the experiment and the upside of this is possible because the slight increase in body weight can have a positive impact as an additional metabolic reserve. In this connection the question arises to change the boundaries of the body mass index.

Keywords: student, body mass index, nervous system adaptation.

УДК: 576.3.3144: 616.36002:615.2.244

Д. Франкевич, асп., Д. Гребіник, канд. біол. наук,

О. Матишевська, д-р біол. наук

КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ДОКСОРУБІЦИН – МОДУЛЯТОР ПРОДУКУВАННЯ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ ТА РІВНЯ ЦИТОЗОЛЬНОГО Ca^{2+} У НОРМАЛЬНИХ І ЛЕЙКЕМІЧНИХ КЛІТИНАХ

З використанням специфічних флуоресцентних зондів оцінено продукування активних форм кисню та концентрацію цитозольного кальцію у клітинах. Виявлено позаядерні ефекти ДНК-ушкоджуючого протипухлинного препарату доксорубіцину – тривале посилення продукування АФК та підвищення концентрації Ca^{2+} , як прояви цитотоксичної дії препарату не лише у лейкемічних (лінія L1210 лімфоїдна лейкемія миші), а й у нормальних (ізолювані тимоцити щура) лімфоїдних клітинах.

Ключові слова: активні форми кисню, цитозольний Ca^{2+} , доксорубіцин, клітини L1210, тимоцити.

Вступ. Одним з основних хімотерапевтичних протипухлинних препаратів на сьогодні є доксорубіцин (Докс) – вторинний метаболіт *Streptomyces peucetius*, антибіотик антрациклінового ряду, що проявляє мутагенну, антимітотичну та антипроліферативну дію. Доксорубіцин використовується для лікування лейкемії, лімфому, гемобластозів, але характеризується високим рівнем токсичності у нормальних тканинах [10].

Механізм протипухлинної дії доксорубіцину полягає в його здатності інтеркалювати в ДНК та блокувати синтез нуклеїнових кислот. Окрім того, ця сполука здатна впливати на структурно-функціональний стан мембран, транспорт іонів, продукування вільних радикалів, функціонування дихального ланцюга мітохондрій. У зв'язку з цим актуальним є дослідження позаядерних ефектів препарату у нормальних і трансформованих клітинах.

Підтримання клітиною прооксидантно-антиоксидантного балансу та відновлювального потенціалу є важливою умовою клітинного гомеостазу, а модифікація цих показників внаслідок продукування активних форм кисню (АФК) – одним з механізмів контролювання таких процесів, як проліферація, затримка росту та клітинна загибель. Універсальним внутрішньоклітинним месенджером, який також бере участь в активації та регуляції широкого спектру клітинних процесів є Ca^{2+} . Підвищення концентрації вільного іонізованого цитозольного кальцію ($[Ca^{2+}]_i$) у клітинах внаслідок входу катіона через плазматичну мембрану або вивільнення з ендоплазматичного ретикулула чи мітохондрій призводить до виникнення кальцієвих сигналів. Такі сигнали, у поєднанні з іншими регуляторними каскадами, контролюють експресію генів, проліферацію, та диференціацію клітин.

Метою роботи було оцінити продукування активних форм кисню та рівень вільного цитозольного Ca^{2+} у нормальних клітинах (тимоцити щура) та клітинах лінії L1210 (лімфоїдна лейкемія миші) за дії доксорубіцину.

Матеріали та методи. Тимоцити було ізолювано з тимусу щурів лінії Вістар вагою 150-180 г. Тимус вилучали (200 – 300 мг), відділяли його від сполучної тканини та кровоносних судин і перетирали через нейлоновий фільтр у буфер А такого складу (мМ): Na_2HPO_4 – 3, KCl – 5, NaCl – 120, $CaCl_2$ – 1, глюкоза – 10, $MgSO_4$ – 1, $NaHCO_3$ – 4, HEPES – 10, pH 7,4. Клітинну суспензію центрифугували (1500 g, 5 хв) у тому ж середовищі, осад ресуспендували до концентрації $2.5 \cdot 10^8$ кл/мл. Клітини лінії L1210 були отримані з банку клітинних ліній Інституту експериментальної патології, онкології та радіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Вміст активних форм кисню визначали за допомогою флуоресцентного зонда 2,7-дихлордигідрофлуоресцеїну діацетату (Sigma, США), який вносили в середовище інкубації клітин до кінцевої концентрації 5 мкМ у пробі. Інтенсивність флуоресценції зонда оцінювали в реальному часі на спектрофлуориметрі Shimadzu 150 RF (Японія), довжина хвилі збудження – 480 нм, випромінювання – 520 нм [12]. Концентрацію вільного цитозольного Ca^{2+} вимірювали за допомогою зонду Індо-1 (Sigma США). Клітини навантажували Індо-1 протягом 40 хв, відмивали від надлишку зонду, ресуспендували у буфері А. Інкубацію навантажених зондом клітин проводили при 25^o С. Спектр флуоресценції Індо-1 реєстрували на спектрофотометрі Shimadzu RF-1501 (Японія), довжина хвилі збудження – 350 нм, випромінювання – 410 та 495 нм. Концентрацію Ca^{2+} у цитозолі клітин ($[Ca^{2+}]_i$)

розраховували з використанням двохвильового флуоресцентного параметра, як описано в [5].

Концентрація Докс у пробах становила 1 мкг/мл, що відповідає значенню IC_{50} – концентрації препарату, за якої життєздатність лімфоїдних клітин знижується на 50%.

Обробку даних та побудову графіків проводили на IBM PC з використанням спеціалізованих прикладних програм Excel ("Microsoft") та Origin("Microcal").

Результати та обговорення. Активні форми кисню відіграють важливу роль у клітинному сигналіngu та підтриманні гомеостазу клітини. Однак, надмірне продукування АФК у відповідь на стресові чинники (вплив токсичних речовин, радіаційне пошкодження, хвороби різноманітного походження) може призвести до розвитку окисного стресу, наслідком чого є ушкодження ДНК, окиснення ліпідів та білків, а також модуляція сигналіngu кіназ [3]. Тому першим завданням було провести порівняльне дослідження впливу доксорубіцину на продукування АФК нормальними та лейкоїдними клітинами.

Чутливим і специфічним способом оцінки продукування АФК у клітинах вважається метод із застосування флуоресцентного зонду $2', 7'$ -дихлорфлуоресцеїна діацетата (DCF-DA). Цей зонд здатен проникати через плазматичну мембрану клітини, деацильоватися за участі внутрішньоклітинних естераз з утворенням не-

флуоресцентної форми DCFH, що за дії внутрішньоклітинних активних форм кисню окиснюється до флуоресцентної форми DCF [9].

Характер зміни інтенсивності флуоресценції зонда у разі його внесення до клітинної суспензії відбиває динаміку його входження всередину клітин та дозволяє оцінити динаміку ендogenous утворення АФК у клітинах. Внесення доксорубіцину до середовища інкубації клітин L1210 призводило до поступового посилення продукування АФК впродовж 50 хв порівняно з контролем (Рис.1, А). Вміст АФК, утворених за дії Докс у клітинах L1210, виходив на плато вже через 30 хв, а час, необхідний для досягнення напівмаксимального рівня продукування АФК ($t_{0.5}$) становив 18 ± 3 хв (Рис.1, А).

Значне посилення продукування АФК за дії Докс виявлено нами не лише у лейкоїдних клітинах, але і у нормальних клітинах лімфоїдного походження – тимоцитах. Хоча процес утворення АФК у тимоцитах за дії Докс є повільнішим ($t_{0.5} = 34 \pm 6$ хв), максимальний рівень накопиченого продукту був вищим (Рис.1,Б), ніж у клітинах L1210.

Такі відмінності у динаміці продукування АФК можуть бути пов'язані зокрема з тим, що активність антиоксидантних ензимів у клітинах L1210 перевищує таку у тимоцитах [6].

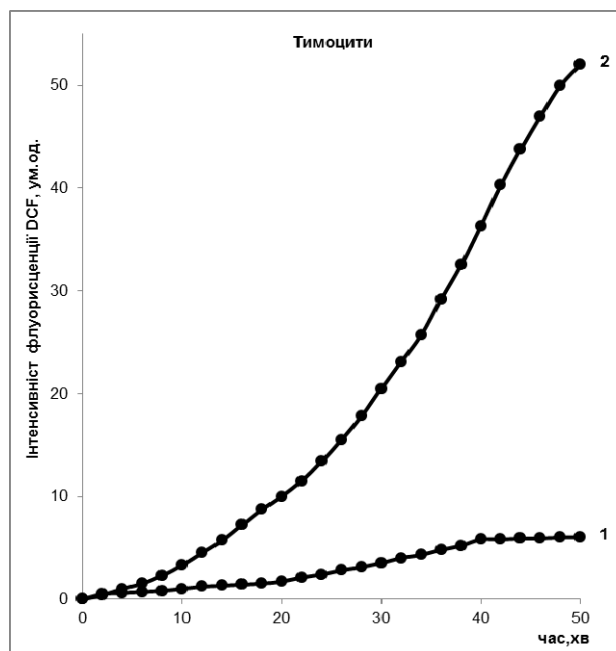
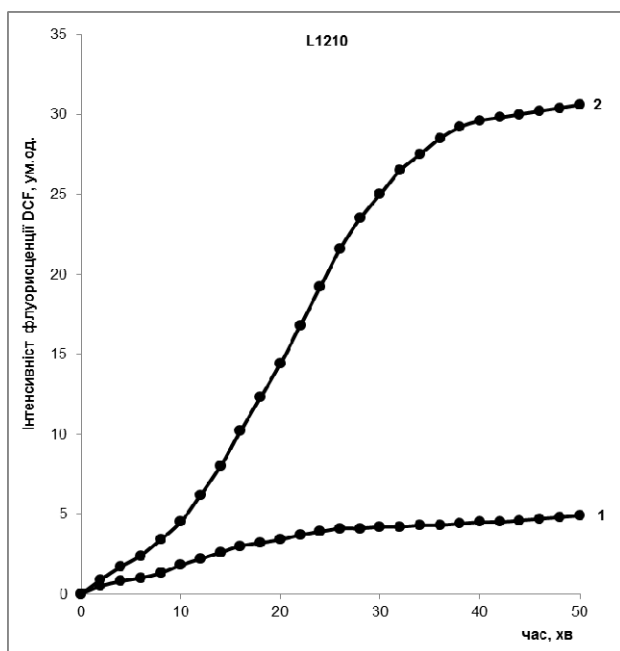


Рис.1 Динаміка продукування АФК у клітинах L1210 та тимоцитах у контролі (1) та за дії доксорубіцину у концентрації 1 мкг/мл (2), на рисунку представленні результати типового експерименту

Отримані нами дані узгоджуються з літературними щодо спричинюваних доксорубіцином надмірної генерації активних форм кисню та цитотоксичного ефекту у нормальних клітинах, зокрема, у кардіоміоцитах. Однією з причин такого впливу може бути те, що доксорубіцин здатен утримуватись у внутрішній мембрані мітохондрій внаслідок формування комплексу з кардіоліпіном, який у нормі зв'язує такий складовий протеїн електрон-транспортного ланцюга мітохондрій, як цитохром с. Взаємодія доксорубіцину з кардіоліпіном супроводжується значним продукуванням супероксидних аніон-радикалів ($O_2^{\cdot -}$) та вивільненням цитохрому с з мітохондрій у цитозоль, що є ознакою апоптозу [2, 10, 13].

Наступною задачею було оцінити рівень вільного цитозольного Ca^{2+} як показника кальцієвого гомеостазу у тимоцитах та клітинах L1210 за дії доксорубіцину.

Величина $[Ca^{2+}]_i$ у контролі становила у тимоцитах 100 ± 9 нМ, а у клітинах L1210 – 112 ± 10 нМ. Упродовж інкубації клітин ці значення не змінювались і їх приймаємо за 100%.

У клітинах обох типів виявлено зростання рівня цитозольного кальцію за дії Докс. У клітинах L1210 Докс спричиняв поступове підвищення $[Ca^{2+}]_i$, яке на 80-й хв інкубації ставало значним, перевищуючи контрольний показник на 170%. У тимоцитах зростання показника виявлено вже на 20 хв інкубації. Новий стаціонарний рівень $[Ca^{2+}]_i$ утримувався до 60 хв, а через 80 хв зростав на 60%. (Рис.2)

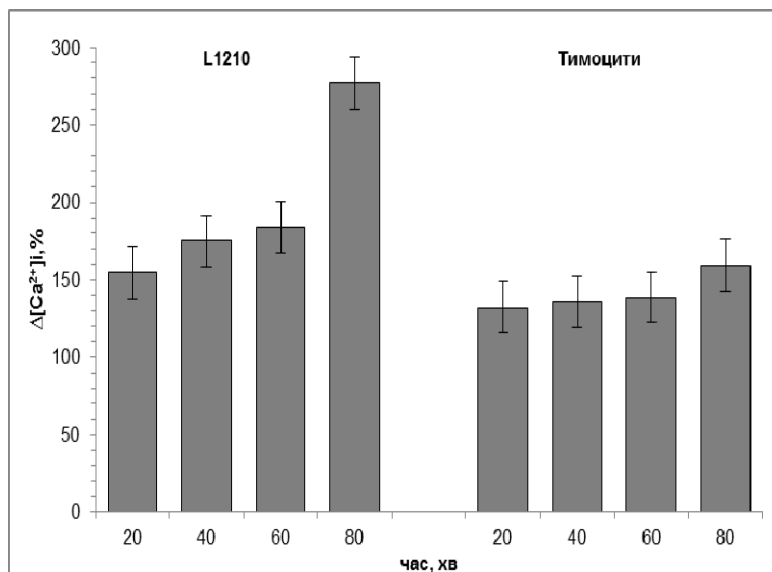


Рис.2. Концентрація цитозольного Ca^{2+} у тимоцитах та клітинах L1210 за дії доксорубіцину у концентрації 1 мкг/мл

Виявлене нами підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у досліджуваних клітинах за дії Докс може відбуватися за двома механізмами. По-перше, існують дані про специфічну взаємодію доксорубіцину безпосередньо з кальцієвими каналами клітини. Показано, що Докс активує потенціал-керовані Ca^{2+} канали L-типу та пригнічує $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник плазматичної мембрани, активує ріанодинові канали – рецептори у ЕПР кардіоміоцитів, що призводить до підвищення концентрації Ca^{2+} у цитозолі клітини шляхом посилення виходу катіону з внутрішньоклітинних депо та входу з позаклітинного простору [11]. Другий механізм підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ може бути пов'язаний з посиленням продукування АФК у клітинах. Показано, що АФК можуть безпосередньо впливати на функціональний стан та активність компонентів системи підтримання Ca^{2+} гомеостазу у клітині – Ca^{2+} -АТРази, рецептори до 1,4,5-інозитолтрифосфату, ріанодинові рецептори ендоплазматичного ретикулуму, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник (антипортер) та потенціал-керовані Ca^{2+} канали плазматичної мембрани, пори транзйентної проникності мітохондріальної мембрани [8,4,1]. Ці структури містять тіолові групи, окиснення яких може різнонаправлено впливати на їх активність, залежно від величини окисного стресу та віддалення від джерела АФК. За незначного підвищення рівня АФК може відбуватися активація Ca^{2+} -АТРази ЕПР та наповнення кальцієвого пулу ЕПР, тоді як за високих концентрацій АФК спостерігається пригнічення Ca^{2+} -АТРази ЕПР та відкриття мітохондріальної пори транзйентної проникності, внаслідок чого підвищується рівень кальцію у цитозолі клітини [4,7,8]. Другий з описаних механізмів є більш вірогідним для лейкоемічних клітин, оскільки значне підвищення величини $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у клітинах L1210 виявлене через 80 хв після дії Докс, тобто, у період досягнення максимального рівня продукування АФК (Рис.1,2).

Вважають, що специфічність протипухлинної дії Докс зумовлена інтерналізацією препарату у ДНК, яка подвоюється значно швидше у лейкоемічних клітинах з високим проліферативним потенціалом. Отримані нами дані, свідчать про позаядерні ефекти препарату, які можуть відігравати важливу роль у прояві цитотоксичності доксорубіцину не тільки у трансформованих, але і у нормальних клітинах. Хоча більшість літературних даних, присвячена механізмам цитотоксичної дії Докс у

кардіоміоцитах [2,10,13], нами виявлено порушення як прооксидантно – антиоксидантної рівноваги, так і кальцієвого гомеостазу за дії Докс на нормальних клітинах лімфоїдного походження.

Висновки:

Виявлено позаядерні ефекти ДНК-ушкоджувального протипухлинного препарату доксорубіцину – тривале посилення продукування АФК та підвищення концентрації Ca^{2+} як прояви цитотоксичної дії препарату не лише у лейкоемічних, а й у нормальних лімфоїдних клітинах.

Список використаних джерел

1. Brookes P. S., Yoon Y., Robotham J. L. et al. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2004. – Vol. 287. – P. 817–833.
2. Childs A. C., Phaneuf S. L., Dirks A. J. et al. Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome c release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2:Bax ratio // *Cancer Res.* – 2002. – Vol. 62, №16. P. 4592–4598.
3. Deavall D. G., Martin E. A., Horner J. M. et al. Drug-Induced Oxidative Stress and Toxicity // *J. Toxicol. Rev.* – 2012. – Vol. 2012. – P. 1–13.
4. Foyer C. H., Noctor G. Redox homeostasis and antioxidant signaling. A metabolic interface between stress perception and physiological response // *Plant Cell.* – 2005. – Vol. 17, № 5. – P. 1866–1876.
5. Grynkiewicz G. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties / G. Grynkiewicz, M. Poenie, R.Y. Tsien // *J. Biol. Chem.* – 1985. – Vol. 260. – P. 3440–3450.
6. Grynyuk I., Grebinyk S., Prylutska S., Mykhailova A., Franskevich D., Matyshevska O., Schütze C., Ritter U. Photoexcited fullerene C_{60} disturbs prooxidant-antioxidant balance in leukemic L1210 cells // *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik.* – 2013. – Vol. 44, №2-3. – P. 139–143.
7. Hildeman D. A., Mitchell T., Kappler J. et al. Cell apoptosis and reactive oxygen species // *J. Clin. Invest.* – 2003. – Vol. 111. – P. 575–581.
8. Mazars C., Thuleau P., Lamotte O. et al. Cross-Talk between ROS and Calcium in Regulation of Nuclear Activities // *Mol. Plant.* – 2010. – Vol. 3, №17. – P. 706.
9. Myhre O., iAndersen J., Aarnes H. et al. Evaluation of the probes 2,7-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation // *Biochem Pharmacol.* – 2003. – Vol. 65. – P. 1575–1582.
10. Octavia Y., Tocchetti C. G., Gabrielson K. L. et al. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 2012. – Vol. 52. – P. 1213–1225.
11. Saeki K., Obi I., Ogiku N. Doxorubicin directly binds to the cardiac-type ryanodine receptor // *Life Sci.* – 2002. – Vol. 70. P. 2377–89.
12. Tarpey M., Wink D., iGrisham M. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations // *Am. J. Phys.* – 2004. – Vol. 286, № 3. – P. 431–444.
13. Zhang Y. W., Shi J., Li Y. J. et al. Cardiomyocyte death in doxorubicin-induced cardiotoxicity // *Arch. Immunol. Ther. Ex.* – 2009. – Vol. 57, № 6. P. 435–445.

Надійшла до редколегії 26.05.14

Д. Франкевич, асп., Д. Гребинук, канд. биол. наук, О. Матишевская, д-р биол. наук
КНУ имени Тараса Шевченко, Киев

ДОКСОРУБИЦИН – МОДУЛЯТОР ПРОДУКЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И УРОВНЯ ЦИТОЗОЛЬНОГО Ca^{2+} В НОРМАЛЬНЫХ И ЛЕЙКЕМИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ

С использованием специфических флуоресцентных зондов было оценено продукцию активных форм кислорода и концентрацию цитозольного кальция в клетках. Обнаружено внеядерные эффекты ДНК-повреждающего противоопухолевого препарата доксорубина – длительное усиление продукции АФК и повышение концентрации Ca^{2+} , как проявление цитотоксического действия препарата не только в лейкемических (линия L1210 лимфоидная лейкемия мышей), но и в нормальных (изолированные тимоциты крысы) лимфоидных клетках.

Ключевые слова: активные формы кислорода, цитозольный Ca^{2+} , доксорубин, клетки L1210, тимоциты.

D. Franskevich, PhD stud., D. Grebinuk, PhD., O. Matushevskaya, DSc.
Kyiv National Shevchenko University, Kyiv

DOXORUBICIN – MODULATOR OF REACTIVE OXYGEN SPECIES PRODUCTION AND CYTOSOLIC Ca^{2+} LEVEL IN NORMAL AND LEUKEMIC CELLS

Using the specific fluorescent probes the reactive oxygen species production and the concentration of free cytosolic calcium in cells were estimated. Extra-nuclear effects of a DNA-damaging anticancer drug doxorubicin are demonstrated – long-term enhancement of ROS production and increasing of Ca^{2+} concentrations, as a manifestation of drug cytotoxic effect not only in leukemic (L1210 line of mice lymphoid leukemia), but also in normal (isolated rat thymocytes) lymphoid cells.

Key words: reactive oxygen species, cytosolic Ca^{2+} , doxorubicin, L1210 cells, thymocytes.

УДК: 546.655.4-31+612.018.2+612.881

О. Єфіменко, асп., Ю. Савченко, канд. биол. наук, Н. Нуріщенко, д-р биол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ,
Н. Жолобак, канд. биол. наук, М. Співак, чл.-кор.
Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

СКОРОТЛИВА АКТИВНІСТЬ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ ШЛУНКУ ТА ТОВСТОЇ КИШКИ У ЩУРІВ

ЗА УМОВ 10-ДЕННОГО ВВЕДЕННЯ НАНОКРИСТАЛІЧНОГО ДІОКСИДУ ЦЕРІЮ

Встановлено, що нанокристалічний діоксид церію (НДЦ) в шлунку молодих щурів збільшував співвідношення фазного і тонічного компонентів скорочень викликаних гіперкалієвим розчином (ГКР) на 21,9% ($p < 0,05$). У старих щурів у шлунку після дії НДЦ зростала амплітуда скорочень на 32,1% ($p < 0,05$), співвідношення фазного і тонічного компонентів на 122% ($p < 0,01$), швидкість розвитку скоротливої відповіді (V_{nc}) збільшувалась на 138,8% ($p < 0,01$), а швидкість фази розслаблення (V_{nr}) на 128,1% ($p < 0,01$). У шлунку старих щурів зростала V_{nr} Ах-скорочень на 90% ($p < 0,001$). У товстій кишці старих щурів НДЦ збільшував амплітуду ГКР-скорочень на 350% ($p < 0,001$), співвідношення фазного і тонічного складових на 59,5% (V_{nc} та V_{nr} на 166,8% та 644% ($p < 0,001$), відповідно. У молодих щурів НДЦ збільшував амплітуду Ах-скорочень на 177% ($p < 0,001$), а у старих щурів співвідношення фазного і тонічного складових на 79% та V_{nc} на 34,3% ($p < 0,05$). Таким чином, НДЦ посилював скоротливу активність гладеньких м'язів травного тракту.

Ключові слова: нанокристалічний діоксид церію, скоротлива активність, шлунок, товста кишка.

Вступ. Захворювання органів травного тракту спричиняють зниження якості життя. У різних країнах від закрепів постійно або періодично страждає кожна третя-четверта доросла людина [1]. Причому спостерігається різке збільшення їх частоти після 65 років [2]. Доведено, що закрепи є головним фактором ризику колоректального раку через підвищення рівня канцерогенних метаболітів у порожнині товстої кишки в два рази і збільшення часу їх контакту зі слизовою оболонкою кишківника [3]. Так як до більшості послаблюючих препаратів з часом розвивається звикання, а ряд з них має побічну дію [4], створення нових безпечних прокінетів є актуальною проблемою сучасної біомедицини. Аналіз існуючих стимуляторів моторики показує, що найменшою побічною дією та відсутністю тахіфілаксії володіють пребіотики. Як і, як відомо, через утворення коротко ланцюгових жирних кислот активують моторику та евакуацію з товстої кишки [5]. Роботами останніх років показано, що нанокристалічний діоксид церію (НДЦ) володіє пребіотичною дією, але прокінетичні властивості його не досліджені. В зв'язку з цим метою роботи було дослідити вплив НДЦ на скоротливу активність гладеньких м'язів шлунка та товстої кишки *in vitro* у щурів різних вікових груп.

Матеріали і методи. Дослідження проведені на 80 білих нелінійних щурах двох вікових груп: 3 місяці (вага 130-160 г, $n=40$) та 22-24 місяці (вага 390-450 г, $n=40$). Кожну вікову групу було поділено наступним чином: I – контрольна група, II – група тварин, яким вво-

дили 3 мл деклорованої води, III – група щурів, яким вводили стабілізуючий розчин в об'ємі 2,9 мл/кг, та IV – група тварин, яким вводили НДЦ (1 ммоль/мл), розчиненого в стабілізуючому розчині, об'єм введеного розчину – 2,9 мл/кг. I, II та III групи тварин були контрольними. Всі речовини вводили протягом 10 днів, один раз на день, внутрішньошлунково (в/ш).

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

Визначення скоротливої активності гладеньких м'язів проводили тензометричним методом на ізольованих гладеньких м'язах фундального відділу шлунка та дистального відділу товстої кишки щурів. В експерименті використовували кільцеві смужки гладеньких м'язів (середній розмір – 2x10 мм), очищені від слизової оболонки, які розміщували у робочій камері об'ємом 5 мл з проточним розчином Кребса (швидкість протікання – 5 мл/хв). Смужкам надавали пасивний натяг (10 мН) і

залишали на 1 год. Скоротливу активність досліджували в ізометричному режимі за допомогою датчика сили. Для з'ясування особливостей впливу НДЦ на функціонування гладеньких м'язів шлунку і товстої кишки було обрано класичні стимулятори: ізотонічний гіперкалієвий розчин (ГКР) та ацетилхолін (Ах). Аналіз скоротливих відповідей гладеньком'язових препаратів здійснювали відповідно до методу, описаного в роботі [6]. Для характеристики скоротливої активності гладеньком'язових препаратів використовували наступні показники скорочень: амплітуда (мН), співвідношення фазного і тонічного компонентів (%), фази скорочення (V_{nc}) та розслаблення (V_{nr}) максимальної нормованої швидкості (xv^{-1}), які розраховуються за наступною формулою:

$$V_n = \frac{(n-1)^{\frac{n-1}{n}} \cdot (n+1)^{\frac{n+1}{n}}}{4n\tau}$$

де, τ – характеристичний час (чисельно дорівнює часу, в який спостерігається напівмаксимальне значення сили $\frac{1}{2}f_m$), n – логарифмічний коефіцієнт крутизни механокінетичної кривої.

НДЦ синтезовано у відділі проблем інтерферону та імуномодуляторів ІМВ ім. Д.К.Заболотного НАН України за методикою [7]. Синтезований золь містив 0,1 Мнано-частинок діоксиду церію (в перерахунку на церій) розміром 2-7 нм, стабілізованих цитратом натрію, з дзета потенціалом мінус 20мВ. Для роботи використовували розведення вихідного золю, які проводили у стерильній деіонізованій воді.

Експериментальні дані обробляли методами варіаційної статистики із використанням програми OriginPro 8 [8]. Перевірку вибірок на їх приналежність до нормально розподілених генеральних сукупностей здійснювали за допомогою критерію Шапіро-Уїлка. Для визначення

вірогідних відмінностей між середніми величинами двох вибірок використовували непарний t-тест Ст'юдента. У всіх випадках достовірними вважали результати за умови значення ймовірності P , менше 5% ($P < 0.05$). Результати представлені як середнє арифметичне $\pm$ стандартна похибка середнього, n – кількість дослідів.

Результати та обговорення. В результаті проведених досліджень було встановлено, що отримані дані між I, II та III групами не мали статистично значущої різниці, тому порівняння дії НДЦ проводили з I групою. В дослідженнях на гладком'язових препаратах шлунку молодих щурів показано, що ГКР-викликані скорочення характеризувались середньою амплітудою $18,6 \pm 11,7$ мН, а співвідношення фазного і тонічного компонентів становили $3,2 \pm 3,5\%$. Старіння не викликало змін даних показників. Функціональна активність ГКР-викликаних скорочень гладеньких м'язів шлунку в групі старих щурів не зазнавала значних змін порівняно з аналогічними показниками молодих тварин, але мала тенденцію до зниження. 10-денне введення НДЦ у шлунку молодих щурів збільшувало співвідношення фазного і тонічного компонентів на 21,9 % ($p < 0,05$). На всі інші показники НДЦ не здійснював статистично значущого впливу.

У старих щурів у шлунку після дії НДЦ зростала амплітуда скорочень до $34,2 \pm 5,4$ мН, що відповідало збільшенню на 32,1 % в порівнянні з контрольною групою ($p < 0,05$). Співвідношення фазного і тонічного компонентів у старих щурів за дії НДЦ зростало до $10,0 \pm 3,8\%$. Кінетичні параметри ГКР-викликаних скорочень шлунку старих щурів, які одержували НДЦ, статистично значуще зростали. Швидкість розвитку скоротливої відповіді (V_{nc}) збільшувалась на 138,8% ($p < 0,01$), а швидкість фази розслаблення (V_{nr}) на 128,1% ($p < 0,01$), (Рис. 1).

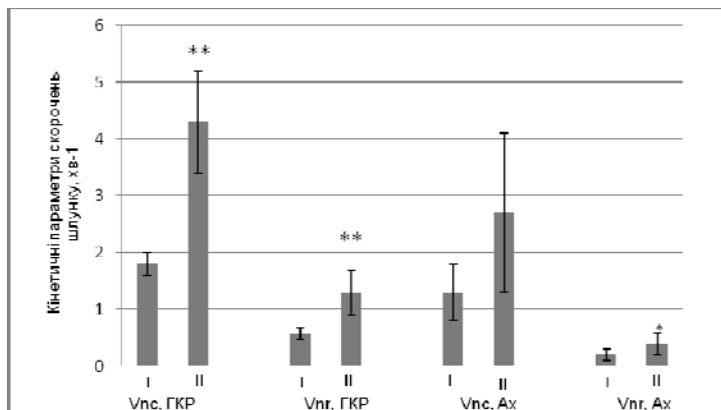


Рис. 1. Вплив нанокристалічного діоксиду церію на зміни максимальної нормованої швидкості фаз скорочення (V_{nc}) та розслаблення (V_{nr}) скорочень, викликаних гіперкалієвим розчином (ГКР) та ацетилхоліном (Ах) гладеньких м'язів шлунку старих щурів: I- контрольна група, II – нанокристалічний діоксид церію, $M \pm SD$, $n=10$

* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ у порівнянні з контролем.

Ах-викликані скорочення шлунку молодих щурів мали амплітуду $9,6 \pm 3,8$ мН, а у старих – $39,7 \pm 4,1$ мН, що було на 313% більше ($p < 0,001$). Також тенденції до зростання з віком мало співвідношення фазного і тонічного компонентів з $34,5 \pm 12,8\%$ до $49,4 \pm 12,7\%$ ($p > 0,05$). Швидкість скорочення (V_{nc}) Ах-викликаних скорочень гладеньких м'язів шлунку в групі молодих щурів не зазнавала значних змін порівняно з аналогічними показниками старих тварин. Тоді як швидкість розслаблення зменшувалася з віком на 57 % ($p < 0,05$). У молодих щурів у шлунку НДЦ не викликав змін показників Ах-скорочень. Тоді як у шлунку старих щурів зростала

швидкість розслаблення на 90% ($p < 0,001$) (Рис. 1). Всі інші показники не мали статистично значущої різниці.

Результати досліджень показали, що після 10-денного введення НДЦ зростали всі показники ГКР-викликаних скорочень у обох вікових груп, а змін показників Ах-викликаних скорочень не було виявлено (окрім швидкості розслаблення). Відомо, що скоротлива відповідь ГКР-стимульованих скорочень обумовлюється іонами Ca^{2+} , що надходять до гладеньком'язових клітин через потенціалкеровані Ca^{2+} -канали L-типу [9]. Можливо в шлунку задіяний саме цей механізм дії НДЦ.

Дослідження параметрів моторної активності товстої кишки показало, що ГКР-індуковані скорочення гладь-

ських м'язів молодих тварин характеризувались середньою амплітудою $13,5 \pm 5,4$ мН. Співвідношення фазного і тонічного складових цих скоротливих відповідей у середньому становило $12,3 \pm 8,2$ %. У випадку гладеньких м'язів товстої кишки старих щурів амплітуда ГКР-скорочень залишалась близькою до показника молодих

тварин $-10,8 \pm 5,1$ мН, а співвідношення фазного і тонічного складових мало тенденції до зниження на $7,9 \pm 4,1$ %. Застосований кінетичний аналіз показав, що з віком максимальна швидкість фази скорочення зменшувалась на $47,8\%$ ($p < 0,01$), а фази розслаблення – на $81,1\%$ ($p < 0,01$), (Рис. 2).

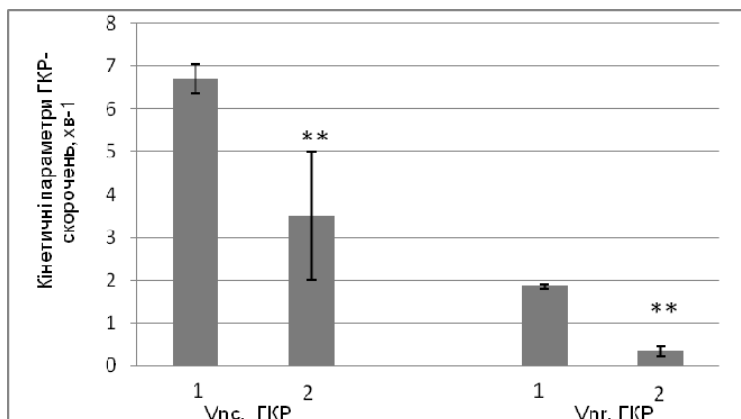


Рис. 2. Зміни максимальної нормованої швидкості фаз скорочення (V_{nc}) та розслаблення (V_{nr}) скорочень, викликаних гіперкалієвим розчином (ГКР) гладеньких м'язів товстої кишки у молодих (1) та старих (2) щурів: $M \pm SD$, $n=10$

** – $p < 0,01$ в порівнянні з контрольними групами щурів.

Отримані нами результати можуть бути пояснені літературними даними щодо зниження рівня внутріклітинного кальцію в гладком'язевих клітинах товстої кишки з віком [10] та зменшення вивільнення ацетилхоліну на 50% у електрично-стимульованих препаратах товстої кишки [11]. Окрім цього американськими дослідниками було проведено дослідження і встановлено, що у гладком'язових клітинах товстої кишки старих щурів зменшуються K^+ та Ca^{2+} струми через відповідні канали, які впливають на початок скорочення [12].

У молодих щурів 10-денне введення НДЦ не викликало змін показників ГКР-індукованих скорочень гладеньких м'язів товстої кишки. Тоді як у старих щурів, зростала амплітуда до $37,9 \pm 11,5$ мН, що було більше на 350 % ($p < 0,001$), ніж в контролі. Співвідношення фазного і тонічного складових ГКР-активованого скорочення становило $12,58 \pm 4,95\%$, що було більше на 59,5 % ($p < 0,05$) у випадку контрольних тварин. У групі старих щурів показники як нормованої максимальної швидкості фази скорочення, так і розслаблення зростали, відповідно, на 166,8% та 644% ($p < 0,001$), (Рис.5).

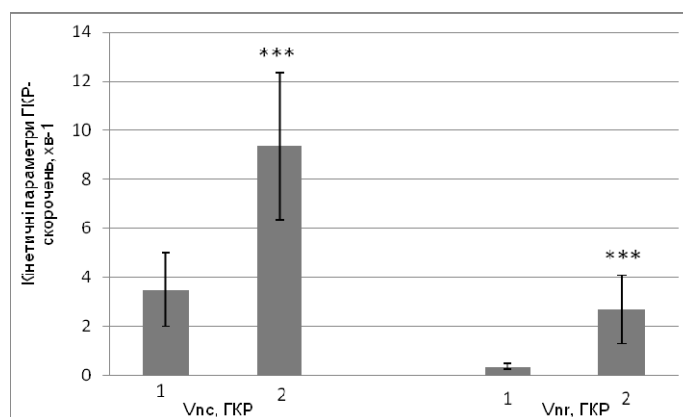


Рис.3. Вплив нанокристалічного діоксиду церію (2) на зміни максимальної нормованої швидкості фаз скорочення (V_{nc}) та розслаблення (V_{nr}) скорочень, викликаних гіперкалієвим розчином (ГКР) гладеньких м'язів товстої кишки у старих щурів: $M \pm SD$, $n=10$

*** – $p < 0,001$ в порівнянні з відповідними контрольними групами щурів (1).

У контролі амплітуда Ах-викликаних скорочень гладеньких м'язів товстої кишки молодих щурів у середньому становила $8,7 \pm 2,2$ мН, а співвідношення фазного і тонічного компонентів було $24,6 \pm 8,9\%$. З віком амплітуда Ах-скорочень гладеньких м'язів товстої кишки зростала до $15,6 \pm 10,2$ мН, однак співвідношення фазного і тонічного складових скоротливих відповідей зменшувалось до $10,9 \pm 0,7\%$. Отримані дані співпадають з дослі-

дженнями, в яких було показано, що Ах збільшував силу скорочення в товстій кишці молодих та старих щурів [13]. У старих щурів кінетичні характеристики Ах-скорочень залишались аналогічними до показників, одержаних для кишечника молодих тварин.

10-денне введення НДЦ викликало зміни параметрів Ах-викликаних скорочень. У молодих щурів зростала амплітуда Ах-викликаних скорочень на 177 % ($p < 0,001$).

Співвідношення фазного і тонічного складових скоротливих відповідей також зростало на 30,9 % ($p < 0,05$). У старих щурів ці показники мали тенденцію до зростання. А саме, амплітуда Ах-викликаних скорочень збільшувалася з $15,5 \pm 10,2$ мН до $16,9 \pm 4,3$ мН ($p > 0,05$), а співвідношення фазного і тонічного складових – на 79% ($p < 0,05$). Оскільки співвідношення фазного і тонічного компонентів АХ-скорочень є показником ефективності

активації сигналу через мускаринові ацетилхолінові рецептори, то наші результати вказують на покращення ефективності активації сигналу після дії НДЦ.

Кінетичні параметри також зазнавали змін. Швидкість скорочення зростала як у молодих, так і у старих щурів після дії НДЦ на 17 % та 34,3 %, відповідно (Рис.4). Проте статистично значущих змін фази розслаблення Ах-викликаних скорочень не відбувалося за дії НДЦ.

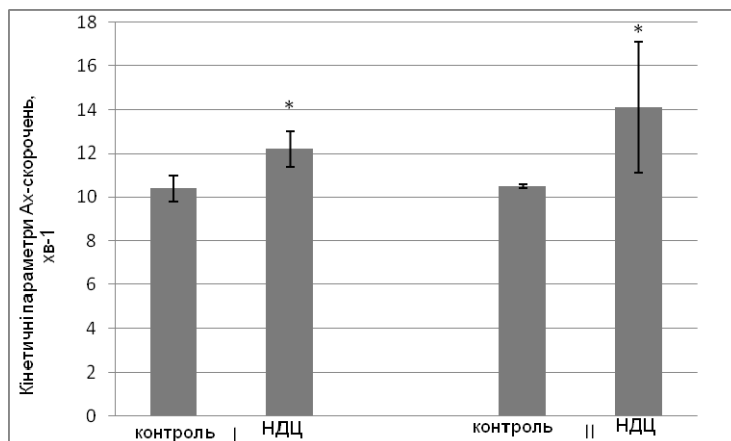


Рис.4. Вплив нанокристалічного діоксиду церію (НДЦ) на швидкість фази скорочення (V_{nc}), викликаного ацетилхоліновим розчином (Ах) гладеньких м'язів товстої кишки у щурів 3 (I) та 24 місяців (II): $M \pm SD$, $n=10$, * – $p < 0,05$ в порівнянні з відповідними контрольними групами щурів

У старих щурів за дії НДЦ спостерігається значне посилення скорочень товстої кишки, активованих депляризацією плазматичної мембрани. Оскільки головний внесок у генерування цих скорочень в гладеньких м'язах шлунково-кишкового тракту роблять іони Ca^{2+} , які входять в міоцити через потенціалкеровані Ca^{2+} -канали L-типу, можна припустити, що саме вони є однією з можливих ефektorних ланок при дії нанокристалічного діоксиду церію. Варто відзначити також значне пришвидшення процесу розслаблення гіперкалієвої контрактури в групі старих щурів, що отримували НДЦ. Воно може бути пов'язане з рядом клітинних процесів, зокрема, такий ефект може свідчити про активацію систем викачування іонів Ca^{2+} з міоплазми після збудження (можливі ефektorні білки – Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани та/або саркоплазматичного ретикулу, а також Na^+ , Ca^{2+} -обмінник). Не можна відкидати дію НДЦ через активацію сигналу в мускаринових ацетилхолінових рецепторах, оскільки НДЦ збільшував параметри Ах-скорочень. Отже, можливо в товстій кишці НДЦ опосередковує свою дію через декілька ефektorних ланок.

Висновки:

1. З віком в гладеньких м'язах шлунку зменшувалася максимальна нормована швидкість фаз скорочення та розслаблення скорочень, викликаних гіперкалієвим розчином.

2. У старих щурів в гладеньких м'язах товстої кишки зменшувалася амплітуда, максимальна нормована швидкість фаз скорочення та розслаблення скорочень, викликаних гіперкалієвим розчином.

3. Нанокристалічний діоксид церію збільшував амплітуду, максимальну нормовану швидкість фаз скорочення та розслаблення скорочень, викликаних гіперкалієвим розчином в гладеньких м'язах шлунку та товстої кишки у старих щурів.

Acknowledgements: Робота виконана за фінансування Державного агентства з питань науки, інновацій та інфор-

матизації України в рамках виконання науково-дослідної роботи "Експериментальне обґрунтування застосування нанокристалічного діоксиду церію в гастроентерології, проктології і геріатрії", № державної реєстрації 0113U006058.

Список використаних джерел

1. Talley NJ, O'Keefe EA, Zinsmeister AR. Prevalence of gastrointestinal symptoms in the elderly: a population-based study // *Gastroenterology*. – 1992. – Vol. 102(3). – P. 895-901.
2. Morley J.E. Constipation and irritable bowel syndrome in the elderly // *Clin. Geriatr. Med.* – 2007. – Vol. 23. – P. 823-832, Sarma S.K. Physiology and pathophysiology of colonic motor activity // *Dig. Dis. Sci.* – 1999. – Vol. 36. – P. 998-1018.
3. Tayem RF, Shehadeh IN, Abumweis SS. Physical inactivity, water intake and constipation as risk factors for colorectal cancer among adults in Jordan // *Asian Pac J. Cancer. Prev.* – 2013. – Vol. 14(9). – P. 5207-5212.
4. Ewe K, Ueberschaer B, Press AG. Influence of senna, fibre, and fibre + senna on colonic transit in loperamide-induced constipation // *Pharmacology*. – 1993. – Vol. 47. – P. 242-8.
5. Ewe K, Ueberschaer B, Press A.G., Kurreck C., Klump M. Effect of lactulose, lactulose and bisacodyl on gastro intestinal transit studied by metal detector // *Aliment Pharmacol. Ther.* – 1995. – Vol. 9, №1. – P. 69-73.
7. Burdya Th.V., Kosterin S.A. // *Kinetic analysis of smooth muscle relaxation*. – *Gen. Physiol. Biophys.* 1991. №10. P. 589-598.
8. Иванова О.С., Шекунова Т.О., Иванов В.К., Щербakov А.Б., Попов А.Л., Давыдова Г.А., Селезнева И.И., Колица Г.П., Третьяков Ю.Д. Одностадийный синтез коллоидных растворов диоксида церия для биомедицинского применения // *Докл. Акад. наук*. 2011. Т.437. №5. С.638–641.
9. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1998, 459 с.
10. Kuriyama H., Kitamura K., Itoh T., Inoue R. Physiological features of visceral smooth muscle cells, with special reference to receptors and ion channels // *Physiological rev.* – 1998. – Vol. 78, №3. – P. 811–889.
11. Ibitayo A.I., Sladick J., Tuteja S. HSP27 in signal transduction and associate ion with contractile proteins in smooth muscle cells // *Am. J. Physiol.* – 1999. – Vol. 277. – P. G445-54.
12. Roberts D., Gelperin D., Wiley J.W. Evidence for age-associated reduction in acetyl choline release and smooth muscle response in the rat colon // *Am. J. Physiol.* – 1994. – Vol. 267. – P. G515-22.
13. Xiong Z., Sperelakis N., Noffsinger A., Fenoglio-Preiser C. Potassium current in rat colonic smooth muscle cell and changes during development and aging // *Pflügers. Arch.* – 1995. – Vol. 430. – P. 563-72.
14. Abalo R., Vera G., Rivera A.J., Martín M.I. Age-related changes in the gastro intestinal tract: a functional and immunohistochemical study in guinea-pig ileum // *Life Sci.* – 2007. – Vol. 80(26). – P. 2436-45.

Надійшла до редколегії 28.05.14

Е. Ефименко, асп., Ю. Савченко, канд. биол. наук, Н. Нурищенко, д-р биол. наук
КНУ имени Тараса Шевченко, Киев,
Н. Жолобак, канд. биол. наук, Н. Спивак, чл.-кор.
Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины Киев

СОКРАТИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ГЛАДКИХ МЫШЦ ЖЕЛУДКА И ТОЛСТОЙ КИШКИ У КРЫС ПОСЛЕ 10-ДНЕВНОГО ВВЕДЕНИЯ НАНОКРИСТАЛЛИЧЕСКОГО ДИОКСИДА ЦЕРИЯ

Установлено, что нанокристаллический диоксид церия (НДЦ) в желудке молодых крыс увеличивал соотношение фазного и тонического компонентов сокращений вызванных гиперкалиевым раствором (ГКР) на 21,9% ($p < 0,05$). У старых крыс в желудке после действия НДЦ увеличивалась амплитуда сокращений на 32,1% ($p < 0,05$), соотношение фазного и тонического компонентов на 122% ($p < 0,01$), скорость развития сократительного ответа (V_{nc}) на 138,8% ($p < 0,01$), а скорость фазы расслабления (V_{nr}) на 128,1% ($p < 0,01$). В желудке старых крыс возрастала V_{nr} Ах-сокращений на 90% ($p < 0,001$). В толстой кишке старых крыс НДЦ увеличивал амплитуду ГКР-сокращений на 350% ($p < 0,001$), соотношение фазного и тонического составляющих на 59,5% ($p < 0,05$), V_{nc} и V_{nr} на 166,8% и 644% ($p < 0,001$), соответственно. У молодых крыс НДЦ увеличивал амплитуду Ах-сокращений на 177% ($p < 0,001$), а у старых крыс – соотношение фазного и тонического составляющих на 79% и V_{nc} на 34,3% ($p < 0,05$). Таким образом, НДЦ усиливал сократительную активность гладких мышц пищеварительного тракта.

Ключевые слова: нанокристаллический диоксид церия, сократительная активность, желудок, толстая кишка.

O. Iefimenko, PhD stud., O. Savchenko, PhD., N. Nyrischenko, DSc.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv,
N. Zholobak, Ph.D., M. Spivak, corresponding member
Danylo Zaboloty Institute of Microbiology and Virology National Academy of Science of Ukraine

CONTRACTILE ACTIVITY OF SMOOTH MUSCLES OF THE STOMACH AND COLON IN RATS UNDER 10-DAYS INJECTION OF NANOCRYSTALLINE CERIUM DIOXIDE

It was established that (nanocrystalline cerium dioxide) NCD increased the ratio of phase and tonic components of contractions induced by hyper potassium solution by 21,9% ($p < 0,05$) in the stomach of young rats. NCD increased the amplitude of contractions by 32,1% ($p < 0,05$), the ratio of phase and tonic components by 122% ($p < 0,01$), the rate of contractile responses (V_{ns}) by 138,8% ($p < 0,01$), and the rate of relaxation phase (V_{nr}) by 128,1% ($p < 0,05$) in stomach of old rats. In the stomach of old rats V_{nr} of Ach-contractions increased by 90%. In the colon of old rats NCD increased the amplitude of HPS-contractions by 350% ($p < 0,001$), the ratio of phase and tonic components by 59,5% ($p < 0,05$), V_{ns} and V_{nr} by 166,8% and 644% ($p < 0,001$), respectively. In young rats NCD increased the amplitude of Ach-contractions by 177% ($p < 0,01$), while in old rats – the ratio of phase and tonic components of 79% and V_{ns} by 34,3% ($p < 0,05$). Thus, NCD increased the contractile activity of smooth muscles of the digestive tract.

Keywords: nanocrystalline cerium dioxide, contractile activity, stomach, colon.

УДК 612.3+612.7+577

С. Пилипенко, докторант, О. Шелюк, канд. біол. наук,
Ю. Цейслер, канд. біол. наук, Н. Нурищенко, д-р біол. наук,
Т. Берегова, д-р біол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ВПЛИВ БЛОКАДИ КАЛЬЦІЄВИХ КАНАЛІВ L-ТИПУ НА МОТОРИКУ ШЛУНКА У ЩУРІВ ЗА УМОВ ТРИВАЛОГО ВВЕДЕННЯ ОМЕПРАЗОЛУ

Встановлено, що після 28-денного пригнічення секреції гідрохлоридної кислоти в шлунку щурів омепразолом частота спонтанних скорочень в шлунку не змінювалась, а амплітуда спонтанних скорочень та індекс спонтанної моторної активності зменшувались на 79,7% ($p < 0,01$) та 10,3% ($p < 0,05$), відповідно. Також достовірно послаблювалась моторна активність шлунка, стимульована карбахоліном, і зменшувались Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФаза та K^+ (EGTA)-АТФаза активності актоміозину гладеньких м'язів шлунка. В групі щурів, яким упродовж 28 днів одночасно з омепразолом вводили блокатор рН-чутливого рецептора гастринових клітин верапаміл, спонтанна та стимульована моторна активність шлунка була сильнішою у порівнянні з групою щурів, яким вводили лише омепразол. При цьому показники моторики не досягали контрольних значень. Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФаза активність актоміозину зростала, а K^+ (EGTA)-АТФаза активність не змінювалась у порівнянні з щурами, яким вводили один омепразол. Так як верапаміл суттєво запобігає розвитку гіпергастринемії, зроблено висновок, що гіпергастринемія є лише одним з механізмів порушення моторики шлунка після тривалого введення омепразолу.

Ключові слова: шлунок, моторика, актоміозин, АТФаза, омепразол, верапаміл.

Вступ. Одними з головних причин шлунково-кишкових розладів є зміни в моторній функції шлунково-кишкового тракту (ШКТ), в основі яких лежать порушення скорочення гладеньких м'язів [3, 4, 9, 13]. Зміни скоротливої активності гладеньких м'язів ШКТ, зокрема шлунку щурів, можуть бути пов'язані з порушенням взаємодії скорочувальних білків у складі функціональних комплексів, що на молекулярному рівні забезпечують процес скорочення [10]. АТФаза активність є однією з основних функціональних характеристик комплексу скоротливих білків – актоміозину. Функціонування АТ-Фази, як і процес скорочення в цілому, залежить від наявності катіонів, одним з основних серед яких є кальцій. В регуляції кальцієвого гомеостазу важлива роль належить кальцій-чутливому рецептору (CaR), який експресується в багатьох тканинах, в тому числі шлунково-кишкового тракту. Присутність CaR на гастрин-секретуючих G клітинах шлунку, а також його активація Ca^{2+} , амінокислотами та підвищенням рН дає змогу

припустити, що CaR функціонує як фізіологічний сенсор регуляції секреції гастрину та гідрохлоридної кислоти [6]. Як відомо, омепразол, що належить до препаратів – інгібіторів протонної помпи (ІПП), блокує секрецію кислоти в шлунку (зростає рН), і тому може впливати на функціонування CaR, і тим самим на кальцієвий гомеостаз в G клітинах. Внаслідок чого рівень гастрину в сироватці крові зростає. Тривала гіпергастринемія призводить до розвитку гіперплазії і метаплазії, та є фактором ризику розвитку раку в слизовій оболонці шлунка. Тому пошук препаратів, що запобігають розвитку гіпергастринемії, є актуальною проблемою сучасної науки. Аналіз літератури дозволив нам виділити в якості кандидата на такий препарат блокатор кальцієвих каналів верапаміл, адже за умов його блокади CaR G клітин не реагуюватиме на підвищення рН в порожнині шлунка та не розвиватиметься гіпергастринемія.

Метою дослідження було визначення впливу тривалого введення омепразолу та блокатора кальцієвих

каналів L-типу верапамілу на моторику ШКТ і АТФазну активності актоміозину шлунку та товстої кишки.

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження проведені на білих нелінійних щурах, розділених на 3 групи. Щури I групи слугували контролем, їм упродовж 28 днів щоденно внутрішньоочеревинно (в/о) та перорально (п/о) вводили відповідно 0,2 та 0,5 мл води для ін'єкцій. Щурам II групи упродовж 28 днів щоденно в/о вводили омепразол (14 мг/кг) (виробництва "Sigma-Aldrich", США). Щурам III групи протягом 28 днів одночасно з омепразолом вводили верапаміл (0,5 мг/кг, в/о) [1].

На 29-й день експерименту тварин наркотизували уретаном (1,1 г/кг, в/о) та досліджували балонографічним методом моторику товстої кишки. Після 2-х годинного запису моторики щурам в/о вводили стандартний стимулятор моторики неселективний агоніст ацетилхолінових рецепторів карбахолін в дозі 10 мкг/кг. Виділення актоміозину гладеньких м'язів товстої кишки проводили за методикою [11]. АТФазну активність актоміозину розраховували за кількістю неорганічного фосфату (Фн), який утворюється при гідролізі АТФ активними центрами міозинових молекул. Кількість Фн визначали за модифікованим методом Фіске-Суббароу [7]. АТФазну реакцію проводили при 37 °С в інкубаційному середовищі (загальний об'єм проби – 1,8 мл) такого складу: 2,5 мМMgCl₂, 0,1 мМCaCl₂, імідазольний буфер 20 мМ, рН 7.5. Для визначення K⁺(ЕГТА)-АТФазної активності до інкубаційного середовища додавали 1 мМ ЕГТА. Концентрація актоміозину в кінцевому об'ємі реакційної суміші становила 0,28 мг/мл. АТФазну реакцію ініціюва-

ли внесенням 1 мМ АТФ до середовища інкубації білка та виражали в нмоль Фн/хв на 1 мг білка.

Статистичну обробку даних проводили з використанням пакету математичних програм StatisticSoft 6.0. У зв'язку з невеликим об'ємом вибірок, для перевірки розподілу на нормальність було застосовано W тест Шапіро-Вілکا. Ймовірність похибки першого роду $\alpha > 0,05$. Оскільки одержані дані були розподілені за нормальним законом, то були використані параметричні методи порівняння вибірок. Для статистичної обробки параметричних даних був використаний t-критерій Стюдента для незалежних вибірок. Для наших даних ми брали рівень значущості $p < 0,05$. Розраховували середнє значення (M) і стандартну похибку середнього (m).

Результати досліджень та їх обговорення. В результаті проведених досліджень нами показано, що у щурів контрольної групи частота спонтанних скорочень в шлунку складала 3 скорочення в хвилину, середня амплітуда цих скорочень була $4,62 \pm 0,03$ см.вод.ст., а індекс моторної активності дорівнював $676,8 \pm 10,2$ ум.од. (рис. 1А). Введення карбахоліну стимулювало виражену скорочувальну реакцію шлунка, яка на фоні незмінної частоти скорочень характеризувалась зростанням амплітуди скорочень та індексу моторної активності до $14,09 \pm 0,15$ см.вод.ст. і $1284,6 \pm 13,0$ ум.од./хв.

Після 28-денного введення омепразолу частота спонтанних скорочень в шлунку не змінювалась (рис. 1Б). При цьому амплітуда спонтанних скорочень зменшувалась до $0,94 \pm 0,03$ см.вод.ст., або на 79,7% ($p < 0,01$). Індекс спонтанної моторної активності зменшувався до $607,2 \pm 13,2$ ум.од./хв, або на 10,3% ($p < 0,05$).

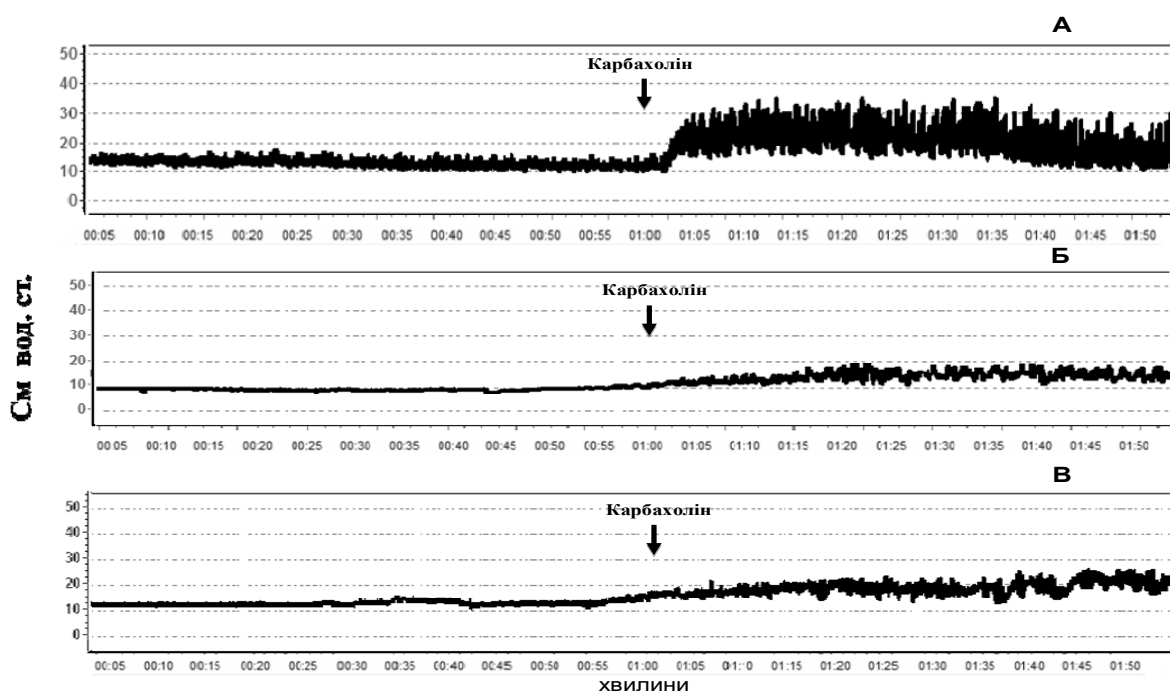


Рис. 1. Оригінальні записи моторики шлунка у щурів контрольної групи (А), після 28 денного введення омепразолу (14 мг/кг, внутрішньоочеревинно) (Б) та після 28 денного одночасного введення омепразолу (14 мг/кг, внутрішньоочеревинно) та верапамілу (0,5 мг/кг, внутрішньоочеревинно) (В)

В групі щурів, яким упродовж 28 днів вводили омепразол, стимулююча дія карбахоліну на скоротливу активність гладеньких м'язів шлунка була значно слабшою у порівнянні з контрольною групою: амплітуда скорочень зменшувалась на 64,3% ($p < 0,01$) і становила $5,03 \pm 0,11$ см.вод.ст.•хв, індекс стимульованої моторної активності зменшувався на 36,8% ($p < 0,05$) та дорівнював $812,3 \pm 11,6$ ум.од./хв.

В групі щурів, яким упродовж 28 днів одночасно з омепразолом вводили верапаміл, спонтанна та стимульована моторна активність шлунка була сильнішою у порівнянні з групою щурів, яким вводили лише омепразол (рис. 1В). При цьому показники моторики не досягали контрольних значень. Амплітуда спонтанних скорочень в шлунку щурів, яким упродовж 28 днів одночасно з омепразолом вводили верапаміл, зростала і була

1,07±0,06 см.вод.ст.·хв, що лише на 13,8% ($p<0,05$) перевищувало даний показник в групі щурів, яким упродовж 28 днів вводили лише омепразол. Індекс спонтанної моторної активності мав лише тенденцію до зростання у порівнянні з групою щурів, яким упродовж 28 днів вводили лише омепразол, і складав 623,6±32,1 ум.од./хв ($p>0,05$).

Амплітуда скорочень, стимульованих карбахоліном, в шлунку щурів, яким упродовж 28 днів одночасно з омепразолом вводили верапаміл, зростала до 6,20±0,18 см.вод.ст.·хв, або на 23,3% ($p<0,05$), у порівнянні з щурами, яким упродовж 28 днів вводили лише омепразол. Індекс стимульованої карбахоліном моторної активності також зростав і складав 967,2±39,8 ум.хв, що було на 19,1% ($p<0,05$) більше у порівнянні з групою щурів, яким упродовж такого ж часу вводили один омепразол.

Тривале введення омепразолу позначалося і на АТФазній активності актоміозину шлунка: Mg^{2+}, Ca^{2+} -АТФазна та $K^+(EGTA)$ -АТФазна активності актоміозину шлунка зменшувались на 61% ($p<0,05$) та 23% ($p<0,05$), відповідно (рис. 2, 3).

В групі щурів, яким упродовж 28 днів одночасно з омепразолом вводили верапаміл, Mg^{2+}, Ca^{2+} -АТФазна активність актоміозину шлунка зростала у порівнянні з групою щурів, яким упродовж такого ж часу вводили один омепразол. Проте вона не досягала контрольних значень і залишалася меншою за контрольні значення на 39% ($p<0,05$) (рис. 2). Що стосується $K^+(EGTA)$ -АТФазної активності актоміозину шлунка щурів, яким упродовж 28 днів одночасно з омепразолом вводили верапаміл, то вона статистично достовірно не змінювалася порівняно з групою щурів, яким упродовж такого ж часу вводили один омепразол (рис. 3).

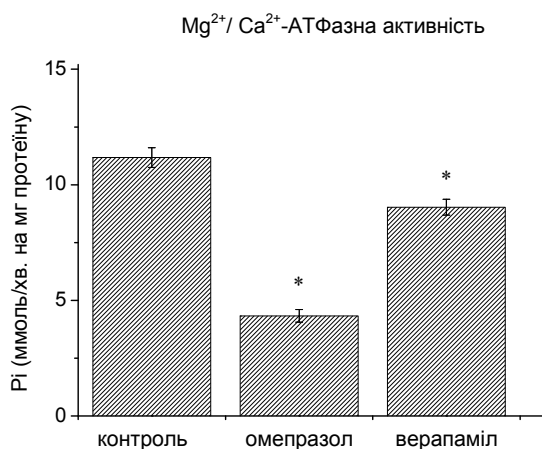


Рис. 2. $Mg^{2+}Ca^{2+}$ -АТФазна активність актоміозину гладеньких м'язів шлунка щурів ($M\pm m$):
контроль – щури контрольної групи ($n=10$)

2 група – щури після 28 денного ведення омепразолу (14 мг/кг, внутрішньоочеревинно) ($n=10$);
3 група – щури після 28 денного одночасного ведення омепразолу (14 мг/кг, внутрішньоочеревинно) та верапамілу (0,5 мг/кг, внутрішньоочеревинно) ($n=10$);

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

Скорочення м'язів пов'язано з циклічною взаємодією голівки міозину з актином, що супроводжується процесом гідролізу АТФ в активному центрі міозину. Внаслідок вивільнення енергії під час гідролізу аденозинтрифосфату відбувається переміщення актинових і міозинових філаментів стосовно один одного. Регуляція цього процесу є досить складною і багатокомпонентною, включає такі компоненти сигнальних систем, як кальцій, кальмодулін, кальмодулін-кіназа, кіназа легких ланцюгів міозину [2, 5, 8, 12]. Оскільки зміна концентрації кальцію є пусковим етапом цього складного процесу, то порушення кальцієвого гомеостазу не може не сказатися на процесі скорочення і його основному механізмі – АТФазній активності. ІПП застосовують з терапевтичними цілями для лікування кислото-залежних захворювань ШКТ. Короткотривалою прийом ІПП не впливає на абсорбцію Ca^{2+} та Mg^{2+} в кишечнику, однак тривале їх

застосування веде до гіпокальцемії та гіпомагнемії. Порушення кальцієвого гомеостазу під впливом ОМ можна пояснити дисфункцією кальцій-чутливого рецептору (CaR) – основного сенсору екстраклітинного Ca^{2+} і регулятора кальцієвого гомеостазу. Активність CaR алостерично регулюється амінокислотами і рН [6]. Крім того, CaR приймає участь в регуляції цілого ряду інших процесів, зокрема виділення гастрину G-клітинами, секреція гідрохлоридної кислоти парієтальними клітинами шлунка, секреція і проліферація епітеліальних клітин ШКТ, процеси транспорту води через епітелій товстої кишки і диференціація колоноцитів. Тому зниження АТФазної активності комплексу скоротливих білків актоміозину гладеньких м'язів шлунка можна пояснити зниженням внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} через дисфункцію CaR , що виникає при зменшенні секреції кислоти під впливом омепразолу.

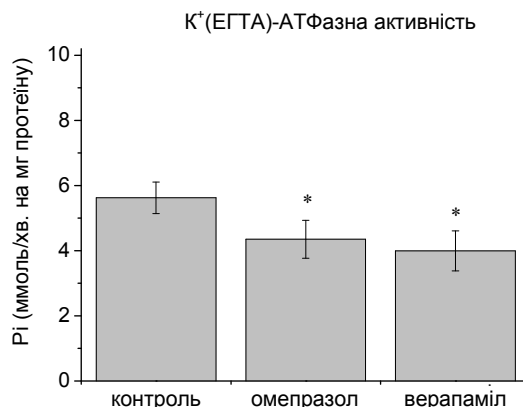


Рис. 3. К⁺-АТФазна активність актоміозину гладеньких м'язів шлунка щурів (M±m):
контроль – щури контрольної групи (n=10)

2 група – щури після 28 денного ведення омепразолу (14 мг/кг, внутрішньоочеревинно) (n=10);
 3 група – щури після 28 денного одночасного ведення омепразолу (14 мг/кг, внутрішньоочеревинно)
 та верапамілу (0,5 мг/кг, внутрішньоочеревинно) (n=10);

* – p<0,05 у порівнянні з контролем.

Тобто, зменшення АТФазної активності актоміозину під впливом омепразолу може бути пояснено комплексним впливом препарату на транспорт катіонів Ca²⁺ і Mg²⁺, що виникає через зміну секреції гідрохлоридної кислоти в шлунку.

Також однією з причин порушення моторики та функціонування актоміозину може бути стійка гіпергастринемія, викликана тривалою гіпоацидністю шлункового соку за допомогою 28 денного введення омепразолу. Запобігання розвитку гіпергастринемії блокадою рН-чутливого CaR на гастрин-секретуючих G клітинах шлунку верапамілом посилює спонтанну та стимульовану скорочувальну активність гладеньких м'язів шлунку та збільшує Mg2+Ca2+-АТФазна активність актоміозину гладеньких м'язів шлунка. В зв'язку з цим перспективою подальших досліджень у цьому напрямку є з'ясування ефективності верапамілу на моторику шлунку у хворих з гіпоацидністю шлункового соку з супутньою патологією серцево-судинної системи, яким показані препарати з антиангінальною, антиаритмічною і гіпотензивною дією, такими як верапаміл та інші блокатори кальцієвих каналів.

Висновки:

1. Пригнічення шлункової секреції омепразолом упродовж 28-ми днів не впливає на частоту спонтанних скорочень в шлунку щурів, проте зменшує амплітуду їх скорочень на 79,7% (p<0,01) та індекс моторної активності – на 10,3% (p<0,05). При цьому суттєво послаблюється моторна реакція шлунка на карбахолін: амплітуда скорочень і індекс стимульованої моторної активності зменшувались на 64,3% (p<0,01) та 36,8% (p<0,05), відповідно.

2. Тривале введення омепразолу позначалося і на АТФазній активності актоміозину шлунка: Mg2+,Ca2+-АТФазна та K+(EGTA)-АТФазна активності актоміозину шлунка зменшувались на 61% (p<0,05) та 23% (p<0,05), відповідно.

3. Після 28-ми денного сумісного введення омепразолу та блокатора кальцієвих каналів L-типу верапамілу спонтанна та стимульована моторна активність шлунка була сильнішою у порівнянні з групою щурів, яким вводили лише омепразол: амплітуда спонтанних скорочень зростала на 13,8% (p<0,05), а індекс спонтанної моторної активності мав тенденцію до зростання; амплітуда скорочень, стимульованих карбахоліном, зростала на 23,3% (p<0,05), а індекс стимульованої карбахоліном моторної активності – на 19,1% (p<0,05).

4. В групі щурів, яким упродовж 28 днів одночасно з омепразолом вводили верапаміл, Mg2+,Ca2+-АТФазна активність актоміозину шлунка зростала у порівнянні з групою щурів, яким упродовж такого ж часу вводили один омепразол, проте вона не досягала контрольних значень і залишалася меншою за контрольні значення на 39% (p<0,05); K+(EGTA)-АТФазна активність актоміозину шлунка статистично достовірно не змінювалася порівняно з групою щурів, яким упродовж такого ж часу вводили один омепразол.

Список використаних джерел

1. Мороз В.М. Экспериментальная модель кальцийзависимых аритмий сердца / В.М. Мороз, Т.Н. Липницкий, В.А. Козловский // Ukrainian Journal of Cardiology. – 2006. – www.rgl.kiev.ua/cardio_/2006/4/moroz.htm.
2. Bitar K.N. Aging and Neural Control of the GI Tract V. Aging and gastrointestinal smooth muscle: from signal transduction to contractile proteins // Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. – 2003. – V. 284. – P. G1–G7.
3. Bitar K.N. Aging and GI smooth muscle fecal incontinence: is bioengineering an option // Exp Gerontol. – 2005. – V. 40. – P. 643–649.
4. Bitar K.N., Greenwood-Van B., Saad R., Wiley J.W. Aging and gastrointestinal neuromuscular function: insight from within and outside the gut // Neurogastroenterol Motil – 2011. – V. 23. – P. 490-501.
5. Bonnevier J., Arner A. Actions downstream of cyclic GMP/protein kinase G can reverse protein kinase C-mediated phosphorylation of CPI-17 and Ca2 sensitization in smooth muscle // J Biol Chem. – 2004. – V. 279. – P. 28998–29003.
6. Feng J., Petersen C.D., David H. Coy D.H. et al Calcium-sensing receptor is a physiologic multimodal chemosensor regulating gastric G-cell growth and gastrin secretion // PNAS. – 2010. – V.107, N 41. – P. 17791-17796.
7. Fiske C, Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem. 1925. – V. 66. – P. 375-400.
8. Ito M., Nakano T., Erdodi F., Hartshorne D.J. Myosin phosphatase: structure, regulation and function // Mol Cell Biochem. – 2004. – V. 259. – P. 197–209.
9. Lopes G.S., Ferreira A.T., Oshiro M.E., Vladimirova I., Jurkiewicz N.H., Jurkiewicz A., Smaili S.S. Aging-related changes of intracellular Ca² stores and contractile response of intestinal smooth muscle // Exp Gerontol. – 2005. – V. 40. – P. 543-549.
10. Prochniewicz E., Thompson L.V., and Thomas D.D. Age-Related Decline in Actomyosin Structure and Function // Exp Gerontol. – 2007. – 42. – N 10. – P. 931-938.
11. Sobieszek A. Preparation and properties of vertebrate smooth-muscle myofibrils and actomyosin / A. Sobieszek, R. Bremel // Eur. J. Biochem. – 1975. – Vol. 55. – C. 49–60.
12. Somara S., Bashlari D., Gilmont R.R., Bitar K.N. Real-time dynamic movement of caveolin-1 during smooth muscle contraction of human colon and aged rat colon transfected with caveolin-1 cDNA // Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. – 2011. – V. 300. – P. G1022–G1032.
13. Tezuka A., Ishihata A., Aita T., Katano Y. Aging-related alterations in the contractile responses to acetylcholine, muscarinic cholinergic receptors and cholinesterase activities in jejunum and colon of the male Fischer 344 rats // Exp Gerontol. – 2004. – V. 39. – P. 91–100.

Надійшла до редколегії 26.05.14

С. Пилипенко, докторант, О. Шелюк, канд. биол. наук, Ю. Цейслер, канд. биол. наук,
Н. Нурищенко, д-р биол. наук,
Т. Береговая, д-р биол. наук
КНУ имени Тараса Шевченко, Киев

ВЛИЯНИЕ БЛОКАДЫ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ L-ТИПА НА МОТОРИКУ ЖЕЛУДКА У КРЫС В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ОМЕПРАЗОЛА

Установлено, что после 28-дневного угнетения секреции гидрохлоридной кислоты в желудке крыс омепразолом частота спонтанных сокращений в желудке не изменялась, однако амплитуда спонтанных сокращений и индекс спонтанной моторной активности уменьшались на 79,7% ($p < 0,01$) и 10,3% ($p < 0,05$), соответственно. Также достоверно ослаблялась моторная активность желудка, стимулированная карбахолином, и уменьшались Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФазная и K^+ (EGTA)-АТФазная активности актомиозина гладких мышц желудка. В группе крыс, которым в течение 28 дней одновременно с омепразолом вводили блокатор рН-чувствительного рецептора гастринных клеток верапамил, спонтанная и стимулированная моторная активность желудка была сильнее в сравнении с группой крыс, которым вводили один омепразол. При этом показатели моторики не достигали контрольных значений. Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФазная активность актомиозина возросла, а K^+ (EGTA)-АТФазная активность не изменялась в сравнении с группой крыс, которым вводили один омепразол. Так как верапамил существенно предотвращает развитие гипергастринемии, сделан вывод о том, что гипергастринемия является только одним из механизмов нарушения моторики желудка после длительного введения омепразола.

Ключевые слова: желудок, моторика, актомиозин, АТФаза, омепразол, верапамил.

S. Pilipenko, PhD., O. Shelyuk, PhD., Yu. Tseykler, PhD., N. Nurishchenko, DSc., T. Beregova, DSc.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

THE INFLUENCE OF CALCIUM CHANNEL BLOCKADE L-TYPE ON GASTRIC MOTILITY IN RATS WITH LONG-TERM ADMINISTRATION OF OMEPRAZOLE

It was established that after 28 days of blockade of gastric acid secretion by omeprazole frequency of spontaneous contractions in the stomach unchanged, and the amplitude of spontaneous contractions and spontaneous motor activity index decreased by 79,7% ($p < 0,01$) and 10,3% ($p < 0,05$), respectively. Also gastric motor activity induced carbacholin was significantly weakened and activities of Mg^{2+} , Ca^{2+} -ATPase and K^+ (EGTA)-ATPase of actomyosin of gastric smooth muscle were decreased. In the group of rats that within 28 days were administered simultaneously omeprazole and the blocker of pH-sensitive receptor of G-cells verapamil, spontaneous and stimulated gastric motor activity was stronger compared to the group of rats which were administered omeprazole alone. But the motility parameters did not reach control values. Mg^{2+} , Ca^{2+} -ATPase activity of actomyosin increased, and K^+ (EGTA)-ATPase activity did not change compared with rats injected with omeprazole alone. Since verapamil significantly prevents the development of hypergastrinemia, we concluded that hypergastrinemia is just one of the mechanisms of gastric motility disturbances after prolonged administration of omeprazole.

Key words: stomach, motility, actomyosin, ATPase, omeprazole, verapamil.

УДК 597.6(477)

Р. Світін, асп., П. Кілочицький, д-р біол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ГЕЛЬМІНТОФАУНА МАСОВИХ ВИДІВ БЕЗХВОСТИХ АМФІБІЙ (AMPHIBIA: ANURA) НА ТЕРИТОРІЇ НПП "КАРМЕЛЮКОВЕ ПОДІЛЛЯ"

На території НПП "Кармелюкове поділля" проаналізована гельмінтофауна 28-и особин 4-х видів амфібій. Визначено 6 видів гельмінтів, що належать до трьох систематичних груп: Nematoda (3 види), Trematoda (2 види), Acanthocephala (1 вид).

Ключові слова: гельмінтофауна, безхвості амфібії, нематоди, трематоди, акантоцефали.

Вступ. Національний природний парк "Кармелюкове поділля" створений указом президента України № 1057 від 16 грудня 2009 року. З часу створення та до 2009 року на території національного парку земноводні майже не вивчалися. Для з'ясування стану популяцій амфібій з 2013 року розпочато комплексні дослідження, що включають визначення чисельності, щільності та особливостей біології кожного виду. Першим кроком стало визначення видового складу та попереднього аналізу стабільності популяцій амфібій, із залученням широковживаного методу – вивчення їх паразитофауни [1,2]. Найбільш масовими на території Вінницької області є зелені жаби (рід *Pelophylax*) – переважно озерна та їстівна, а також зелена ропуха [3]. Озерна жаба поширена від території Франції до східної частини Казахстану. В Україні вид зустрічається майже на всій території, обираючи для себе біотопи з відкритим простором: береги річок, озер, ставків, дренажні канали, водойми відстійники тощо [3]. Найбільш повні дослідження щільності і чисельності в Україні проведені лише на території Карпат [4] та Криму [5], згідно яких вид є досить розповсюдженим і при маршрутних обліках зустрічається у кількості від кількох десятків до сотень на кілометр маршруту. Жаба їстівна є таксоном гібридогенного походження, має морфологічні риси обох батьківських форм і спільний ареал розповсюдження. В Україні мешкає на більшій частині території у басейнах великих річок. У виборі біотопів віддає перевагу ставкам, заводям річок,

озерам, мілководним канавам, уникаючи відкритих просторів великих річок. Спеціальні дослідження стосовно щільності популяцій цього виду на території України фактично не проводилися, однак було встановлено що частка їстівної жаби коливається від 10,5% до 24% у популяціях жаб роду *Pelophylax* [3]. Зелена ропуха є широко розповсюдженим видом на території Європи, Азії та північної частини Африки. На території України є звичайним видом у населених пунктах [3].

Спеціальних досліджень по зараженості гельмінтами земноводних на території сучасного НПП "Кармелюкове поділля" раніше не проводилося. На даний час наявні лише загальні дані з гельмінтофауни амфібій у визначниках та монографіях [6,7].

Матеріали та методи. На даному етапі досліджень на території НПП "Кармелюкове поділля" визначено 4 види амфібій: жаба озерна – *Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771; жаба їстівна – *Pelophylax esculentus* Linnaeus, 1758; кумка червоночерева – *Bombina bombina* Linnaeus, 1761; ропуха зелена – *Bufo viridis* Laurenti, 1768. Двадцять чотири особи зелених жаб: 11 *P. esculentus* та 13 *P. ridibundus*, 3 особи *B. viridis* та 1 *B. bombina* були використані для гельмінтологічних досліджень. Визначення амфібій проводили за допомогою визначника "Амфібії України" [3]. Матеріал збирали у липні-серпні 2013 р. Гельмінти вилучали за загальноприйнятою методикою повного гельмінтологічного розтину – на наявність гельмінтів обстежували всі органи і

тканини тварин. Виявлених нематод та скреблянок промивали у фізіологічному розчині та фіксували 70% етанолом, доведеним до температури кипіння. Трематод перед фіксацією заливали гарячою водою, а потім фіксували у 70% етанолі. Визначення таксономічної приналежності паразитів проводили за допомогою визначника "Гельминты амфибий фауны СССР" [7]. Статистичні показники зараженості визначали за загальноприйнятими методиками; для кожного виду паразитів підраховували середню, мінімальну та максимальну інтенсивність інвазії (кількість особин паразита в одній особині хазяїна для заражених екземплярів хазяїв), екстенсивність інвазії (частка заражених особин хазяїв у дослідженій вибірці), та індекс рясності (середня кількість паразитів в одній особині хазяїна у дослідженій вибірці з урахуванням також і незаражених екземплярів).

Результати та їх обговорення. У досліджуваному матеріалі виявлені гельмінти, що належать до трьох систематичних груп: *Acanthocephala* (1 вид), *Nematoda* (3 види) та *Trematoda* (2 види, визначені лише до роду).

Також були виявлені трематоди на стадіях церкарій та метацеркарій у кишечнику, м'язах та порожнині тіла. Оскільки визначення трематод на личинкових стадіях є проблематичним, у даній роботі ми свідомо обмежилися визначенням дорослих паразитів.

Зараженими гельмінтами виявилися 19 з 24 обстежених зелених жаб. Загальна зараженість озерної жаби (8 особин з 13) виявилась дещо нижчою у порівнянні з їстівною жабою (9 з 11 особин), та складає 65% проти 82% відповідно. У озерній жабі виявлені лише 2 види гельмінтів: скреблянки *Acanthocephalus ranae* (у кишечнику) та трематоди роду *Haematolechus* (у легенях). У жабі їстівній, окрім попередніх двох видів були виявлені трематоди роду *Gorgoder* (у сечовому міхурі) та нематода *Icosiella neglecta* – у м'язах на черевній стороні тіла.

Найбільш масовою у обох видів жаб виявилась скреблянка – *A. Ranae*; натомість нематода *I. neglecta* була представлена єдиним екземпляром у одній особині *P. esculentus*. Статистичні показники зараженості озерної та їстівної жаб представлені у таблицях 1 і 2.

Таблиця 1. Показники зараженості гельмінтами *P. ridibundus*

Види паразитів	Екстенсивність інвазії, %	Інтенсивність інвазії, екз. (середня (мінімальна–максимальна))	Індекс рясності
<i>Acanthocephalus ranae</i>	77	3,2 (1-11)	2,50
<i>Haematolechus</i> sp.	30	1,75 (1-2)	0,54

Таблиця 2. Показники зараженості гельмінтами *P. esculentus*

Види паразитів	Екстенсивність інвазії, %	Інтенсивність інвазії, екз. (середня (мінімальна–максимальна))	Індекс рясності
<i>Acanthocephalus ranae</i>	64	3 (1-5)	1,90
<i>Icosiella neglecta</i>	9	1	0,09
<i>Haematolechus</i> sp.	18	2,5 (1-4)	0,45
<i>Gorgoder</i> sp.	18	3 (1-5)	0,55

Всі три особини зелених ропух виявилися зараженими двома видами нематод – *R. rubrovenosa* (у легенях) та *Cosmocerca* sp. (у кишечнику). Статистичні по-

казники зараженості зеленої ропухи представлені у таблиці 3. Єдина досліджена особина червоночеревої кумки виявилась вільною від зараження гельмінтами.

Таблиця 3. Показники зараженості гельмінтами *B. Viridis*

Види паразитів	Екстенсивність інвазії, %	Інтенсивність інвазії, екз. (середня (мінімальна–максимальна))	Індекс рясності
<i>Rhabdias rubrovenosa</i>	100	7,3(3-10)	7,3
<i>Cosmocerca</i> sp.	100	7,3(2-10)	7,3

Результати досліджень та їх обговорення. Усі виявлені у зелених жабах гельмінти є типовими широко специфічними паразитами амфібій, що й раніше діагностувалися у представників роду *Pelophylax*, та належать до біогельмінтів. Наявність різноманітних біогельмінтів свідчить про широкий спектр живлення жаб та сприятливі умови в екоотопі. Однак, відсутність таких типових геогельмінтів, як нематоди роду *Cosmocerca*, *Oswaldocruzia* та *Rhabdias* вказує на несприятливі умови для циркуляції паразитів без участі проміжних хазяїв, що може бути пояснено "розірваністю" чи недостатньою чисельністю популяції зелених жаб у досліджуваному регіоні.

Натомість, обстежені особини зеленої ропухи виявилися зараженими лише геогельмінтами, життєвий цикл яких відбувається без участі проміжних хазяїв, що свідчить про достатню щільність популяцій, але й про звужений спектр живлення.

Загалом видове різноманітність гельмінтів у обстежених жабах та ропусі на території НПП "Кармелюкове поділля" є істотно нижчим порівняно з дослідженнями на інших територіях [8,9,10], де у кожному виді амфібій зареєстровано щонайменше по 20 видів паразитів. Відсутність гельмінтів у єдиній обстеженій особині кумки не дозволяє зробити певні висновки,

тому в подальшому плануються дослідження з використанням більшої кількості особин.

Висновки:

На території НПП "Кармелюкове поділля" проаналізована гельмінтофауна 28-и особин 4-х видів амфібій. Виділено 6 видів гельмінтів з трьох систематичних груп: *Nematoda* (3 види), *Trematoda* (2 види), *Acanthocephala* (1 вид). Дані, отримані у результаті проведених досліджень, є попередніми.

Список використаних джерел

- Кузьмін Ю., Химин М., Світін Р. Паразитичні нематоди та акантоцефали жаби гостромордої *Rana arvalis* та жаби їстівної *Pelophylax kl. esculentus* з НПП "Прип'ять-Стохід" // Науковий вісник національного парку "Прип'ять-Стохід". Випуск 2. Луцьк, Ініціал, 2012. – С. 17-23.
- Однокурцев В. А., Седалищев В. Т. Гельмінтофауна сибірської лягушки (*Rana amurensis* Boulenger, 1886) якути, її половозроста і сезонна изменчивість // Поволжский экологический журнал. – 2008. – №2. – С. 112-119.
- Писанець Є.М. Земноводні України (посібник для визначення амфібій України та суміжних країн). – К.: Видавництво Раєвського, 2007.
- Щербак Н. Н., Щербань М. И. Земноводные и пресмыкающиеся Украинских Карпат. – К.: Наукова думка, 1980.
- Щербак Н.Н. Земноводные и пресмыкающиеся Крыма. – К.: "Наукова думка", 1966.
- Мазурович Б. Н. Паразитические черви амфибий. Их взаимоотношения с хозяевами и внешней средой. – Киев: Изд-во Киевского университета, 1951.

7. Рыжиков К. М., Шарпило В. П., Шевченко Н. Н. Гельминты амфибий фауны СССР. – Москва: Наука, 1980.
8. Vashetko E., Siddikov B. The effect of ecology of toads on the distribution of helminths // Tr. J. of Zoology. – 1999. – № 23. – P. 107-110.
9. Чихляев И., Файзулин А., Замалетдинов Р., Кузовенко А. // Праці українського герпетологічного товариства. – 2009. – №2. – С.102-109.

10. Зарипова Ф., Байрамгулова Г., Юмагулова Г., Янтурин С. Гельминтофауна амфибий в условиях Башкирского Зауралья // Вестник ОГУ. – 2008. – №12. – С.86-88.

Надійшла до редколегії 30.05.14

Р. Свитин, асп. П. Килочицкий, д-р біол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ГЕЛЬМИНТОФАУНА МАСОВЫХ ВИДОВ БЕЗХВОСТЫХ АМФИБИЙ НА ТЕРРИТОРИИ НПП "КАРМЕЛЮКОВЕ ПОДИЛЛЯ"

На территории НПП "Кармелюкове подилля" проанализирована гельминтофауна 28-и особей амфибий 4-х видов. Определены 6 видов гельминтов, относящихся к трём систематическим группам: Nematoda (3 вида), Trematoda (2 вида), Acanthocephala (1 вид).

Ключевые слова: гельминтофауна, безхвостые амфибии, нематоды, трематоды, акантоцефалы.

R. Svitin, PhD stud, P. Kilochytsky, DSc.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

HELMINTHOFAUNA OF DOMINANT SPECIES OF ANURAN AMPHIBIANS (AMPHIBIA: ANURA) FROM THE TERRITORY OF NP "KARMELUKOVE PODILLA"

Helminthofauna of 28 specimens of 4 species of amphibians were investigated from the territory of NP "Karmelukove podilla". Generally 6 species of helminths assigned to three systematic groups: Nematoda (3 species), Trematoda (2 species), Acanthocephala (1 species) were identified.

Key words: helminthofauna, anurans, nematodes, trematodes, acanthocephalans.

УДК 612. 1 + 612. 2.

Л. Корінчак, канд. біол. наук
Уманський державний педагогічний університет ім. Павла Тичини, Умань

СТАН КАРДІОРЕСПІРАТОРНОЇ СИСТЕМИ У ДІВЧАТОК 8-12 РОКІВ В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ПОРИ РОКУ

Досліджено особливості кардіореспіраторної системи у дівчаток 8-10-12 років у різні пори року. Упродовж усіх сезонів відмічено зменшення змін показників ЧСС та АТ зі збільшенням віку. Найнижчі показники АТ_с спостерігається влітку в усіх вікових групах дівчаток, а найвищі показники АТ_с та АТ_д припадають на весну, що вказує на розвиток літньої фази ростових зсувів. Відмічено значні збільшення життєвої ємності легень у 8-річних дівчаток, які починаються вже взимку, продовжуються навесні і особливо інтенсивні влітку. Такі ж зміни, але з меншою інтенсивністю, відбуваються у 10-річних дівчаток, і мають тенденцію до збільшення у 12-річних. Виявлені сезонні збільшення наприкінці навчального року індексу Кетле, зросту та маси тіла протягом навчального року. Це свідчить про суттєві вікові зміни сезонного біоритму маси тіла, особливості у дівчаток молодшого шкільного віку.

Ключові слова: серцево-судинна система, дихальна система, частота серцевих скорочень, індекс Кердо, індекс Руф'є.

Вступ. Адаптація організму до швидкоплинних умов зовнішнього середовища багато в чому залежить від біологічних ритмів. Знання їх особливостей дозволяє правильно побудувати правильні режими праці та відпочинку, режими тренувань спортсменів, підтримати високу життєву активність, досягти піку спортивної форми саме під час змагань [1, 2, 4, 7, 8, 9, 13]. При цьому дихальна та серцево-судинна системи (ССС), як найбільш важливі, чутливо реагують на всі сезонні зміни [5, 6, 10]. Сучасні дані частіше всього констатують факт наявності біологічних ритмів, але не враховують вікових змін.

Пошук в PubMed за пошуковими словами "кардіореспіраторна система і сезонні зміни" (cardiorespiratory system and seasonal changes або cardiorespiratory system and season-to-season variation) показав наявність 4-х робіт: 3 – російських авторів і 1 в англomовному журналі, яка стосувалась сезонним змінам в кардіореспіраторній системі у спортсменів при різних навантаженнях [14]. Що стосується російських робіт: перша робота присвячена сезонним змінам у кардіореспіраторній системі жителів півночі Росії [12]. В другій роботі аналізуються сезонні зміни у підводників з декомпресійною хворобою [11]. В третій роботі мова йде про профілактику захворювань у дітей в екстремальних умовах Півночі [3]. Взагалі, достатньо багато робіт присвячено впливу екстремальних кліматичних умов на кардіореспіраторну систему у дітей; є роботи, присвячені сезонним змінам у роботі кардіореспіраторної системи у хворих дітей. Що стосується здорових дітей мо-

лодшого віку, роботи щодо стану кардіореспіраторної системи в залежності від пори року відсутні. Разом з тим, такі роботи необхідні для пояснення прцездатності та психо-фізіологічних показників в різні пори року, розробки норм фізичного навантаження з урахуванням стану кардіореспіраторної системи в різні пори року.

Метою роботи було оцінити кардіореспіраторну систему у дівчаток 8-10-12 років у залежності від пори року.

Об'єкт та методи досліджень. Обстежено 138 дівчаток середньої школи віком 8, 10 і 12 років. Саме у цей період відбувається інтенсивний розвиток організму дитини і організм входить у пубертатний період, який супроводжується значними змінами психофізіологічних і фізіологічних характеристик дітей, що відображається як на їхньому навчанні, так і на здоров'ї.

Для досягнення поставленої мети здійснювали антропометричні та функціональні дослідження фізичного розвитку і кардіореспіраторної систем, а також розраховували на їх основні інтегральні показники роботи організму, які дозволили оцінити функціональні стани та адаптивні властивості осіб, що обстежувалися. Так, антропометричні показники (довжину і масу тіла) вимірювали за допомогою стандартних інструментів за загальноприйнятими методиками. Для розкриття функціональних та резервних можливостей кардіореспіраторної системи дітей визначали зміни значень кардіоінтервалів, життєву ємність легень (ЖЄЛ), ваго-ростовий індекс Кетле (ІК), індекси Робінсона (ІР), Руф'є, пробу

Штанге (ПШ), теплінг-тест, м'язову силу на витривалість, рухову активність і добові енерговитрати. Для цього визначали частоту серцевих скорочень (ЧСС), артеріальний систолічний (АТ_с), діастолічний (АТ_д) та пульсовий тиски – з подальшим вирахуванням систолічного і хвилинного індексу Кердо. АТ вимірювали автоматичним тонометром МВО Digimed 16. Параметри системи дихання досліджували за допомогою спірографії. Реєстрували і розраховували ЖЄЛ та частоту, глибину і хвилинний об'єм дихання. Досліджували параметри: ЖЄЛ вдиху та видиху; резервний об'єм вдиху (РО) та ін.

Початкові і сезонні дослідження включали багаторазові обстеження однієї дитини 5 разів кожного дня упродовж тижня (5 днів) відповідно у вересні, в кінці жовтня, в кінці січня, в кінці березня та на початку червня. При всіх дослідженнях здійснювали хронометраж, аналіз ефективності успішності навчання, комплексну оцінку стану здоров'я за критеріями, розробленими НДІ гігієни дітей і підлітків НАМН України, та затвердженими наказом Міністерства охорони здоров'я № 387.

Отримані експериментальні дані було оброблено за допомогою статистичного пакету Microsoft Excell. Розраховували: середнє арифметичне (М); середньоквадратичне відхилення (δ); похибку середнього арифметичного (m); критерій достовірності Стюдента (t); коефіцієнт лінійної кореляції Пірсона (r), похибку (m_r) і критерій достовірності (t_r) цього коефіцієнту. При обробці даних використовувалися методи як параметричної, так і непараметричної статистики.

Результати дослідження та їх обговорення. Проведені спостереження показали, що не всі показники мали вірогідні зміни упродовж сезонів року. Тому увага сконцентрована саме на вірогідних змінах параметрів

дітей протягом року навчання. Зафіксовані сезонні зміни ІК, зросту та ваги дівчаток восени, взимку, навесні і влітку протягом року. У таблиці 1 наведені сезонні зміни ваго-ростового ІК у дівчаток 8-12 років протягом року навчання та дослідження. Для групи 8-річних дівчаток можна констатувати, що зріст вірогідно підвищується влітку наприкінці навчального року по відношенню до початку року. Вага теж вірогідно зростає у кінці відносно початку року. Щодо ІК можна сказати, що він також збільшується в кінці року відносно його початку, але не вірогідно, і така тенденція до збільшення ІК говорить про те, що у дівчаток 8 років зростає об'єм грудної клітки.

Відносно вікової характеристики дівчат 10 років, можна сказати, що у них дійсно збільшується вага наприкінці року, відбуваються позитивні, але невірогідні зміни зросту і, вірогідно, збільшується ІК, що говорить про значний ріст саме показника окружності грудної клітки (ОГК).

У дівчаток вікової характеристики 12 років спостерігаються вірогідні збільшення зросту в кінці навчального року, чи навіть за чверть до закінчення навчального року, а також незначне збільшення маси. Водночас слід зауважити, що маса взимку і весною вже набуває більшого значення, ніж вага восени і влітку. Це в свою чергу вказує на сезонність змін цієї фізичної характеристики, яка притаманна дорослому організму.

Щодо середніх значень ІК можна констатувати, що суттєвих змін в цій віковій групі дівчат не відбувається, але помічається його зменшення в кінці навчального року щодо до його початку, що також збільшення зросту у дівчат починає випереджати збільшення ОГК (табл. 1).

Таблиця 1. Сезонні зміни у антропометричних показниках у дівчаток 8-12 років

Статистичні показники	Осінь			Зима			Весна			Літо		
	Ріст, см	Маса, кг	ПКг/см	Ріст, см	Маса, кг	ПКг/см	Ріст, см	Маса, кг	ПКг/см	Ріст, см	Маса, кг	ПКг/см
Вік 8 р. (n=47)												
Середнє знач. (M±m)	131,58±0,77	28,36±0,65	219,38±6,25	132,47±0,73	29,17±0,62	219,95±3,94	133,37±0,76	29,89±0,61	224,11±3,63	133,84±0,70*	30,37±0,60*	227,20±3,69
Станд. відх. (StD)	3,36	2,85	27,28	3,19	2,72	17,20	3,23	2,68	15,84	3,08	2,62	16,08
Медіана (Me)	131,00	29,80	224,00	132,00	30,40	225,30	133,00	31,20	230,20	133,00	31,60	234,10
Нижн. кв. (25%)	129,00	25,00	196,70	130,00	26,20	201,50	131,00	28,10	216,10	132,00	28,60	218,30
Верхн. кв. (75%)	134,00	30,10	230,70	135,00	30,80	232,30	135,00	31,80	235,50	136,00	32,20	237,50
Вік 10 р. (n=41)												
Середнє значення (M±m)	139,53±1,42	35,15±0,98	249,70±4,93	141,37±1,28	35,86±0,96	258,18±7,13	142,32±1,24	36,56±0,95	258,47±4,17	142,79±1,20	37,19±0,80*	259,19±4,36*
Станд. відх. (StD)	6,20	4,26	21,48	5,57	4,20	31,08	5,39	4,14	18,16	5,21	3,47	19,02
Медіана (Me)	136,00	Дек. max	Дек. max	142,00	33,20	Дек. max	143,00	36,90	258,00	143,00	37,80	Дек. max
Нижн. кв. (25%)	134,00	32,50	238,90	137,00	33,20	240,90	137,00	33,30	243,10	138,00	34,60	243,80
Верхн. кв. (75%)	144,00	37,30	260,80	146,00	38,00	268,70	146,00	38,80	266,70	147,00	39,10	266,40
Вік 12 р. (n=50)												
Середнє значення (M±m)	146,55±1,21	41,65±1,01	282,26±5,30	148,64±1,283	42,17±1,10	280,07±4,59	149,77±1,32*	42,22±1,20	279,43±5,47	150,55±1,41*	41,70±1,00	280,26±4,80
Стан. відх. (StD)	5,65	4,74	24,88	6,72	5,17	21,52	6,64	5,64	25,64	5,52	4,71	22,50
Медіана (Me)	144,00	39,15	268,75	150,00	42,95	286,30	150,00	40,30	275,45	147,00	39,30	271,60
Нижн. кв. (25%)	142,00	37,40	262,90	143,00	37,10	258,90	144,00	36,60	257,40	144,00	38,00	264,70
Верхн. кв. (75%)	152,00	46,20	300,60	155,00	46,50	300,00	157,00	47,50	303,20	155,00	46,30	299,30

В таблиці 2. наведені сезонні зміни показників ССС у дівчаток 8-12 років протягом року дослідження. У групі 8-річних дітей протягом навчального року майже не спостерігається вірогідних змін всіх цих параметрів. Спостерігається лише тенденція до зменшення АТ влітку відносно осені, а також АТс влітку відносно осені. Вірогідно наприкінці року зменшується лише величина АТ_д. Протягом року відбуваються коливання показників і ЧСС і АТ. Разом з тим, всі параметри взимку і восени зростають, відносно таких же значень навесні та літом,

що також є адаптивною ознакою пристосування до холодної пори року. ЧСС протягом усього періоду досліджень майже незмінна.

Що стосується групи 10-річних дівчат, то в ній помічені вірогідні зменшення АТс влітку відносно осені, що вказує на те, що організм дівчат починає сповільнювати темп свого росту, тобто це фаза дослідження закінчення першого зростового зсуву. Що стосується ЧСС, то вона в цій групі теж залишається майже незмінною протягом року. Усе це вказує на можливість

розвитку адаптаційних пристосувань організму завдяки змінам характеристик судин.

Для дівчат 12-ти років також відмічається вірогідне зменшення АТс влітку відносно осені і значне збільшення цього параметру взимку та навесні відносно

осені. АТд при цьому має тенденцію до зниження цьому, але таке зниження невірогідне. Відносно параметрів ЧСС слід зауважити, що найбільш значущі зміни відбуваються в період зими і весни відносно осені, а найменші – влітку відносно осені (табл. 2).

Таблиця 2. Зміни показників ССС у 8-12 річних дівчат протягом року досліджень

Статист. показники	Осінь			Зима			Весна			Літо		
	ЧСС, уд/хв	АТс	АТд	ЧСС уд/хв	АТс	АТд	ЧСС, уд/хв	АТс	АТд	ЧСС, уд/хв	АТс	АТд
Вік 8 р. (n=47)												
Середнє знач.(M±m)	86,21±0,69	97,89±1,17	62,37±0,89	86,26±0,76	99,21±1,16	63,16±0,78	86,47±0,58	99,21±1,44	63,68±0,84	86,11±0,69	96,58±1,27	60,26±0,89
Ст.відх.(StD)	2,99	5,09	3,86	3,30	5,07	3,42	2,55	6,29	3,67	3,02	5,54	3,90
Медіана(Me)	86,00	100,0	60,00	88,00	100,0	65,00	87,00	100,0	65,00	87,00	95,00	60,00
Нижн.кв.(25%)	83,00	95,00	60,00	84,00	95,00	60,00	86,00	95,00	60,00	85,00	90,00	55,00
Верхн.кв.(75%)	89,00	100,0	65,00	89,00	100,0	65,00	88,00	100,0	65,00	88,00	100,0	65,00
Вік 10 р. (n=41)												
Середнє знач.(M±m)	79,28±0,67	101,67±1,71	62,78±1,09	80,17±0,42	101,67±1,62	62,50±0,73	79,06±0,45	101,39±1,39	61,39±0,97	78,06±0,33	96,67±1,34*	62,22±0,60
Ст.відх.(StD)	2,82	7,28	4,61	1,79	6,86	3,09	1,92	5,89	4,13	1,39	5,69	2,56
Медіана(Me)	82,00	102,5	62,50	80,00	102,5	65,00	79,00	100,0	60,00	78,00	95,0	60,00
Нижн.кв.(25%)	78,00	95,00	60,00	79,00	100,0	60,00	78,00	100,0	60,00	77,00	90,00	60,00
Верхн.кв.(75%)	82,00	110,0	65,00	82,00	105,0	65,00	80,00	105,0	65,00	79,00	100,0	65,00
Вік 12 р. (n=50)												
Середнє знач.(M±m)	76,64±0,67	101,14±1,68	65,91±1,38	74,41±0,89	103,41±1,20	65,91±1,02	73,86±0,95	102,95±1,12	64,55±0,98	75,82±0,34	96,82±0,77*	62,50±0,72
Ст.відх.(StD)	3,61	7,86	6,48	4,17	5,65	4,79	4,44	5,27	4,61	1,59	3,63	3,36
Медіана(Me)	77,00	100,0	65,00	76,00	102,50	65,00	76,00	102,5	65,00	76,00	97,00	60,00
Нижн.кв.(25%)	76,00	95,00	60,00	72,00	100,0	65,00	70,00	100,0	60,00	75,00	95,00	60,00
Верхн.кв.(75%)	78,50	110,0	70,00	78,00	110,0	70,00	77,00	105,0	70,00	77,00	100,0	65,00

Відповідно показників, зафіксованих у таблиці 3, спостерігаються зміна показників ЖЕЛ у дівчаток протягом року дослідження. У дівчаток 8-річного віку бурхливо збільшується ЖЕЛ, починається цей процес взимку і триває до літа. Вірогідно, що Р при цьому менше 0,01 і збільшується весною і влітку.

Для десятирічного віку характерно вірогідне підвищення вже влітку відносно осені. І нарешті, у дівчат

12-ти років дійсно відбувається бурхливий другий ріст ЖЕЛ, який починається навесні і суттєво збільшується влітку. Це, мабуть, відповідає другому зростовому зсуву який як у дівчаток як правило починається раніше і супроводжується становленням організму дівчаток як організму здорової дорослої людини.

Таблиця 3. Сезонні зміни показників життєвої ємності легень (мл) у 8-12 річних дівчат

Статист. показники	Осінь	Зима	Весна	Літо
Вік 8 р. (n=47)				
Середнє знач.(M±m)	1240,00 ±10,54	1276,84±12,23*	1320,53±13,79**	1360,53±12,53**
Станд. відх. (StD)	45,95	40,70	45,52	37,19
Медіана (Me)	1250,00	1280,00	1310,00	1360,00
Нижн.кварц.(25%)	1210,00	1250,00	1300,00	1300,00
Верхн.кварц.(75%)	1260,00	1300,00	1360,00	1380,00
Вік 10 р. (n=41).				
Середнє знач. (M±m)	1682,22 ±19,40	1703,33 ±18,36	1728,33 ±17,90	1750,56 ±17,44*
Станд. відх. (StD)	119,78	114,38	118,38	116,44
Медіана Me)	1715,00	1755,00	1780,00	1800,00
Нижн.кварц. (25%)	1600,00	1640,00	1650,00	1670,00
Верхн.кварц.(75%)	1780,00	1790,00	1810,00	1840,00
Вік 12 р. (n=50).				
Середнє знач. (M±m)	1919,27 ±23,15	1951,44 ±24,36	1985,21 ±26,30*	2042,07±32,12**
Станд. відх. (StD)	86,6	114,2	117,4	117,3
Медіана (Me)	1925	1960	1980	2020
Нижн.кварц. (25%)	1850	1880	1900	1980
Верхн.кварц.(75%)	2000	2050	2090	2140

Щодо групи дівчаток 8-ми років (табл. 4) можна сказати, що у них не спостерігається змін індексу ІР протягом всього року дослідження.

Однак відбувається значне вірогідне його зменшення у дівчаток 10-ти років, а також значне зменшення

влітку відносно осені у дівчаток 12-ти років. Отже, ми можемо припустити, що ІР, є одним з інтегральних критеріїв, який дозволяє оцінити ступінь чи початок других зростових змін, які супроводжуються формуванням організму дитини як дорослого організму.

Таблиця 4. Сезонні зміни показників індексу Робінсона у 8-12 річних дівчат

Статист. показники	Осінь	Зима	Весна	Літо
Вік 8 р. (n=47)				
Середнє значен.(M±m)	83,94±0,94	79,38±4,07	83,95±0,94	83,08±0,87
Станд.відхил.(StD)	4,10	17,75	4,09	3,79
Медіана (Me)	83,00	83,00	84,60	83,60
Нижн.кварцет (25%)	81,70	78,50	79,60	80,10
Верхн.кварцет.(75%)	88,00	87,60	87,80	86,20
Вік 10 р. (n=41)				
Середнє значен.(M±m)	80,98±1,66	81,54±1,48	79,78±1,22	76,56±1,50*
Станд.відхил.(StD)	7,06	6,30	5,16	6,35
Медіана (Me)	82,55	82,45	79,50	76,05
Нижн.кварцет (25%)	78,00	79,00	78,00	70,20
Верхн.кварцет.(75%)	86,10	86,10	82,00	80,00
Вік 12 р. (n=50)				
Середнє значен.(M±m)	78,24±1,34	79,44±1,12	79,20±1,02	76,14±0,86*
Станд.відхил.(StD)	6,32	5,21	4,80	4,05
Медіана (Me)	77,35	78,00	78,90	76,45
Нижн.кварцет (25%)	74,00	76,00	76,50	73,40
Верхн.кварцет.(75%)	83,60	82,90	82,90	78,00

Дослідження теплінг-тесту у дівчаток не виявила його вірогідних змін протягом навчального року.

У дівчаток 8-12 років ПШ виявляла приблизно такі ж зміни, а саме у віковій групі 8-ми років весною вони вірогідно збільшені відносно осені, а влітку ця тенденція до збільшення ще виразніша відносно осені, зими і весни. У дівчаток 10-ти років (табл. 5) відбуваються вірогідні суттєві зміни взимку, а надто весною і літом.

Специфіка змін у дівчаток 12-ти років вказує на початок стрімкого їх за параметрами ПШ. Вони не лише доганяють у розвитку хлопців, і навіть перевершують їх. Це свідчить, що ПШ і для дівчаток є хорошим індикатором основних впливів на антропометричний розвиток дитини, а також вказує на те, що таку пробу можна використати як показник інтенсифікації розвитку кардіореспіраторної системи і антропометричних характеристик дівчаток і хлопців цієї вікової категорії.

Таблиця 5. Зміни показників проби Штанге у 8-12 річних дівчат

Статист. показники	Осінь	Зима	Весна	Літо
Вік 8 р. (n=47)				
Середнє знач.(M±m)	28,26±2,24	31,95±2,20	33,11±2,11*	37,74±1,71**
Станд.відхил.(StD)	9,79	9,58	9,22	7,46
Медіана (Me)	27,00	33,00	35,00	39,00
Нижн.кварц.(25%)	20,00	22,00	28,00	32,00
Верхн.кварц.(75%)	32,00	40,00	40,00	44,00
Вік 10 р. (n=41)				
Середнє знач.(M±m)	33,89±1,22	37,72±1,03*	41,83±0,87**	40,28±1,11**
Станд. відхил. (StD)	5,17	4,39	3,68	4,73
Медіана (Me)	34,50	38,50	42,00	40,00
Нижн.кварц.(25%)	30,00	35,00	40,00	38,00
Верхн.кварц.(75%)	36,00	40,00	44,00	44,00
Вік 12 р. (n=50)				
Середнє знач.(M±m)	34,55±0,95	41,27±1,27**	43,91±0,93**	43,86±0,91**
Станд. відхил.(StD)	34,55	0,95	41,27	1,27
Медіана (Me)	35,00	42,50	44,00	44,00
Нижн.кварцет.(25%)	30,00	38,00	42,00	40,00
Верхн.кварц.(75%)	38,00	46,00	46,00	46,00

Примітка: P * – <0,05 при порівнянні показника із вихідним рівнем (при вимірюваннях восени); ** <0,01; ***<0,001

Вважаємо, що наявні закономірності стану життєдіяльності дитячого організму слід використовувати в процесі навчання дітей різних вікових категорій, поперше, для того, щоб відповідним чином змінювати процес навчання з метою обмеження психічних та психологічних навантажень на дитину, тому що додаткові сезонні впливи можуть суттєво вплинути на параметри здоров'я дітей, а по-друге слід застосовувати додаткові чи особисті корекції функціонального стану дітей для того, щоб привести параметри їхнього організму до норми, що дозволяло б оптимально сприймати всі учбові, фізичні, психологічні та соціальні навантаження, які відповідають можливостям учнів цієї вікової групи.

Висновки:

У 8-річних дівчаток наприкінці навчального року (початок літа) збільшуються зріст та маса тіла, а масоростовий індекс Кетле має лише тенденцію до збільшення, що свідчить про зростання об'єму грудної клітки.

У 10-річних дівчаток наприкінці навчального року (початок літа) спостерігається тенденція до збільшення росту, вірогідно зростають маса тіла та індекс Кетле, що говорить про значний ріст показника окружності грудної клітки. У 12-річних дівчаток маса тіла взимку і весною набуває більшого значення, ніж восени і влітку. Це вказує на сезонність змін цієї фізичної характеристики, що притаманно дорослому організму. Упродовж всіх сезонів відмічено зменшення змін показників ЧСС та АТ зі збільшенням віку. Найнижчі показники АТ_с спостерігаються влітку в усіх вікових групах дітей, а найвищі показники АТ_с та АТ_д припадають на весну, що вказує на розвиток літньої фази ростових зсувів. Відмічено значні збільшення ЖЕЛ у 8-річних дівчаток, які починаються вже взимку, продовжуються навесні і особливою інтенсивністю влітку. Такі ж зміни, але з меншою інтенсивністю, відбуваються у 10-річних дівчаток, і мають тенденцію до збільшення у 12-річних.

Список використаних джерел

- Алякринский, Б. С. Биологические ритмы и организация жизни человека в космосе / Б. С. Алякринский // Проблемы космической биологии. – М.: Наука, 1983. – Т. 46. – 248 с.
- Глазирін, І. Адаптація юнаків з різними темпами морфо-функціонального розвитку до фізичних навантажень / І. Д. Глазирін, М. М. Середенко // Фізіологічний журнал. – 1999. – Т. 5. № 6. – С. 20-26.
- Голикова О.И. Профилактика нарушения здоровья у детей в условиях экстремального Севера / О.И. Голикова // Гигиена и санитария. – 1998. – № 3. – С. 18-20.
- Горго, Ю. П. Ритмический характер суточной активности организма и прогнозирование надежности работы человека / Ю. П. Горго // Культура здоровья, як предмет освіти: зб. наук.-метод. праць. – Херсон, 2000. – С. 29-32.
- Горго, Ю. П. Роль человеческого фактора в системах "средств-человек-машина" / Ю. П. Горго, Ю. А. Белов. – К., 1988. – 18 с.
- Іванюра, І. О. Адаптаційні можливості функціональних систем організму учнів середнього шкільного віку при тривалих фізичних навантаженнях: автореф. дис. ... докт. біологічних наук : 03.00.13 / Іван Олександрович Іванюра. – К., 2001. – 36 с.
- Казначеев, В. П. Очерки теории и практики экологии человека / В. П. Казначеев. – М.: Наука, 1983. – 256. [2] с.
- Комаров, Ф. И. Хрономедицина – новое направление в медико-биологической науке и практике / Ф. И. Комаров, Ю. А. Романов, Н. И. Моисеева // Хронобиология и хрономедицина / под ред. Ф. И. Комарова. – М.: Медицина, 1989. – С. 5-16.
- Комаров, Ф. И. Хронобиологическая структура показателей углеводного гомеостаза и ее адаптивные возможности на различных этапах постнатального онтогенеза крыс : автореф. дис.... канд. биол. наук / Рос. университет дружбы народов. – М., 1989. – 16 с.
- Медведев, В. А. О критериях оценки функционального состояния учащихся и студенческой молодежи / В. А. Медведев // Физическая культура. – 2000. – № 2. – С. 11-14.
- Погорелов И.А., Шиманович Е.Г., Черненко А.И., Антропов А.Н. Биоритмологические аспекты подводников с декомпрессионным заболеванием / И.А. Погорелов, Е.Г. Шиманович, А.И. Черненко, А.Н. Антропов // Военно-медицинский журнал. – 1991. – № 9. – С. 57-59.
- Рощевский М.П., Евдокимов В.Г., Овсов А.С., Варламова Н.Г. Сезонные изменения в параметрах кардиореспираторной системы у жителей Русского Севера / М.П. Рощевский, В.Г. Евдокимов, А.С. Овсов, Н.Г. Варламова // Физиология человека. – 1993. – Т. 19, № 6. – С. 44-50.
- Сергета, І. В. Біоритмологічні аспекти підвищення адаптації учнів до дії несприятливих факторів оточуючого середовища / І. В. Сергета // Вісник наукових досліджень. – 1995. – № 3. – 10 с.
- Koutedakis Y. Seasonal variation in fitness parameters in competitive athletes / Y. Koutedakis // Sports Med. – 1995. – Jun;19(6):373-92.

Надійшла до редколегії 12.06.14

Л. Коринчак, канд. биол. наук

Уманский государственный педагогический университет им. Павла Тичины, Умань

СОСТОЯНИЕ КАРДИОРЕСПИРАТОРНОЙ СИСТЕМЫ У ДЕВОЧЕК В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВРЕМЕНИ ГОДА

Исследованы изменения кардиореспираторной системы у девочек 8-10-12 лет в зависимости от времени года. Установлено Показаны сезонные увеличения конце учебного года ИК, роста и массы тела в течение учебного года. Это свидетельствует о существенных возрастных изменениях сезонного биоритма массы тела, особенности у детей младшего школьного возраста. На протяжении всех сезонов отмечено уменьшение изменений показателей ЧСС и АД с увеличением возраста, низкие показатели АТС наблюдается летом во всех возрастных группах детей, а самые высокие показатели АТС и АД приходятся на весну, что указывает на развитие летней фазы ростовых оползней. Отмечено значительные увеличения жизненной емкости легких в 8-летних девочек, которые начинаются уже зимой, продолжаются весной и особой интенсивностью летом. Такие же изменения, но с меньшей интенсивностью, происходят в 10-летних девочек, и имеют тенденцию к увеличению в 12-летних.

Ключевые слова: сердечно – сосудистая система, дыхательная система, частота сердечных сокращений, индекс Кердо, индекс Руфье.

L. Korinchak, PhD

Uman State Pedagogical University Pavlo Tichinu, Uman

THE STATE OF THE CARDIORESPIRATORY SYSTEM OF GIRLS DEPENDING ON THE SEASON

The changes in the cardiorespiratory system girls 8-10-12 years were explored depending on the season. Found: Showing seasonal increase at the end of the school year weight-heights – Index Kerdo, height and body weight during the school year. This show significant age-related changes in seasonal biorhythm body weight, especially in primary school children. During all seasons marked decrease in heart rate and changes in blood pressure with increasing age, the lowest values is observed in summer systolic blood pressure in all age groups of children, and the highest systolic blood pressure and diastolic blood pressure is observed in the spring, that is indicated the development of a summer growth phase shifts. It is marked an increase in lung capacity in 8-year-old girls which starts in the winter, spring and continues particularly intense in summer. Similar changes, but with less intensity, is occurred in 10-year-old girls, and tend to increase in the 12-year-olds.

Key words: cardio – vascular system, respiratory system, heart rate, index Kerdo, index Rufye.

УДК 616. 342-002. 44(043. 3)

А. Маркевич, асп., Т.Фалалєєва, д-р біол. наук,
Л.Богун, канд. біол. наук, О.Харченко, канд. біол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ВПЛИВ НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНОЇ ОРГАНІЧНОЇ СПОЛУКИ
НА БАЗАЛЬНУ ШЛУНКОВУ СЕКРЕЦІЮ У ЩУРІВ

Дослідити вплив нової низькомолекулярної органічної сполуки на базальну секрецію гідрохлоридної кислотності і пепсину та активність H^+ , K^+ -АТФази парієтальних клітин шлунка. На 40 білих лабораторних щурах було досліджено базальну секрецію методом перфузії ізольованого шлунка за Гхошем та Шільдом, дебіт пепсину та активність H^+ , K^+ -АТФази парієтальних клітин шлунка. Введення щурам низькомолекулярної органічної сполуки призводило до зниження досліджуваних показників. Досліджувана сполука зменшує базальну секрецію гідрохлоридної кислоти, дебіт пепсину, а також знижує активність H^+ , K^+ -АТФаз.

Ключові слова: низькомолекулярна органічна сполука, базальна секреція гідрохлоридної кислоти, пепсин, H^+ , K^+ -АТФаза.

Вступ. Базальна шлункова секреція відбувається за відсутності всіх видів стимуляції. Її коливання відображають добовий циркадний ритм секреції, вона максимальна ввечері (о 23 годині) і мінімальна вранці (від 5 до 11:00 год.), що пов'язане з секрецією мелатоніну та тонусом блукаючих нервів. Порушення регуляції шлункової секреції веде до ряду кислотозалежних захворювань, а саме гастроезофагеальної рефлюксної хвороби, пептичної виразки шлунка та дванадцятипалої кишки,

асоційованої або не асоційованої з *Helicobacter pylori*, та синдрому Золлінгера-Еллісона [1].

Сучасна терапія кислотозалежних захворювань заснована на використанні в клініці антисекреторних препаратів. Найбільш широко використовуються інгібітори H^+ , K^+ -АТФази, мембранозв'язаних ферментів парієтальних клітин слизової шлунка – похідні бензимидазолу (омепразол, лансопразол, пантопразол, рабепразол, езомепразол) і блокатори H_2 -гістамінових рецепторів.

© Маркевич А., Фалалєєва Т., Богун Л., Харченко О., 2014

Похідні бензимидазолу здатні досить швидко і ефективно знижувати активність H^+ , K^+ -АТФази, відповідно і секрецію кислоти, але при цьому володіють цілим рядом негативних побічних ефектів (морфо-функціональні порушення клітин слизової оболонки шлунка, онкогенні зміни і розвиток атрофічного гастриту, дисбалансу гормонів). Тривале застосування блокаторів призводить також до збільшення розміру, ваги і кількості парієтальних клітин, зменшення кількості головних клітин слизової оболонки шлунка і зниження синтезу мРНК пепсиногену. Основним негативним ефектом застосування інгібіторів протонної помпи є розвиток онкогенних процесів у СОШ [2].

Таким чином, незалежно від існуючої на сьогоднішній день терапії кислотозалежних захворювань, необхідними є розробка нових речовин з потенційними антисекреторними властивостями, вивчення їх фізичних, фізико-хімічних та біологічних властивостей і можливості їх застосування як потенційних лікарських засобів. Хімічним факультетом Московського державного університету імені М.В. Ломоносова була синтезована низькомолекулярна органічна сполука, що володіє антивиразковою дією [3, 4, 5]. Враховуючи посилений інтерес дослідників до вивчення механізмів базальної секреції, що пов'язано з тим, що саме гіперсекреція гідрохлоридної кислоти в міжтравний період є важливим фактором виразкоутворення [2, 6], метою роботи було дослідити вплив низькомолекулярної органічної сполуки (НМОС) (2-(2-гідроксифенокс)ацетил)-L-пролінату натрію на базальну секрецію гідрохлоридної кислоти і пепсину та активність H^+ , K^+ -АТФази парієтальних клітин шлунка щурів.

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження базальної шлункової секреції гідрохлоридної кислоти проводили на 40 білих нелінійних лабораторних щурах розведення віварію Навчально-наукового центру "Інститут біології" Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Тварини утримувалися на стандартному раціоні в умовах акредитованого віварію згідно "Стандартним правилам з упорядкування, обладнання та утримання експериментальних біологічних клінік (віваріїв)". Всі роботи з тваринами проводились з дотриманням нормативів Конвенції з біоетики Ради Європи 1997 року, Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей, відповідно до Закону України від 21.02.2006 № 3447-IV "Про захист тварин від жорстокого поводження" [7] та у відповідності з етичними нормами і правилами роботи з лабораторними тваринами [8]. Прилади, що використовувалися для наукових досліджень, підлягали метрологічному контролю.

Групи тварин:

1 група тварин – контроль. Щурам за 30 хвилин до спостереження базальної секреції кислоти внутрішньочеревинно (в/о) вводили 0,4 мл фізіологічного розчину на 200 г маси тіла – самці (20 тварин);

2 – основна група. Щурам за 30 хвилин до спостереження базальної секреції кислоти в/о вводили НМОС (2-(2-гідроксифенокс)ацетил)-L-пролінату натрію) в дозі 1 мг/кг, в об'ємі 0,4 мл на 200 г маси тварини – самці щурів (20 тварин).

Дослідження базальної шлункової секреції кислоти у щурів проводили методом перфузії ізольованого шлунка за Гхошем та Шільдом (1958) упродовж 120 хв [9]. Щурів наркотизували уретаном в дозі 1,15 г/кг в/о. У зібраних 10-хвилинних пробах електротитриметрично визначали кислотність перфузата за допомогою іоніметра ЕВ-74 з використанням 0,01 N розчину гідроксиду натрію (NaOH) та концентрацію пепсину колориметричним методом за Тін (1986). Кількість NaOH, що йшла на титрування перфузату в 10-ти хвилинній пробі, дорівнювала дебіту соляної кислоти, виділеної шлунком за даний період часу. Після цього обчислювали дебіт кислоти, яка виділилася впродовж 120 хвилин базальної шлункової секреції. Після визначення концентрації пепсину в перфузаті обчислювали дебіт пепсину шлункового соку, що виділявся за 10 хв та 120 хв відповідно.

Парієтальні клітини виділялись за описаною методикою (ферментативне відщеплення загальної фракції клітин слизової оболонки шлунка з наступним ультрацентрифугуванням на сахарозо-фікольному градієнті) [10].

Фракцію плазматичних мембран отримували на градієнті сахарози (30%) за рекомендаціями [11]. Активність H^+ , K^+ -АТФази оцінювали спектрофотометрично за рівнем неорганічного фосфату, який утворюється в результаті проходження ферментативної реакції [12].

Всі кількісні та якісні показники, зареєстровані в журналі досліджень підлягали статистичній обробці за допомогою пакету програм Statistica 8.0. Отримані результати досліджень перевіряли на нормальність розподілу за допомогою W тесту Шапіро-Вілка. Оскільки дані були параметричні, то для їх порівняння використовували t-критерій Ст'юдента для незалежних вибірок, рівень значущості становив $p < 0,05$. Дані представляли у вигляді середнього значення (M) і похибки середнього (m).

Результати досліджень та їх обговорення. В результаті проведених досліджень встановлено, що у щурів контрольної групи дебіт кислоти базальної шлункової секреції становив $55,96 \pm 6,15$ мкмоль/120 хв. Базальна секреція гідрохлоридної кислоти при введенні НМОС знизилась на 27,07% ($p < 0,05$). Таким чином, досліджувана субстанція ефективно зменшує базальну секрецію гідрохлоридної кислоти (рис 1).

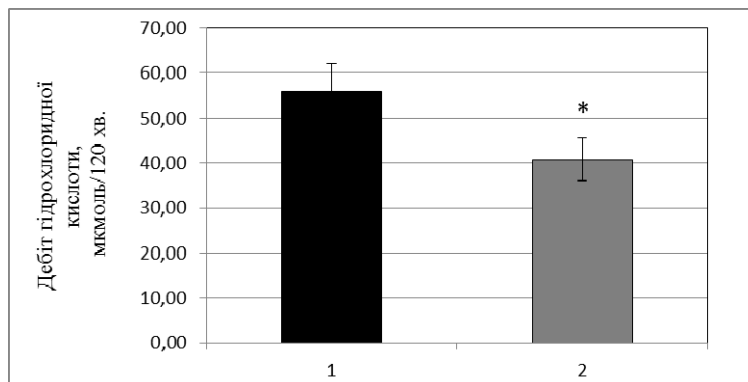


Рис. 1. Дебіт гідрохлоридної кислоти в шлунку щурів за умов введення низькомолекулярної органічної сполуки КУД 259 (1мг/кг, в/о) ($M \pm m$, $n = 20$ у кожній групі)

1 – контроль, 2 – КУД 259.

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

Базальний рівень протеолітичного ферменту пепсину в шлунку щурів становив 2685 ± 210 мкг/120 хв. При введенні НМОС дебіт пепсину зменшився на 38% ($p < 0,05$) (рис.2).

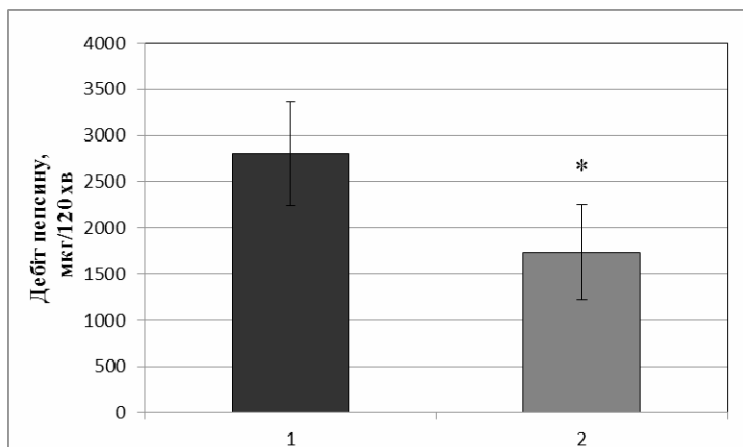


Рис. 2. Дебіт пепсину в шлунку щурів за умов введення низькомолекулярної органічної сполуки КУД 259 (1мг/кг, в/о) ($M \pm m$, $n = 20$ у кожній групі)

1 – контроль, 2 – КУД 259.

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

Отримані результати свідчать про здатність досліджуваної речовини зменшувати агресивний кислотний фактор виразкоутворення, адже йому здебільшого надається визначальна роль у механізмах формування пептичної виразки. Вважається, що протеолітичний фермент пепсин також є складовим кислотно-пептичного фактора. Однак роль пепсину у процесах виразкоутворення оцінюється неоднозначно. На думку переважної більшості дослідників, виразкоутворення зумовлюється протеолітичною активністю пепсину, при цьому гідрохлоридний кислоті відводиться роль активатора ферментативної активності [13]. З іншого боку, хоча пепсин і належить до

провідних факторів виразкоутворення, сам по собі він не здатен зумовити виникнення пептичної виразки [14].

Для встановлення механізму дії досліджуваної речовини на секрецію кислоти в шлунку було досліджено дію НМОС на активність H^+, K^+ -АТФази в мембранних фракціях паріетальних клітин. Встановлено, що значення активності досліджуваного ферменту на фоні введення фізіологічного розчину становило 1,1 нмоль неорганічного фосфату/(хв.*мг білка). Використання досліджуваного препарату призводило до зниження активності H^+, K^+ -АТФази на 64% ($p < 0,05$), яка становила 0,4 нмоль неорганічного фосфату/(хв.*мг білка) (рис.3).

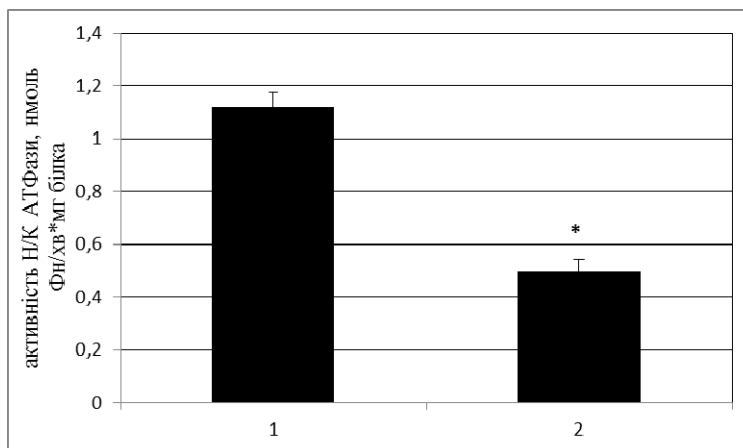


Рис. 3. Активність H^+, K^+ -АТФази в шлунку щурів за умов введення низькомолекулярної органічної сполуки КУД 259 (1мг/кг, в/о) ($M \pm m$, $n = 20$ у кожній групі).

1. контроль, 2. КУД259.

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

Механізм пригнічення активності H^+, K^+ -АТФази під впливом КУД 259 може бути пов'язаний з прямим зв'язуванням досліджуваної сполуки з ферментом, що обумовлено наявністю фенольної групи в молекулі. Так, встановлено інгібування секреції кислоти під впливом галоїдної кислоти (3,4,5-триоксibenзойної кислоти), що зустрічається в природі в чаї, дубовій корі, дубильних екстрактах, та має фенольну структуру [15]. Також в роботах по вивченню флуоресцентних спектрів альбуміну сироватки крові встановлено здатність фенольних

кислот зв'язуватися з триптофановими залишками на поверхні молекул білка [16]. Подібні властивості фенольні сполуки виявляли і до протонної помпи [16, 17]. Іншими дослідниками були також виявлені антисекреторні властивості поліфенольної сполуки кверцетину, яка пригнічувала базальну секрецію кислоти в шлунку щурів [18, 19]. Варто відзначити, що в основі хімічної структури досліджуваної сполуки окрім фенольної групи лежить похідне амінокислоти проліну. В наших попередніх дослідженнях було встановлено, що пролін-

вмісний пептид Pro-Gly-Pro його метаболіти Gly-Pro і Pro-Gly пригнічують шлункову секрецію кислоти у щурів [20]. Отже, антисекреторні властивості молекули КУД259 пов'язані з поєднанням у її структурі фенольної та пролінової функціональних груп.

Висновки:

Отримані результати свідчать, що досліджувана сполука ефективно зменшує базальну секрецію гідрохлоридної кислоти, дебіт пепсину, а також знижує активність H^+, K^+ -АТФази.

Список використаних джерел

1. Передерий В.Г. Современныепредставления о леченииязвеннойболезни с точки зрения принципов в доказательной медицины / В.Г. Передерий, С.М. Ткач, О.В. Швец // Сучасна гастроентерологія. – 2002. – №3. – С. 18-20.
2. A model for integrative study of human gastric acid secretion / I.M. Joseph[et.al] // J. Appl. Physiol. – 2003. – Vol. 94. – № 4. – P. 1602-1618.
3. Использование новых низкомолекулярных органических соединений в профилактике вызванных аспирином эрозивно-язвенных поражений у крыс / К.В. Кудрявцев [и др.] // Проблемы экологической та медичної генетики і клінічної імунології. – 2012. – № 5(113). – С.458-465.
4. Скринінг синтезованих низкомолекулярних органічних сполук щодо їх ефективності в лікуванні виразок на лабораторних тваринах / О.П. Гаділія [та ін.] // Світ медицини та біології. – 2013. – № 3(39). – С.16-20.
5. Скринінг синтезованих низкомолекулярних органічних сполук щодо їх ефективності в профілактиці уражень слизової оболонки шлунка / А.О. Маркевич [та ін.] // Вісник проблем біології та медицини. – 2013. – № 3, том 1 (102). – С.116-121
6. Bittencourt P.F. Gastro duodenal peptic ulcer and Helicobacter pylori infection in children and adoles cents / P.F. Bittencourt [et.al] // J Pediatr. – 2006. – № 82. – P.325-334.
7. ЗУ от 21.02.2006 № 3447-IV "Про защитуживотных от жестокого обращения". 2006.
8. Guide for the Care and Use of LaboratoryAnimals. – Washington DC: National AcademyPress, 1996.

А. Маркевич, асп., Т. Фалалеева, д-р біол. наук, Л. Богун, канд. біол. наук, О. Харченко, канд. біол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ВЛИЯНИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ОРГАНИЧЕСКОГО СОЕДИНЕНИЯ НА БАЗАЛЬНУЮ ЖЕЛУДОЧНУЮ СЕКРЕЦИЮ У КРЫС

Исследовать влияние нового низкомолекулярного органического соединения на базальную секрецию гидрохлориднойкислоты, пепсина и активность H^+, K^+ -АТФазы париетальных клеток желудка. На 40 белых лабораторных крысах было исследовано базальную секрецию методом перфузии изолированного желудка по методу Гхоша и Шильда, дебит пепсина и активность H^+, K^+ -АТФазы париетальных клеток желудка. Введение крысам низкомолекулярного органического соединения приводило к снижению исследуемых показателей. Исследуемое соединение снижает базальную секрецию гидрохлоридной кислоты, дебит пепсина, а также снижает активность H^+, K^+ -АТФазы.

Ключевые слова: низкомолекулярное органическое вещество, базальная секреция гидрохлоридной кислоты, пепсин, H^+, K^+ -АТФаза.

A. Markevych, PhD stud., T. Falalyeyeva, DSc., L. Bogun, PhD., O. Harchenko, PhD.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

EFFECT OF LOW MOLECULAR WEIGHT ORGANIC COMPOUND ON BASAL GASTRIC ACID SECRETION IN RATS

To investigate the effect of a new low molecular weight organic compound on basal gastric acid secretion, pepsin secretion and activity of H^+, K^+ -ATPase of parietal cells of the stomach. It was investigated basal gastric acid secretion by isolated perfused stomach by method of Ghosh and Shields on the 40 white laboratory rats, secretion of pepsin and activity of H^+, K^+ -ATPase of parietal cells of the stomach. Injection of the low molecular weight organic compound to rats resulted in a decrease of these parameters. Test compound reduces basal acid secretion basal pepsin output and also reduces the activity of H^+, K^+ -ATPase.

Key words: low molecular weight organic compounds, basal gastric acid secretion, pepsin, H^+, K^+ -ATPase.

УДК 598.261.7:591.5

В. Яненко, канд. біол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ОСОБЛИВОСТІ РОЗПОДІЛУ ПОПУЛЯЦІЙ ПЕРЕПЕЛА (*COTURNIX COTURNIX L.*) В АГРОЦЕНОЗАХ УКРАЇНИ

Перепел є широко розповсюдженим видом на території України. Основними біотопами гніздування є відкриті території з невисокою рослинністю. До таких територій належать: луки (різних типів), пасовища та поля з різноманітними сільськогосподарськими культурами. Дослідження стосовно щільності та біотопічного розподілу популяцій перепела проводилися в період 2008-2013 рр. на території 42 районів 21 області України.

Ключові слова: перепел, агроценози, щільність гніздування, біотопічний розподіл.

Вступ. З кожним роком багато уваги приділяється комплексним дослідженням орнітофауни різних біотопів території України, проте частка досліджень, стосовно

9. Ghosh M.N. Continuous recording of acid gastric secretion in the rat. / M.N.Ghosh, H.O. Schild // Br JPharmacol Chemother. – 1958. – Vol.13, № 1. – P.54-61.

10. Клеточная локализация аденилатциклаза, стимулируемая гистамином / М.М. Таиров [и др.] // Биохимия. – 1983. – Т. 48, № 6. – С. 1035-1041.

11. Рыбальченко В.К. Структура и функции мембран / В.К. Рыбальченко, Н.М. Коганов // Практикум. – К., 1988. – С. 79-83.

12. Functional Expression of Gastric H,K-ATPase and Site-directed Mutagenesis of the Putative Cation Binding Site and the Catalytic Center / S.Asano [et.al] // J. B. C. – 1996. – Vol. 271, № 5. – P. 2740-2745.

13. Kageyama T. Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: structure, function, evolution, and development / T. Kageyama // Cell Mol Life Sci. – 2002. – Vol.59, № 2. – P.288-306.

14. Raufman J. P. Peptic activity and gastroduodenal mucosal damage / J. P. Raufman // Yale J BiolMed. – 1996. – Vol.69, № 1. – P.85-90.

15. Tani S. Effect of phenolic acids and related compounds on gastric acid secretion in the rat / S.Tani // ChemPharmBull (Tokyo). – 1978. – Vol.26, № 1. – P.309-311.

16. Nanjundaiah S.M. Gastro protective Effect of Ginger Rhizome (Zingiberofficinale) Extract: Role of Gallic Acid and Cinnamic Acid in H^+ , K^+ -ATPase/H. pylori Inhibition and Anti-Oxidative Mechanism / S.M.Nanjundaiah, H. N. M.Annaiah., S.M. Dharmesh // Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. – 2009. – Vol.2011.

17. Siddaraju M. N. Inhibition of gastric H^+ , K^+ -ATPase and Helicobacter pylori growth by phenolic antioxidants of Zingiberofficinale / M. N.Siddaraju, S. M. Dharmesh // Mol Nutr Food Res. – 2007. – Vol.51, № 3. – P.324-332.

18. Порівняльна характеристика гастропротекторної, антисекреторної і антиоксидантної дії кверцетину, омепразолу та ранітидину / М.Ю.Макачук [та ін.] // Фітотерапія. – 2010. – № 4. – P.26-29.

19. Beil W. Effects of flavonoids on parietal cell acid secretion, gastric mucosal prostaglandin production and Helicobacter pylori growth / W.Beil, C. Birkholz, K. F. Sewing // Arzneimittelforschung. – 1995. – Vol.45, № 6. – P.697-700.

20. Фалалеева Т. М. Влияние пролин-содержащих пептидов Pro-Gly-Pro и его метаболитов Gly-Pro и Pro-Gly на желудочную секрецию кислоты у крыс / Т. М.Фалалеева [та ін.] // Світ біології та медицини. – 2010. – № 2. – P.189-193.

Надійшла до редколегії 04.07.14

місцевості Криму і Карпат [11], однак дослідження стосовно екологічних аспектів його біології в Україні не проводили понад 50 років [13]. Відповідно постала нагальна потреба в дослідженні сучасного стану популяцій перепела на території України в різних придатних для гніздування біотопах. Одними з таких біотопів являються антропогенно змінені території. В даній роботі основну увагу буде зосереджено на розподілу популяцій даного виду в агроценозах.

Метою даної роботи було дослідити розподіл популяцій перепела в агроценозах України, як в одних із основних біотопів гніздування виду.

Матеріал роботи і методика досліджень. Матеріалами для написання даної роботи слугували дані особистих спостережень автора, зібрані протягом 2008-2013 років у 42 районах 21 областей України (Див рис. 1). В сумі за час дослідження було здійснено 95 польових виїздів, загальною тривалістю 140 днів та охоплено територію дослідження площею близько 890 км².

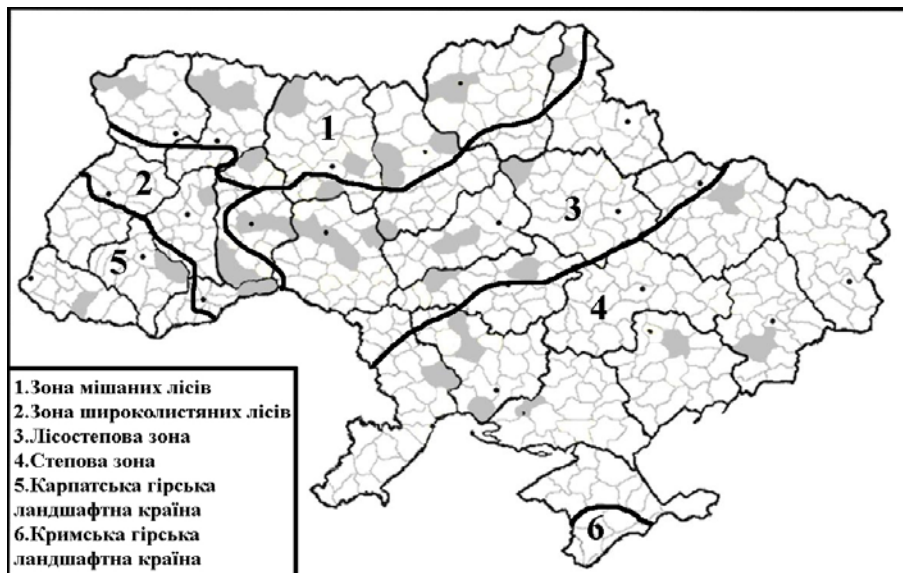


Рис.1. Карта з районами дослідження (зафарбовані)

Для зручності вся територія України була поділена на чотири фізико-географічні зони: зона мішаних лісів, зона лісостепу, зона степу, та дві гірські ландшафтні країни: Карпатську та Кримську [2;6]. Розподіл щільності гніздування популяцій птахів в агроценозах розглядався окремо для кожної зони. В роботі гніздові популяції перепела розглядалися як елементарні або локальні [8;9]

Для обліків щільності гніздування популяцій перепела використовувалися наступні методи орнітологічних досліджень, а саме: маршрутний метод обліку (з модифікаціями у окремих випадках), облік з однієї точки (абсолютний та відносний з модифікаціями) [1;3;8], для обробки отриманого матеріалу використовували загальноприйняті методи статистичного аналізу [5;12].

Результати та їх обговорення. За результатами багаторічних досліджень в усіх фізико-географічних зонах найвища щільність гніздових популяцій перепела спостерігалася в агроценозах. Відповідно постало питання, які із сільськогосподарських культур, є найбільш сприятливими для гніздування даного виду?! Дослідивши виокремлено сільськогосподарські культури в кожній із досліджуваних зон ми отримали щільність та відсоток гніздових популяцій перепела у різних типах сільськогосподарських угідь. Дані результати продемонстровані в таблицях 1-4 та на рисунках 2-5. Першою розглядалася зона степу. Щільність гніздових популяцій перепела в даній зоні подано в таблиці 1.

Таблиця 1. Щільність гніздування перепела в агроценозах зони степу

№ п/п	Щільність гніздування ос./км ²	Сільськогосподарські угіддя зони степу					
		Пшениця	Жито	Просо	Ячмінь	Землі під паром	Виноградники
1	min	6	7	4	3	4	3
2	$\bar{x}$	11,7 (n=25)	11 (n=22)	10,5 (n=27)	9,3 (n=30)	9 (n=18)	6,1 (n=19)
3	max	16	15	16	15	12	12

Саме в даній зоні відсоток гніздових популяцій виду був найвищим серед інших зон. Дані розподілу щільності гніздування представлені на рисунку 2.

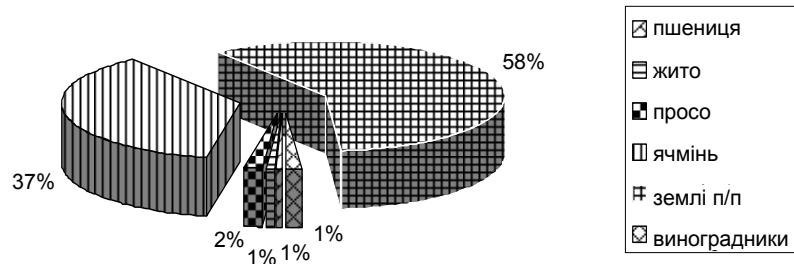


Рис. 2. Відсоток популяцій перепела у різних типах сільськогосподарських угідь в зоні степу

Як видно з рис. 2. найбільшу перевагу на сільськогосподарських угіддях в даній зоні перепел віддає землям під паром. В даному агроценозі зосереджено 58 % популяцій даного виду. Дещо менша частка гніздових популяцій зосереджується на площах засіяних

ячменем – 37%. На всіх інших досліджуваних біотопах щільність гніздування зосереджена рівномірно і не перевищує 2 %. На площах агроценозів в зоні лісостепу щільність гніздування перепела виглядала наступним чином (таб.2).

Таблиця 2. Щільність гніздування перепела в агроценозах зони лісостепу

№ п/п	Сільськогосподарські угіддя зони лісостепу	Щільність гніздування ос./км ²			
		min	$\bar{x}$	n	max
1	Пшениця	4	14,2	47	20
2	Жито	7	12,8	16	17
3	Овес	2	13,4	20	20
4	Люцерна	7	10	14	12
5	Просо	6	12,3	16	15
6	Ячмінь	9	12,4	14	15
7	Тритикале	8	12,2	16	15
8	Землі під паром	4	14,2	20	18
9	Ріпак	4	6,5	18	9
10	Гречка	2	10,3	18	18
11	Соя	6	9,7	16	15

Як і в попередній зоні досліджень так і тут, відсоток гніздових популяцій перепела найвища на площах земель під паром – 42 % (рис. 3). Значно менша частка спостерігається на площах засіяних соєю – 20 % та яч-

менем – 9 %. На всіх інших угіддях частка гніздових популяцій перепела є значно нижчою і коливається в межах від 1-7 %.

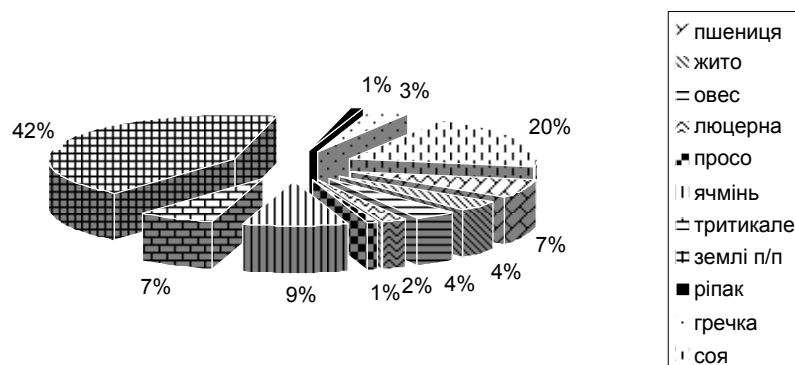


Рис. 3. Відсоток популяцій перепела у різних типах сільськогосподарських угідь в зоні лісостепу

Наступною досліджуваною зоною з високими показниками щільності гніздування в агроценозах стала Карпатська гірська ландшафтна країна. Дані щільності перепела на площах сільськогосподарських угідь даної зони представлені в таблиці 3.

Таблиця 3. Щільність гніздування перепела в агроценозах Карпатської гірської ландшафтної країни

№ п/п	Щільність гніздування ос./км ²	Сільськогосподарські угіддя Карпатської гірської ландшафтної країни				
		Пшениця	Тритикале	Жито	Ячмінь	Землі під паром
1	min	4	3	4	5	4
2	$\bar{x}$	15 (n=25)	13 (n=22)	12,6 (n=27)	12,7 (n=30)	14 (n=18)
3	max	18	18	17	19	19

В агроценозах даної ландшафтної країни розподіл щільності гніздування перепела був наступним рис. 4. Як бачимо з рис. 4., найвищий показник щільності гніздування популяцій даного виду припадає на площі засіяні жито – 65 %, наступним біотопом з високим показ-

ником щільності гніздування були землі під паром – 12 %. Близько 10 % популяцій зосередилося на площах засіяних ячменем та пшеницею і близько 4 % популяцій гніздиться на площах засіяних тритикале.

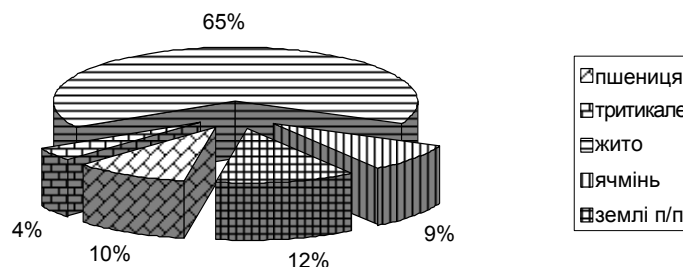


Рис. 4. Відсоток популяцій перепела у різних типах агроценозів Карпатської гірської ландшафтної країни

Щільність гніздових популяцій перепела в агроценозах зони мішаних лісів була найнижчою в порівнянні з іншими аналогічними територіям попередніх зон та представлена в таблиці 4.

Таблиця 4. Щільність гніздування перепела в агроценозах зони мішаних лісів

№ п/п	Щільність гніздування ос./км ²	Сільськогосподарські угіддя зони мішаних лісів				
		Жито	Тритикале	Овес	Гречка	Землі під паром
1	min	4	3	4	5	4
2	$\bar{x}$	8 (n=22)	18 (n=28)	7 (n=21)	6 (n=14)	13 (n=30)
3	max	18	18	17	19	19

Відсоток гніздових популяцій на площах з різними агроценозами зони мішаних лісів зображено на рис. 5. Як видно з рис. 5., найвища щільність гніздових популяцій припадає на площі засіяні тритикале – 47 %, на-

ступними йдуть площі земель під паром, тут щільність гніздування становить – 30 %. Рівну відсоткову частку заселяють перепела на площах засіяних жито та вівсом – 10% і 4 % на площах засіяних гречкою.

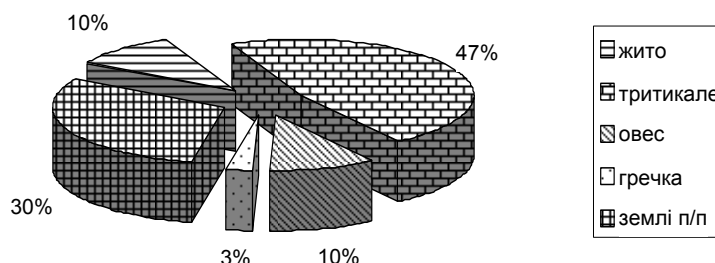


Рис. 5. Відсоток популяцій перепела на різних типах сільськогосподарських угідь в зоні мішаних лісів

Висновки:

Результати даного дослідження показують, що найбільший відсоток популяцій перепела в усіх досліджуваних зонах зосереджений на площах зернових сільськогосподарських угіддях таких як: ячмінь, соя, жито, тритикале. Разом з тим, великий відсоток щільності гніздування відтягують на себе і землі під паром, що пояснюється меншим антропогенним пресом (фактор турбування, хімізація, тощо). Водночас результати дослідження вказують на той факт, що визначальним фактором частки популяцій, що населяють дані біотопи є частка площ даних біотопів від загальної площі біотопу у даній досліджуваній фізико-географічній зоні. Відповідно, можна стверджувати що варіація щільності гніздування не є настільки великою, щоб впливати на частку популяцій в даному біотопі незалежно від його площі.

Список використаних джерел

- Боголюбов А. С. Методы учета численности птиц: маршрутные учеты: [методическое пособие для педагогов дополнительного образования и учителей] / А. С. Боголюбов. – М.: Экосистема, 1996. – 17 с.
- Географія України. Соціально-економічна з основами теорії: [посібник для абітурієнтів] / Й. Р. Гілецький. – Львів: ВНТЛ-Класика, 2002. – 192 с.

- Гулай В. І. Суутінкові та нічні обліки бекасів, деркачів та перепілок / В. І. Гулай, О. В. Гулай // Обліки птахів: підходи, методики, результати: матеріали школи по уніфікації методів обліку птахів у заповідниках України, смт. Івано-Франкове, 26-28 квітня 1995 р. – Львів-Київ, 1997. – С. 78.
- Корсак К. В. Основи сучасної екології / К. В. Корсак, О. В. Плахотнік // Навч. посіб. – 4-те вид., перероб. і допов., – К.: МАУП, 2004. – 340 с.
- Лакін Г. Ф. Биометрия: учебное пособие [для университетов и педагогических институтов] / Г. Ф. Лакін. – М.: Высшая школа, 1973. – 343 с.
- Маринич О. М. Фізична географія України: підручник / О. М. Маринич, П. Г. Шищенко. – К.: Знання, 2005. – 511 с.
- Одум Ю. Экология. – М.: Мир, 1986. – Т. 1. – 376 с.
- Равкин Е. С. Методические рекомендации по комплексному маршрутному учету птиц / Е. С. Равкин, Н. Г. Челенцев. – М.: Изд. ВНИИ Природа, 1990. – 33 с.
- Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика / П. Ф. Рокицкий. – Минск: Вышэйшая школа, 1973. – 320 с.
- Урбах В. Ю. Биометрические методы / В. Ю. Урбах. – М.: Наука, 1964. – 415 с.
- Фауна України: в сорока томах / [редакційна колегія І. Д. Білановський, В. Г. Касьяненко, О. П. Маркевич, І. Г. Підліпко]. – К.: Вид-во Академії наук УРСР, 1957. – Т. 4: Птахи / О. Б. Кістяківський. – 1957. – 432 с.
- Чубенко А. В. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием "Excel" / Чубенко А. В., Лопач С. Н., Бабич П. Н. – К.: Морион, 2000. – 320 с.
- Yanenko Vadim The population status of the Quail Coturnix coturnix in Ukraine: an update / Vadim Yanenko, Valentyn Serebryakov, Sergey Loparev // Bird Census News. – 2009. – № 22/1. – Р. 23 – 26.

В. Яненко, канд. биол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПОПУЛЯЦИЙ ПЕРЕПЕЛА (*COTURNIX COTURNIX* L.) В АГРОЦЕНОЗАХ УКРАИНЫ

Перепел широко распространенный вид на территории Украины. Биотопами гнездования которого являются открытые территории с невысокой растительностью. К таким территориям относятся: луга (разных типов), пастбища, и поля с разными сельскохозяйственными культурами. Исследования плотности и биотопического распределения популяций перепела проводились в период 2008-2011 гг. на территории 42 районов 21 области Украины.

Ключевые слова: перепел, агроценозы, плотность гнездования, биотопическое распределение.

V. Yanenko, PhD
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

DISTRIBUTION OF QUAIL (*COTURNIX COTURNIX* L.) POPULATIONS IN AGROCENOSSES OF UKRAINE

The common quail is rather wide-spread in Ukraine. Its main nesting biotopes are represented by open areas with low vegetation. These areas include: meadows (of various types), pastures, and agricultural lands with diverse crops. Population densities and biotopic distribution of the quail were studied during 2008-2010 in 42 districts of 21 regions of Ukraine.

Keywords: quail; agrocenosis, nesting density, biotopic distribution.

УДК 611.51:616-003.96:796.355.015

О. Яценко, ст. викл., В. Яценко, д-р мед. наук
Національний технічний університет України "Київський політехнічний університет", Київ

ОСОБЛИВОСТИ ЗМІН ПОКАЗНИКА МІНЛИВОСТІ ЕРИТРОЦИТІВ У СПОРТСМЕНІВ ПІД ЧАС ТРЕНУВАЛЬНОГО ПРОЦЕСУ

Встановлені зміни показника мінливості еритроцитів та співвідношення різних типів еритроцитів в системі "Ехіноцит – Стоматоцит" у спортсменів-хокеїстів та спортсменів-баскетболістів протягом тренувального процесу. Це свідчить про різний стан реактивних властивостей цілісного організму в залежності від певного фізичного та психоемоційного навантаження. Отримані дані можуть бути використані в практичній роботі тренерів при формуванні графіків тренувального процесу.

Ключові слова: еритроцити, тренувальний процес, фізичне та психоемоційне навантаження.

Вступ. В теперішній час, як відомо, в спортивній медицині значна увага приділяється питанням ретельного контролю впливу факторів тренувального процесу на організм спортсмена. Така увага пояснюється значним збільшенням кількості смертельних випадків під час тренувань, в тому числі й у молодих спортсменів [1-4]. В раніше проведених нами дослідженнях була показана можливість використання незабарвлених мазків крові для підрахунку показника мінливості еритроцитів (ПМЕ) з метою оцінки реактивних та адаптивних властивостей цілісного організму при фізичних та стресових навантаженнях військовослужбовців [5].

Метою даної роботи було проведення порівняльних досліджень змін ПМЕ у студентів-спортсменів баскетболістів та хокеїстів на протязі тренувального процесу.

Об'єкт, матеріали та методи досліджень. Нами проведено обслідування 15 студентів-хокеїстів збірної команди НТУУ "КПІ" впродовж 6 тижнів тренувального періоду та 7 студентів-баскетболістів на протязі 13-16 тижневої участі в спортивних змаганнях. Контрольну групу склали студенти, що не відвідують секційних занять зі спорту (14 осіб студентів НТУУ "КПІ" чоловічої статі). Середній вік обстежених студентів склав відповідно 18, 19 та 19 років у контрольній групі.

Об'єктом дослідження слугували незабарвлені мазки крові, в котрих за розробленим авторами даної роботи способом розраховувався ПМЕ [5]. Метод передбачає підрахунок для кожного пацієнта не менш ніж 400 еритроцитів з подальшою бальною оцінкою їх 15 різновидів, котрі поділялись на 5 груп в залежності від форми та змін поверхневої архітектури: 1 група – незмінені еритроцити (нормоцити), 2 група – помірно змінені (ехіноцити₁, ехіноцити₂, стоматоцити₁, стоматоцити₂, стоматоцити₃, мішенеподібні₁, овалоцити); 3 група – виражено змінені (ехіноцити₃, ехіноцити₄, стоматоцити₄, овалоцити); 4 група – сильно змінені (мішенеподібні₂, дрепаноцити, акантоцити). На основі таких розрахунків був обґрунтований кінцевий рівень змін ПМЕ:

при $0 < \text{ПМЕ} < 0,5$ – норма, при $0,5 < \text{ПМЕ} < 1,5$ – незначні зміни; при $1,5 < \text{ПМЕ} < 2,5$ – помірні зміни; при $2,5 < \text{ПМЕ} < 5,0$ – виражені зміни; при $\text{ПМЕ} > 5,0$ – важкі зміни). Імовірність різниці між порівнюваними групами оцінювали за t-критерієм Стюдента. Вірогідною вважали різницю між порівнюваними показниками при $P < 0,05$. Крім цього, з метою оцінки системних ознак отримуваних даних, використовували алгоритми теорії з підрахуванням у кожній групі досліджень відносної ентропії (H), максимальної ентропії ($H_{\max}$), організації системи (O), коефіцієнту стиснення інформації (h) та коефіцієнту надмірності (R%). Це дозволяло використовувати відповідні методи подальшого поглибленого статистичного аналізу отриманих результатів в залежності від системного стану вивчаємої ознаки: детермінована, квазидетермінована або імовірнісна [6].

Результати досліджень та їх обговорення. Отримані дані свідчать про те, що серед студентів контрольної групи у 9 осіб дані ПМЕ не перевищували значення 0,5, що дозволило віднести їх до групи "норма". В той же час, у 5 осіб ПМЕ склав $0,56 \pm 0,02$, що свідчить про "незначні зміни".

Досліджувана група спортсменів-баскетболістів за показником ПМЕ була поділена на три підгрупи.

А саме, високі значення ПМЕ (середні значення по I групі становили $7,02 \pm 0,361$ на другому тижні тренувань) на початку дослідження з поступовим зниженням до $1,114 \pm 0,21$; для II групи були характерні постійні скачки значень досліджуваного показника на протязі усього періоду обстеження спортсменів; у III групі на початку тренувань були високі значення ПМЕ ($9,08 \pm 0,16$) з подальшим поступовим зниженням до $1,09 \pm 0,2$.

Слід зазначити, що в цілому, в групі обстежених спортсменів виявлені помітні зміни показника, який ми вивчали, у порівнянні з контролем. Середні значення по групі I відрізнялися від контролю ($0,47 \pm 0,02$), який характеризує ПМЕ як "норма", і становлять $2,59 \pm 0,31$, що вказує на "виражені зміни" з боку форми еритроцитів.

Закінчення табл. 3

Дати обстеження	Дані еритрограм		N	H	Hmax	O	h	R%	Стан системи
	Тип еритроцитів	p _i							
24.10.2007	a	0,8148	7	0,8939	2,8074	1,9134	0,3184	68,1575	Детермінований
	b ₁	0,0625							
	b ₂	0,0672							
	b ₂ *	0,0032							
	b ₃	0,0205							
	c	0,0296							
	d	0,0022							
	Σ	1,0000							

Висновки:

1. Порівняльний аналіз застосування показника мінімальності еритроцитів для обстеження спортсменів–баскетболістів та хокеїстів на протязі тренувального процесу дозволив отримати індивідуальні закономірності змін в еритрограмі спортсменів під час звичайного тренувального процесу.

2. Встановлені зміни мають адаптивний характер. Розроблений метод дослідження деформабільних ознак клітинного складу еритроцитів може бути використаний як критерій оцінки реактивного та адаптивного стану спортсменів з метою корекції стресогенних та фізичних навантажень впродовж тренувального процесу.

3. Запропонований підхід може бути рекомендований для широкого впровадження в теоретичну та прикладну спортивну медицину з метою забезпечення необхідного рівня медичного обслуговування спортивних

заходів, що може сприяти запобіганню смертельних випадків у спорті під час змагань.

Список використаних джерел

1. Криворученко Е.В., Красницкая О.В. Внезапная смерть в спорте. 2011. Доступно с : <http://lib.sportedu.ru/Press/FVS/2011N1/p81-84.htm>,
2. Гаврилова Е.А. Внезапная смерть в спорте. // Международная научно-практическая конференция государств-участников СНГ по проблемам ФК и спорта: доклады пленарных заседаний. – Минск, 2010.
3. Макаров Л.М. Внезапная смерть в спорте: причины и пути профилактики. // Физкультура в профилактике, лечении, реабилитации. – 2009.
4. Maron B, MD; Joseph J. Doerer, BS; Tammy S. Haas, RN, David M. Tierney, MD; Frederick O. Mueller Sudden Deaths in Young Competitive Athletes Analysis of 1866 Deaths in the United States, 1980 – 2006 Circulation 2009; 119; 1085 – 1092.
5. Яценко В.П., Яценко О.В. Морфометричний метод оцінки стану червоної крові на основі програмно-апаратних засобів обробки відеозображень нефарбованих еритроцитів // Міжнародна науково-технічна конференція "ABIA-2001". – 2001.
6. Антомонов Ю.Г. Синтез математических моделей биологических и медицинских систем // Кадыров Х.К., Антомонов Ю.Г. – К.: Наукова думка, 1974.

Надійшла до редколегії 11.06.14

О. Яценко, ст. препод., В. Яценко, д-р мед. наук

Национальный технический университет Украины "Киевский политехнический университет", Киев

ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ У СПОРТСМЕНОВ В ХОДЕ ТРЕНИРОВОЧНОГО ПРОЦЕССА

Установлены изменения показателя изменчивости эритроцитов и соотношения различных типов эритроцитов в системе "Эхиноцит – Стоматоцит" у спортсменов–хоккеистов и спортсменов–баскетболистов в течение тренировочного процесса. Это свидетельствует о различном состоянии реактивных свойств целостного организма в зависимости от определенной физической и психо-эмоциональной нагрузки. Полученные данные могут быть использованы в практической работе тренеров при формировании графиков тренировочного процесса.

Ключевые слова: эритроциты, системе "Эхиноцит – Стоматоцит", тренировочный процесс, физическая и психоэмоциональная нагрузка

O. Yatsenko, art. teacher., V. Yatsenko. Dr. Med. Sc.

National Technical universitet Ukraine "Kyiv Polytechnic University" Kyiv

FEATURES CHANGES OF VARIATION ERYTHROCYTES SPORTSMEN IN THE TRAINING PROCESS

The rate of red blood cells variability and the ratio of different types of the red blood cells in Echinocyte-Stomatocyte system were found to change in hockey players in the course of training. This demonstrates the dependence of different status of reactive properties of the whole body on certain physical and psycho-emotional stress. The data obtained may be used by coaches in their practice when developing training schedules.

Key words: Echinocyte-Stomatocyte system, course of training, psycho-emotional stress.

УДК 577

Т. Андрійчук, канд.біол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

РЕДОКС-ЧУТЛИВІ ЛАНКИ РАДІАЦІЙНО-ІНДУКОВАНОГО АПОПТОЗУ

Встановлено внесок редокс-чутливих елементів сигнальної трансдукції в реалізацію радіаційно-індукованого апоптозу імуноткомпетентних клітин тимусу і селезінки щурів.

Ключові слова: сигнальна трансдукція, радіаційно-індукований апоптоз, тимус, селезінка.

Вступ. Відомо, що активні кисневі метаболіти (АКМ) беруть участь в ефективній реалізації фізіологічних аеробних метаболічних шляхів та активують розвиток деструкційних процесів, пов'язаних з дисбалансом окисно-відновного гомеостазу [1]. Зростання редокс-потенціалу клітин як маркера оксидативного стресу за дії іонізуючої

радіації супроводжується порушеннями функціонування ряду метаболічних систем та за певних умов сприяє активації процесів апоптотичної загибелі, зокрема виявлених в популяції імуноткомпетентних клітин лімфоїдних органів. Поряд з цим виконання системою АКМ внутрішньоклітинних месенджерних функцій при трансдукції сиг-

© Андрійчук Т., 2014

налів за реалізації радіаційно-індукованого апоптозу призводить до активації відповідних редокс-чутливих транскрипційних факторів, під контролем яких відбувається регуляція програмованої клітинної загибелі (апоптозу) та про-антиоксидантного потенціалу [2].

Метою роботи було оцінити вміст редокс-чутливих транскрипційних факторів, що опосередковують реалізацію програмованої клітинної загибелі, та ступінь активації відповідних респонсивних систем за умов окислювального стресу, індукованого дією іонізуючої радіації.

Матеріали і методи. Досліди проводили на нелінійних щурах-самцях масою 150-170 г. Для попередження впливу добових ритмів на досліджувані показники досліди проводили в один і той час доби. Всі експерименти здійснювали згідно з правилами Європейської конвенції щодо захисту хребтних тварин, які використовуються в експериментальних дослідженнях та інших наукових цілях (Страсбург, 1986 р.). Опромінення проводили на рентгенівській установці РУМ-17 в дозі 1,0 Гр за умов: фільтри 0,5 мм Cu та 1 мм Al, шкірно-фокусна відстань 50 см, напруга 200 кВ, сила струму 5 мА, потужність дози 0,17 Гр/хв. Тварин декапітували через 30 хв та 3 години після дії променевого чинника. Лімфоцитні клітини з тимусу та селезінки виділяли згідно з [3].

Рівень транскрипційного фактора NF-κB (цитоплазматична фракція і ядерна фракція) оцінювали з використанням набору для імуноферментного аналізу "Colorimetric enzyme immunoassay for NF-κB" (Oxford Biomedical Research, USA); цитоплазматичну і ядерну фракції одержували з використанням набору Nuclear extraction kit (Chemicon International, USA&Canada) та згідно з рекомендаціями Davis J.N. [4]. Оцінку вмісту білка p53 здійснювали, використовуючи набір реактивів "p53 rap ELISA" (Roche Applied Science, USA). Рівень білка Bax визначали методом вестерн-блот аналізу з використанням поліклональних антитіл проти білка Bax (Sigma Aldrich, USA).

Експериментальні дані обробляли методами варіаційної статистики із використанням програм Origin 7.0 та Microsoft Excel. Для визначення відмінностей між середніми величинами вибірок використовували t-критерій Стюдента.

Результати та їх обговорення. Відповідно до сучасних уявлень за дії променевого чинника спостерігається дисбаланс окисного метаболізму, при якому надлишкова генерація АКМ на фоні вичерпання резервів антиоксидантного захисту впливає на функціональний стан редокс-чутливих систем внутрішньоклітинної регуляції метаболізму. Так, процес експресії генів і власне функціонування транскрипційного апарату знаходиться під контролем клітинного редокс-балансу. До редокс-залежних транскрипційних факторів належать задіяні у реалізації радіаційно-індукованого апоптозу білки NF-κB, p53 та інші. Оскільки взаємодія цих факторів з компонентами транскрипційного апарату та рядом регуляторних білків може бути залежною від патофізіологічної стимуляції, особливо актуальними є дослідження впливу іонізуючого випромінювання на зазначені вище процеси з метою кращого розуміння молекулярних механізмів програмованої клітинної загибелі та шляхів її корекції.

Варто відмітити, що транскрипційний фактор NF-κB залучений як у регуляцію експресії відповідних респонсивних генів, продукти яких координують стан окисного метаболізму у клітині, так і у різноманітні етапи NF-κB-опосередкованого сигналіну, задіяного в протіканні рецептор-опосередкованого і пов'язаного з мітохондріями та ядром шляху апоптотичної загибелі клітин. NF-κB – загальна назва для членів родини гомо- і гетеро-

димерних транскрипційних факторів (білки родини Rel). У лімфоцитах найчастіше виявляють гетеродимер p50/p65 Rel, причому нестимульовані клітини в цитоплазмі містять NF-κB-димер в неактивному стані за умови утворення комплексу з інгібіторним білком IκB. Транскрипційна активація NF-κB приводить до наступного перебігу подій: по-перше, деградації IκB в цитоплазмі з залученням системи протеасоми та подальшої транслокації вивільненого комплексу до ядра; по-друге, відбувається зв'язування активованого NF-κB з відповідними регуляторними ділянками ДНК та стимуляція транскрипції відповідних генів-мішеней. Дія іонізуючої радіації приводить до активації серин/треонінової протеїнкінази – IκB кінази (IKK), яка функціонує у вигляді тримерного комплексу (IKKα, IKKβ, IKKγ=NEMO) та фосфорилує IκB за двома залишками Ser (в основному 32 і 36), що стимулює його убиквітинування та подальшу деградацію з залученням протеасоми. Дисоціація IκB від комплексу NF-κB-IκB активує ядерну транслокацію димеру p50/p65, при цьому фаза трансактивації білка визначає силу і тривалість відповіді на стрес за умов додаткової регуляції на рівні постраскрипційних модифікацій, що включає фосфорилування (ATM, MSK1, PKA, редокс-залежні MAP-кінази JNK та p38), ацетилювання (CBP/p300) та глутатіонілювання в субодинах NF-κB, IκB, IKK та каспазо-опосередковану деградацію NEMO [5].

Згідно з результатами, наведеними на рис.1,2, дія променевого чинника у дозі 1,0 Гр спричиняє достовірне підвищення вмісту NF-κB (p50/p65) у ядерній фракції лімфоцитів тимусу та селезінки щурів через 30 хв та подальше його зростання через три години після опромінення відповідно у 1,2 та 1,3 раза. Щодо цитоплазматичної фракції, то тільки для лімфоцитів селезінки відмічається тенденція до підвищення вмісту NF-κB (p50/p65) після дії іонізуючої радіації.

Зазначимо, що згідно з сучасними уявленнями окислювальний стрес чинить безпосередній вплив на ДНК-зв'язуючі властивості ядерного NF-κB, знижуючи його транскрипційну активність. Так, встановлено, що p50 у складі NF-κB-димеру містить у своєму ДНК-зв'язуючому домені високочутливий до дії АКМ залишок цистеїну – Cys 62, який при активації має знаходитись у ядрі у відновленому стані (на відміну від окисленого стану в цитоплазмі), оскільки бере безпосередню участь у формуванні міжмолекулярних дисульфідних зв'язків (білок-ДНК). До підтримання відновленого статусу Cys 62 залучаються низькомолекулярний редокс-залежний білок тіоредоксин (дисульфідредуктаза) та білковий фактор Ref-1/APE1[6]. В той же час дія променевого чинника опосередковує транскрипцію NF-κB-респонсивних генів, що кодують компоненти як прооксидантної, так і антиоксидантної ланки. Так, до генів-мішеней належать гени оксидантних ферментів – Cu,Zn-СОД та Mn-СОД (СОД2), каталази, тіоредоксину та прооксидантного ферменту ксантиноксидази.

Таким чином, на підставі отриманих даних, а також результатів, викладених раніше [7,8], які свідчать про різнонаправленість змін активності основних ферментів про- та антиоксидантної системи (ксантиноксидази, супероксиддисмутази, каталази) у лімфоцитах тимусу і селезінки щурів за дії променевого чинника, можна стверджувати про залучення транскрипційного фактора NF-κB у регуляцію рівня АКМ, які в свою чергу контролюють молекулярні механізми NF-κB-залежних трансдукційних шляхів, що за певних умов реалізуються у програмовану клітинну загибель.

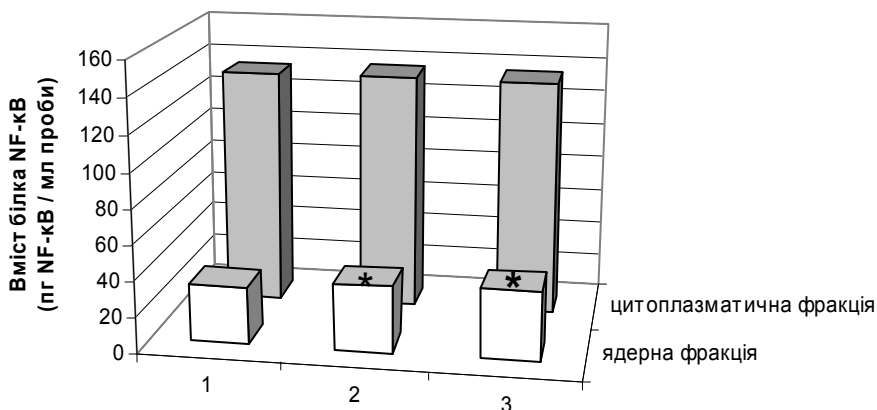


Рис. 1. Вміст білка NF-κB в лімфоцитах тимусу щурів за іонізуючої радіації в дозі 1.0 Гр:
1 – контроль; 2 – 30 хв після дії радіації; 3 – 3 год після дії радіації;
* – достовірно відносно контролю, $p < 0,05$

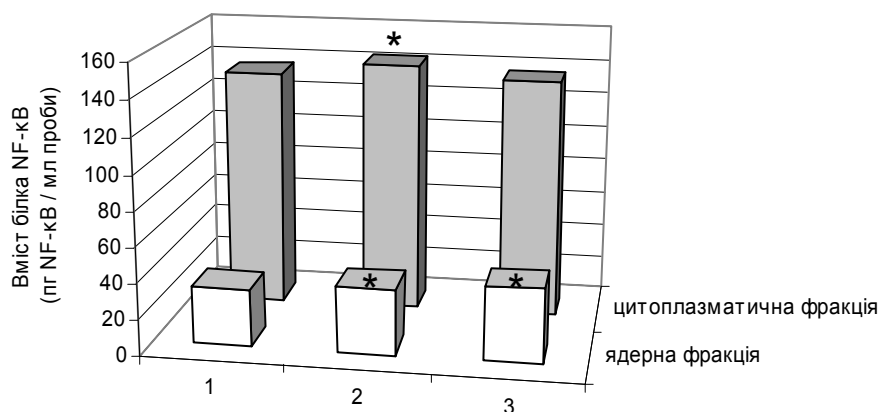


Рис. 2. Вміст білка NF-κB в лімфоцитах селезінки щурів за іонізуючої радіації в дозі 1.0 Гр:
1 – контроль; 2 – 30 хв після дії радіації; 3 – 3 год після дії радіації;
* – достовірно відносно контролю, $p < 0,05$

Не менш актуального значення набуло дослідження редокс-чутливого транскрипційного фактора p53, активація якого контролює процеси регуляції клітинного циклу, апоптозу та редокс-гомеостазу. На сьогодні встановлено, що основним механізмом, який забезпечує підтримання певного сталого рівня p53, є його взаємодія з білком -інгібітором Mdm2, що не тільки блокує транскрипційну активність p53, але й за рахунок Е3-лігазної активності сприяє поліубіквітинуванню транскрипційного фактора з подальшою його деградацією. Стабілізація і активація p53 відбувається за рахунок численних посттрансляційних модифікацій – фосфорилювання (ATM, ATR, ДНК-залежна протеїнкіназа, Chk1 і Chk2, JNK), ацетилювання (CBP/p300), метилювання, SUMOїлювання, що сприяє виконанню білком p53 як основної функції "охоронця геному", так і модифікації редокс-статусу клітин [9]. Серед транскрипційних мішеней p53 є прооксидантні гени – *pig3*, *pig6* (p53-induced gene), які кодують оксидоредуктази, *fdxr* (фередоксин-редуктаза) і антиоксидантні p53-залежні гени, що кодують СОД2, каталазу, глутатіонтрансферазу. В той же час, як і для NF-κB, для p53 є необхідним відновлений

стан цистеїнів, які містяться у центральному ДНК-зв'язуючому домені мономеру білка, що приводить до транскрипції певних респонсивних генів після транслокації фактора до ядра. Таким критичним виявився залишок Cys 277, відновлення якого відбувається за участі p53-зв'язуючого редокс-фактора Ref-1/APE1. Ще ряд залишків Cys залучені у нековалентні модифікації фактора p53, а саме утворення структури цинкового пальця (zinc finger motifs), характерної для ДНК-зв'язуючих білків [6]. Отже редокс-статус фактора p53 є важливим механізмом регуляції його транскрипційної активності.

Внаслідок проведених нами досліджень встановлено дозозалежне підвищення вмісту транскрипційного фактора p53 в 1,6 раза порівняно з контролем в лімфоцитах селезінки щурів через 3 год після опромінення (рис. 3). Незначні зміни вмісту білка p53 через 30 хв після опромінення в обох типах клітин можна пояснити активацією утворення комплексу p53-Mdm2, або надходженням p53 до мітохондрій, яке спостерігається згідно з [10] вже через 30 хв після опромінення в радіочутливих органах щурів (тимус і селезінка).

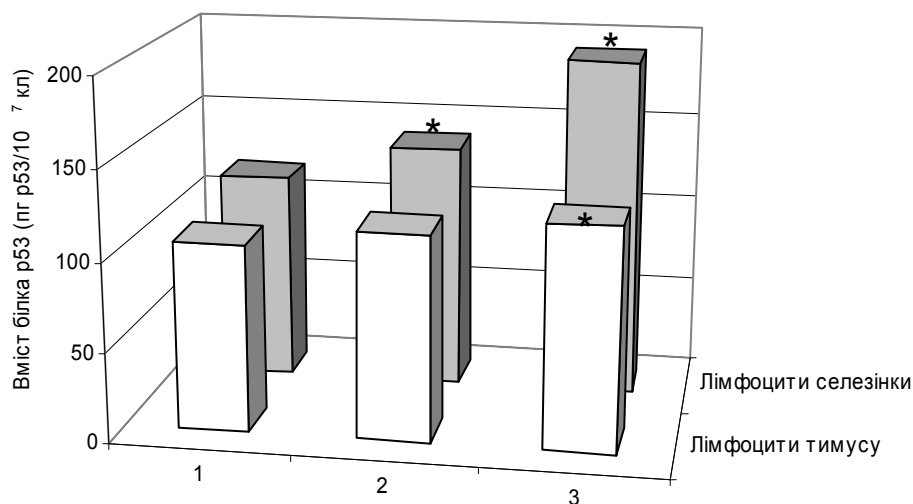


Рис. 3. Вміст білка NF- κ B в лімфоцитах тимусу та селезінки щурів за іонізуючої радіації в дозі 1.0 Гр:

1 – контроль; 2 – 30 хв після дії радіації; 3 – 3 год після дії радіації;

* – достовірно відносно контролю, $p < 0,05$

Отже, завдяки серії експериментальних робіт ряду авторів [8, 11], можна стверджувати, що за певного рівня накопичення АКМ мобілізація захисних систем клітини слабшає, тоді як стимуляція реакцій, що призводять до р53-залежного апоптозу, продовжує зростати.

Вивчення особливостей індукції та репресії транскрипції про- і антиапоптотичних р53-залежних генів за дії іонізуючої радіації дозволило виявити залучення зовнішнього – рецептор-опосередкованого (гени *fas*, *killer/dr5*) та внутрішнього – мітохондріального шляху апоптозу. Особлива увага дослідників зосереджена на участі фактора р53 в активації мітохондріального шляху апоптозу як за рахунок транскрипції р53-залежних генів, так і транслокації р53, оминаючи ядро, до мітохондрій з подальшою активацією процесу пермеабілізації мітохо-

ндріальної мембрани, спряженої зі значним підвищенням рівня АКМ [12], та наступною поетапною реалізацією апоптотичної загибелі клітин.

Так, за умов радіаційно-індукованого апоптозу активуються р53-респонсивні гени, що кодують білки родини Bcl-2, при цьому індукується транскрипція проапоптотичної їх частини – Bax, Noxa, Puma та репресується антиапоптотичний Bcl-2. Зв'язування р53 з антиапоптотичними білками родини Bcl-2 вивільняє і активує проапоптотичні білки Bax і Bid за участі білків, що містять лише BH 3 домени – Noxa, Puma, що запускає на рівні мітохондріального сигнального каскаду як каспазо-опосередкований, так і каспазо-незалежний шлях реалізації програмованої клітинної загибелі [13].

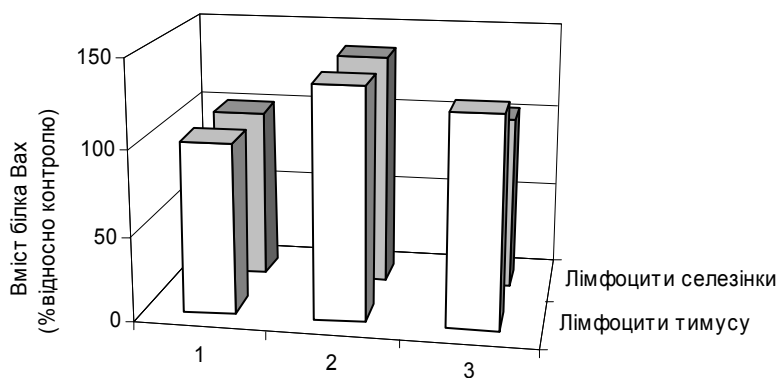


Рис. 4. Вміст білка Bax в лімфоцитах тимусу та селезінки щурів за іонізуючої радіації в дозі 1.0 Гр:

1 – контроль; 2 – 30 хв після дії радіації; 3 – 3 год після дії радіації

Результати наших досліджень, наведені на рис.4, свідчать про різнонаправленість змін рівня проапоптотичного білка Bax залежно від часу після опромінення. Виявлено достовірне підвищення вмісту Bax через 30 хв після опромінення в обох типах клітин, що на фоні незначного зростання за даних умов вмісту р53 у лімфоцитах тимусу можна пояснити активацією радіаційно-індуцибельного *erg1* гена [14], продукт якого також безпосередньо залучений у експресію bax.

Одержані нами експериментальні дані узгоджуються з існуючою гіпотезою [15] про складні взаємовідносини транскрипційних факторів NF- κ B та р53 при регуляції апоптозу, згідно з якою можлива одночасна активація обох факторів, чи послідовна – за умови поділу між ними відповідних функцій – один фактор є індуктором, інший – ефектором в реалізації апоптозу за дії генотоксичних стимулів, зокрема іонізуючої радіації.

Список використаних джерел

1. Турпаев К. Т. Активные формы кислорода и регуляция экспрессии генов // Биохимия. – 2002. – Т. 67, вып. 3. – С. 339-352.
2. Михайлов В.Ф., Мазурик В.К., Бурлакова Е.Б. Сигнальная функция активных форм кислорода в регуляторных сетях ответа клеток на повреждающее воздействие: участие в реализации радиочувствительности и нестабильности генома // Радиационная биология и радиоэкология. – 2003. – Т.43, №1. – С.5-18.
3. Лимфоциты: Методы / Под ред. Клаус Д. – Москва: Мир, 1990. – 395 с.
4. Davis J.N., Kucuk O., Djuric Z. et al. Soy isoflavone supplementation in healthy men prevents NF- κ B activation by TNF- α in blood lymphocytes // Free Radical Biology & Medicine. – 2001. – Vol. 30, №11. – P. 1293-1302.
5. Janssens S., and Tschopp J. Signals from within: The DNA damage-induced NF- κ B // Cell Death and Differentiation. – 2006. – Vol. 13. – P. 773-784.
6. Monora M., Greabu M., Totan A. et al Redox-sensitive signaling factors and antioxidants // Farmacia. – 2009. – Vol. 57, №4. – P 399-411.
7. Ракша Н.Г., Андрійчук Т.Р., Кучеренко М.Є. Участь ксантиноксидазної системи в розвитку оксидативного стресу за дії променевого чинника // Біополімери і клітина. – 2006. – Т.22, №2. – С.1-4.
8. Андрійчук Т.Р., Ракша Н.Г., Драган Л.П., Полякова В.В., Лугова С.Л., Цудзевич Б.О. Окисний стрес як медіатор радіаційно-індукованого апоптозу // Укр. біохім. журн. – 2010. – Т.82, №4. – С.152-153.
9. Желтухин А.О., Чумаков П.М. Повседневные и индуцируемые функции гена p53 // Успехи биологической химии. – 2007. – Т. 50. – С. 447-516.
10. Erster S., Mihara M., Kim R. H. et al. In vivo mitochondrial p53 translocation triggers a rapid first wave of cell death in response to DNA damage that can precede p53 target gene activation // Molecular and Cellular Biology. – 2004. – Vol. 24, № 15. – P. 6728-6741.
11. Октябрьский О. Н., Смирнова Г. В. Редокс-регуляция клеточных функций // Биохимия. – 2007. – Т. 72, вып. 2. – С. 158-174.
12. Бра М., Квинакан Б., Сузин С.А. Митохондрии в программированной гибели клетки: различные механизмы гибели // Биохимия. – 2005. – Т. 70, вып. 2. – С. 284-293.
12. Xiao-Ming Yin, Zheng Dong. Essentials of apoptosis. Second edition. – Humana Press, USA. – 2009. – 728 p.
13. Zagurovskaya M., Shareef M.M., Das A. et al. EGR-1 forms a complex with YAP-1 and upregulates Bax expression in irradiated prostate carcinoma cells // Oncogene. – 2009. – Vol.28. – P.1121-1131.
14. Perkins N. D. Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function // Molecular Cell Biology. – 2007. – Vol.8. – P.49-62.

Надійшла до редколегії 17.06.14

Т. Андрійчук, канд. биол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

РЕДОКС-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ ЗВЕНЬЯ РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННОГО АПОПТОЗА

Установлены редокс-чувствительные элементы сигнальной трансдукции в реализации радиационно-индуцированного апоптоза иммунокомпетентных клеток тимуса и селезенки крыс.

Ключевые слова: сигнальная трансдукция, радиационно-индуцированный апоптоз, тимус, селезенка.

T. Andriichuk, PhD
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

REDOX-SENSITIVE LINK RADIATION-INDUCED APOPTOSIS

It was established the contribution of redox-sensitive elements of the signal transduction in radiation-induced apoptosis of rat's thymus and spleen immunocompetent cells.

Key words: signal transduction, radiation-induced apoptosis, thymus, spleen.

УДК 591.47:612.6

М. Матвієнко, асп., Р. Кривошеєв, асп., Ю. Акімов, асп.,
А.Пустовалов, канд. біол. наук, М. Дзержинський, проф.
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ЗМІНИ КЛІТИН ПРЕОПТИЧНОГО ЯДРА ГІПОТАЛАМУСА ЩУРІВ ПРИ ВЗАЄМОДІЇ А-АДРЕНЕРГІЧНОЇ ТА КІСПЕПТИНЕРГІЧНОЇ СИСТЕМ

Стимуляція α -адренергічної системи мезатоном спричинює активацію лише нейроцитів, проте не астроцитів преоптичного ядра гіпоталамуса щурів у віці 3 місяці. Антагоніст кіспептину (P-234) повністю скасовує активуючий вплив мезатону. Празозин пригнічує нейроцити і астроцити і знімає стимулюючий ефект кіспептину. Для активації клітин преоптичного ядра гіпоталамуса щурів у цьому віці потрібен високий рівень активності обох систем: кіспептинергічної та α -адренергічної.

Ключові слова: гіпоталамус, нейроцит, астроцит, кіспептин, α -адренорецептори.

Вступ. На сьогоднішній день визнана центральна роль гонадотропіну (ГнРГ) в регуляції репродукції, але мало що зрозуміло в механізмах, які впливають на розвиток і фізіологічний контроль ГнРГ-нейронів. ГнРГ-нейрони експресують рецептори кіспептину [12, 18]. Рецептор кіспептину (GPR54, або Kiss1r) належить до класу G-білок-спряжених рецепторів, що зв'язані з сигнальним шляхом фосфоліпази C, яка в результаті активації призводить до мобілізації Ca^{2+} . В 1999 уперше був визначений GPR54 в мозку щурів. Згодом з'ясувалося, що рецептори кіспептину щура та людини мають 85% ідентичних послідовностей, зі збільшенням до 98% в трансмембранних доменах, у той час як у мишей і людини частка ідентичності складає 82%. Найближчий структурний родич рецептора кіспептину – галаніновий рецептор GAL1, з 45% гомології; незважаючи на те, що галанін не зв'язується з ним [13]. Експерименти на людях і мишах з порушеними Kiss1r і Kiss1 показали, що функціональний рецептор кіспептину необхідний для секреції ГнРГ і вивільнення гонадотропінів [5, 6, 9, 21].

Доведено, що в усіх ссавців наявні кіспептинергічні (КП)-нейрони, які становлять кіспептинергічну систему. КП-нейрони переднього гіпоталамуса є головними афферентними стимулами ГнРГ-нейронів. ГнРГ-нейрони проявляють високу пластичність, а субпопуляції цих клітин у преоптичній області гіпоталамуса сильно реагують на екологічні і гормональні умови [22]. А кіспептин є потужним стимулятором гонадотропіної осі [10]. КП може діяти на рівні гіпофіза [14, 20], стимулюючи вивільнення гонадотропіну. ГнРГ, в свою чергу, є прямим посередником кіспептин-стимульованого викиду гонадотропіну [15, 16, 23, 24].

Введення кіспептину стимулює утворення статевих гормонів у безплідних жінок репродуктивного віку. Кіспептин призвів до 48-кратного збільшення ЛГ і 16-кратного збільшення ФСГ. Пептид може відновити репродуктивну функцію у жінок з низьким рівнем статевих гормонів [7, 8]. Центральне і периферійне введення кіспептину стимулює гіпоталамо-гіпофізарно-гонаду вісь, тоді як при попередньому введенні антагоніста

ГнРГ цей ефект скасовується. У чоловіків і жінок гостре внутрішньовенне введення КП значно збільшує рівні ЛГ, ФСГ і тестостерону в плазмі крові, особливо в жінок у передовуляторну фазу менструального циклу, без побічних ефектів. При безплідді через гіпоталамічну аменорею гостре введення КП призводить до стимуляції секреції статевих гормонів [19]. Цей гормон здійснює ефекти на ті ж самі нейроендокринні центри як у жіночому, так і в чоловічому організмі. Кіспептин стимулює гіпоталамо-гіпофізарно-гонадну вісь, змінюючи активність статевих залоз, через активацію вивільнення гонадоліберину [11].

Крім кіспептинергічної системи на репродуктивну функцію чинить вплив α -адренергічна система [1, 3, 4]. Чи існує взаємозв'язок між кіспептинергічною та α -адренергічною системами, і як це відображається на репродуктивній функції, залишається недослідженим. Тому в даному експерименті вивчалися ефекти взаємодії цих двох систем на центральну ланку гонадотропної осі – гіпоталамус. Предметом наукового інтересу слугувало преоптичне ядро гіпоталамуса, якому належить ключова роль в регуляції репродукції [17].

Метою роботи було вивчення змін активності нейроцитів і астроцитів преоптичного ядра гіпоталамуса самців щурів трьохмісячного віку кіспептину за умов блокади й активації альфа-адренергічних і кіспептинергічних рецепторів.

Матеріали та методи. Експеримент проведений на самцях щурів білих нелінійних *Rattus norvegicus* трьохмісячного віку масою 200-250 г. Досліджувався вплив інтрацеребрального введення кіспептину (метастин- (45-54)-амід, Sigma, США) на гіпоталамус, а також його комбінації з α -адреноблокатором празозином (празозин-ратіофарм, Меркле ГмбХ, Німеччина). Також досліджувався вплив інтрацеребрального введення блокатора кіспептинергічних рецепторів (кіспептин-234-трифлюороацетат, Sigma, США) і його комбінованого введення в комплексі з α -адреноміметиком мезатоном (ТОВ "Дослідний завод "ГНЦЛС", Україна).

Кіспептин і антагоніст кіспептину вводилися протягом трьох діб до взяття матеріалу інтрацеребрально у лівий шлуночок мозку на стереотаксичному приладі за допомогою спеціально переобладнаного шприца у дозі 30мкг/1кг маси тіла один раз на добу. Мезатон вводився парентерально протягом 10 діб до взяття матеріалу у дозі 1000мкг/1кг маси тіла один раз на добу. Празозин вводився перорально протягом 10 діб до взяття матеріалу у дозі 1000мкг/1кг маси тіла один раз на добу.

Експериментальний матеріал оброблявся за стандартною гістологічною методикою. На мікромомі виготовлялися препарати преоптичного ядра гіпоталамуса завтовшки 7-8 мкм, які фарбували крезилвіолетом за Нісслем. На гістологічних препаратах за допомогою мікроскопа Olympus BX51 і системи аналізу зображень Olympus DP-Soft 3.2 вимірювали площу поперечного перерізу ядер нейроцитів і астроцитів (не менше 150 вимірів на одну групу тварин) при збільшенні $\times 400$. Дані морфометричні показники слугують показниками функціональної активності клітин. Отримані виміри аналізувалися методами варіаційної статистики. Спочатку проводилася перевірка розподілів вибірок досліджуваних параметрів на нормальність за *W*-критерієм Шапіро-Уїлка. При нормальному розподілі для оцінки статистичної достовірності відмінностей між середніми значеннями параметрів у порівнюваних групах використовувалася *t*-критерій Стьюдента. У випадку, якщо не всі вибірки в порівнюваних групах розподілені за нормальним законом, використовується *U*-критерій Манн-Уїтні. Достовірними вважалися відмінності при рівні значущості

$p < 0,05$ При статистичній обробці визначалися середня арифметична та її похибка ($M \pm m$). Статистична обробка даних здійснювалася за допомогою програмного забезпечення Sewws Statistica 7.0 (StatSoft, USA).

Результати та їх обговорення. Преоптичне ядро гіпоталамуса містить нейроцити та оточуючі їх гліальні клітини. В даному дослідженні увага надається одному з основних типів гліальних клітин – астроцитам. Так, у нейроцитів контрольної групи щурів площа поперечного перерізу ядер складає $55,21 \pm 0,96$ мкм². Астроцити цієї ж групи тварин мають площу поперечного перерізу ядер $35,55 \pm 1,20$ мкм² (Табл.1).

При введенні блокатора рецепторів кіспептину площа поперечного перерізу ядер нейронів становить $53,82 \pm 1,81$ мкм². Помітне невелике зменшення морфометричного параметра ядер у даній групі тварин, порівняно з контролем, але ці зміни статистично недостовірні. Астроцити групи "Антагоніст кіспептину" мають площу поперечного перерізу ядер $33,33 \pm 1,07$ мкм² (Табл.1). При введенні антагоніста кіспептину в астроцитах дещо зменшується площа поперечного перерізу ядер, але ці зміни не підтверджуються статистично. В цілому нейроцити і астроцити ПОЯ 3-місячних щурів групи щурів після введення антагоніста кіспептину показують тенденцію до зменшення площі поперечного перерізу ядер, але ці зміни недостовірні. У тварин у віці 24 місяці спостерігалися подібні зміни – блокатор рецепторів кіспептину не здійснював потужного супресуючого ефекту на клітини цієї ж гіпоталамічної ділянки [2].

Після введення кіспептину площа поперечного перерізу ядер нейронів склала $71,18 \pm 1,63$ мкм². Відбулося суттєве зростання даного каріометричного параметра в даній групі, на відміну від контрольної групи. Астроцити щурів досліджуваної групи мають площу поперечного перерізу ядер $41,93 \pm 1,21$ мкм² (Табл.1). У цього типу клітин також показник площі поперечного перерізу ядер достовірно більший, ніж у контролі. Крім того, в ПОЯ гіпоталамуса щурів даної групи тварин показники площі поперечного перерізу нейронів і астроцитів найбільші серед усіх досліджуваних груп тварин 3-місячного віку. Так, кіспептин сприяє достовірному зростанню площі поперечного перерізу ядер нейронів і астроцитів, що відображає інтенсифікацію синтетичної активності цих клітин. На нейрони й астроцити старих тварин кіспептин здійснив інтенсивний активуючий ефект [2].

Щури, яким вводили мезатон, продемонстрували таку площу поперечного перерізу ядер – $63,69 \pm 1,62$ мкм². У цій групі щурів каріометричний показник нейронів достовірно більший, ніж у контролі. Астроцити групи "Мезатон" мають площу поперечного перерізу ядер $38,35 \pm 1,10$ мкм² (Табл.1). У цього типу клітин існує тенденція до збільшення даного параметра після ін'єкції мезатону, але зміни статистично недостовірні. В цілому можна стверджувати про активуючий вплив мезатону на синтетичну активність ядер клітин преоптичного ядра гіпоталамуса 3-місячних щурів, при цьому нейроцити виявилися більш чутливими до такого впливу.

При комбінованому введенні мезатону з антагоністом кіспептину щури мали таку площу поперечного перерізу ядер нейроцитів – $53,79 \pm 0,87$ мкм². Цей показник достовірно нижчий, ніж у групі тварин без введення блокатора рецепторів кіспептину. Астроцити щурів досліджуваної групи мають площу поперечного перерізу ядер $35,41 \pm 1,13$ мкм² (Табл.1). Каріометричний показник цього типу клітин зменшується в групі "Мезатон+Антагоніст кіспептину", в порівнянні з групою "Мезатон", але статистично недостовірно. Загалом мезатон чинить пригнічуючий вплив на клітини преоптичного

ядра гіпоталамуса щурів, незважаючи на комбіноване введення блокатора рецепторів кісспептину. Нейроцити виявилися більш чутливими до такого впливу, ніж астроцити. В дослідженнях на старих щурах комбіноване введення мезатону з антагоністом кісспептину проявилось в значному зниженні функціональної активності нейронів та в меншій мірі пригнічуючий вплив блокатора рецепторів кісспептину відобразився на астроцитах преоптичного ядра гіпоталамуса [2].

Після введення празозину в щурів зафіксували таку площу поперечного перерізу ядер нейроцитів – $46,37 \pm 0,92$ мкм². Параметр достовірно зменшився, порівняно з контролем. Астроцити даної групи тварин мають площу поперечного перерізу ядер $30,81 \pm 1,12$ мкм² (Табл.1). У астроцитів тварин після введення празозину також спостерігається достовірно зменшення даного показника, у порівнянні з контрольною групою. Варто зауважити, що каріометричні показники як нейроцитів, так і астроцитів ПОЯ 3-місячних щурів є найнижчими

саме в цій групі. Такі зміни свідчать про пригнічення синтетичної активності клітин під дією празозину.

При комбінованому введенні празозину з кісспептином площа поперечного перерізу ядер нейроцитів складає $56,63 \pm 1,19$ мкм², спостерігається достовірно зростання показника при співставленні з групою "Празозин". Астроцити щурів групи "Празозин+Кісспептин" мають площу поперечного перерізу ядер $34,69 \pm 1,13$ мкм² (Табл.1), яка достовірно збільшується, на відміну від групи "Празозин". В цілому при комбінованому введенні празозину з кісспептином активуючий вплив празозину виявився достатньо інтенсивним, щоб невеликати гальмівний ефект празозину на функціональну активність нейронів і астроцитів. Досліди на старих щурах з комбінованим введенням кісспептину з празозином дали схожі результати. При цьому синтетична активність нейроцитів значно збільшилась, незважаючи на пригнічуючий вплив празозину. А в астроцитах не спостерігалось такої інтенсивної активації, як у нервових клітинах [2].

Таблиця 1. Площа поперечного перерізу ядер нейроцитів і астроцитів преоптичного ядра гіпоталамуса щурів у віці 3 місяці

Група	Параметр	Площа поперечного перерізу ядер нейроцитів, мкм ² , M±m	Площа поперечного перерізу ядер астроцитів, мкм ² , M±m
Контроль		55,21±0,96	35,55±1,20
Антагоніст кісспептину		53,82±1,81	33,33±1,07
Кісспептин		71,18±1,63*	41,93±1,21*
Мезатон		63,69±1,62*	38,35±1,10
Мезатон+антагоніст кісспептину		53,79±0,87^	35,41±1,13
Празозин		46,37±0,92*	30,81±1,12*
Празозин+кісспептин		56,63±1,19#	34,69±1,13#

* – $p < 0,05$, порівняно з контролем;

– $p < 0,05$, порівняно з відповідною групою без кісспептину;

^ – $p < 0,05$, порівняно з відповідною групою без антагоніста кісспептину.

В цілому ефекти дії кісспептинергічної та α-адренергічної систем мають місце як поодинокі, так і разом у регуляції функціонального стану клітин преоптичного ядра гіпоталамуса щурів. Результати взаємодії цих систем на рівні даної гіпоталамічної області проявляються схожим чином і у тварин старшого віку. При цьому варто відмітити, що нейроцити більш активно реагують на впливи цих систем, ніж астроцити. В той час як останні зберігають тенденцію до зміни функціональної активності в тому ж напрямку, як і нейроцити.

Висновки:

Результати проведених досліджень показали, що у 3-місячних щурів блокатор кісспептинергічних рецепторів (Р-234) не викликає помітного пригнічення клітин преоптичного ядра гіпоталамуса, проте здатен знімати активуючий вплив мезатону на нейрони. Натомість, кісспептин викликає активацію нейроцитів та астроцитів даної області гіпоталамуса як самостійно, так і на тлі введення празозину. Активуючі ефекти внаслідок стимуляції α-адренергічної системи мезатоном розповсюджуються тільки на нейроцити, та не стосуються астроцитів преоптичного ядра гіпоталамуса 3-місячних щурів. Антагоніст кісспептину здатен цілком скасувати активуючий вплив мезатону на клітини. Празозин пригнічує нейроцити і астроцити і знімає стимулюючий ефект кісспептину. Для активації клітин преоптичного ядра гіпоталамуса щурів у віці 3 місяці необхідний високий рівень активності обох систем: кісспептинергічної та α-адренергічної.

Список використаних джерел

1. Держинський М.Е. Стимулюючий ефект катехоламінів та нонапептидів на функцію статеві та щитовидної залоз / М.Е. Держинський, Л.М. Пазюк та ін. // Доповіді НАН України. – 1997. – Т.1, № 3. – С. 161-164.

2. Матвиенко М.Г., Пустовалов А.С., Держинський Н.Э. Морфофункциональное состояние клеток преоптического ядра гипоталамуса старых крыс в условиях стимуляции и блокады альфа-адренергических и ксипептинергических рецепторов // Международная научно-практическая конференция "Здоровье и медицина для всех возрастов" (21-22 мая 2013 г., Курск, Россия). – Материалы конференции. – 2013. – С. 192-197.

3. Dzerzhinsky M. Morphofunctional changes in rat testes under kisspeptin influence against blockade and activation of alpha-adrenergic receptors and melatonin administration / M. Dzerzhinsky, A. Pustovalov, M. Matvienko // Reproduction in domestic animals. – 2012. – Vol. 47, № 2. – P. 20.

4. Daneri C. Involvement of the ganglion cholinergic receptors in gonadotropin-releasing hormone, catecholamines, and progesterone release in the rat ovary / C. Daneri, A.V. Orozco, D. Bronzi [et al.] // Fertil. Steril. – 2013. – Vol. 99, № 7. – P. 2062-2070.

5. d'Anglemont de Tassigny X. Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene / X. d'Anglemont de Tassigny, L.A. Fagg, M.B. Carlton, W.H. Colledge // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2007. – Vol. 104, № 25. – P. 10714-10719.

6. d'Anglemont de Tassigny X. Kisspeptin can stimulate gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release by a direct action at GnRH nerve terminals / X. d'Anglemont de Tassigny, L.A. Fagg, M.B. Carlton, W.H. Colledge // Endocrinology. – 2008. – Vol. 8, № 149. – P. 3926-3932.

7. Dhillo W. S. Kisspeptin-54 Stimulates the Hypothalamic-Pituitary Gonadal Axis in Human Males / W. S. Dhillo, O. B. Chaudhri, M. Patterson [et al.] // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2005. – Vol. 90, № 12. – P. 6609-6615.

8. Dhillo W.S. Kisspeptin-54 stimulates gonadotropin release most potently during the preovulatory phase of the menstrual cycle in women / W. S. Dhillo, O. B. Chaudhri, E.L. Thompson [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2007. – Vol. 10, № 92. – P. 3958-3966.

9. Dungan H.M. The role of kisspeptin-GPR54 signaling in the tonic regulation and surge release of gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone / H.M. Dungan, M.L. Gottsch, H. Zeng [et al.] // J. Neurosci. – 2007. – Vol. 27, № 1. – P. 12088-12095.

10. Goodman R.L. Kisspeptin neurons from mice to men: similarities and differences / R.L. Goodman, M.N. Lehman // Endocrinology. – 2012. – Vol. 153, № 11. – P. 5105-5118.

11. Grachev P. GPR54-Dependent Stimulation of Luteinizing Hormone Secretion by Neurokinin B in Prepubertal Rats / P. Grachev, X. F. Li, Y. S. Lin, M. H. Hu // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, № 9. – P. 443-454.
12. Irwig M.S. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat / M.S. Irwig, G.S. Fraley, J.T. Smith [et al.] // Neuroendocrinology. – 2004. – Vol. 8, № 4. – P. 264-272.
13. Lee D. K. Discovery of a receptor related to the galanin receptors / D. K. Lee, T. Nguyen, G.P. O'Neill [et al.] // FEBS Lett. – 1999. – Vol. 446, № 5. – P. 103-107.
14. Migaud H. Kisspeptin and seasonal control of reproduction in male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) / H. Migaud, R. Ismail, M. Cowan, A. Davie // Kisspeptin and seasonal control of reproduction in male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) // Gen. Comp. Endocrinol. – Vol. 179, № 3. – P. 384-399.
15. Navarro V. M. Characterization of the Potent Luteinizing Hormone-Releasing Activity of KiSS-1 Peptide, the Natural Ligand of GPR54 / V. M. Navarro, J. M. Castellano, R. Fernández-Fernández [et al.] // Endocrinology. – 2005. – Vol. 146, № 1. – P. 156-163. (B).
16. Navarro V. M. Effects of KiSS-1 Peptide, the Natural Ligand of GPR54, on Follicle-Stimulating Hormone Secretion in the Rat / V. M. Navarro, J. M. Castellano, R. Fernández-Fernández [et al.] // Endocrinology. – 2005. – Vol. 146, № 4. – P. 1689-1697.
17. Panzica G., Viglietti-Panzica C., Balthazart J. Sexual dimorphism in the neuronal circuits of the quail preoptic and limbic regions // Microsc. Res. Tech. – 2001. – Vol. 54, №6. – P. 364-374.

18. Parhar I.S. Laser-captured single digoxigenin-labeled neurons of gonadotropin-releasing hormone types reveal a novel G protein-coupled receptor (Gpr54) during maturation in cichlid fish / I.S. Parhar, S. Ogawa, Y. Sakuma // Endocrinology. – 2004. – Vol. 8, № 145. – P. 3613-3618.
19. Ratnasabapathy R. The effects of kisspeptin in human reproductive function – therapeutic implications / R. Ratnasabapathy, W.S. Dhillo // Curr. Drug Targets. – 2013. – Vol. 14, № 3. – P. 365-371.
20. Richard N. KiSS-1 and GPR54 at the pituitary level: overview and recent insights / N. Richard, S. Corvaisier, E. Camacho, M.L. Kottler // Peptides. – 2009. – Vol. 1, № 30. – P. 123-129.
21. Sonigo C. Overview of the impact of kisspeptin on reproductive function / C. Sonigo, N. Binart // Ann. Endocrinol. (Paris). – 2012. – Vol. 73, № 5. – P. 448-458.
22. Stevenson T. J. Gonadotropin-releasing hormone plasticity: A comparative perspective / T. J. Stevenson, T. P. Hahn, S. A. Macdougall-Shackleton, G. F. Ball // Front Neuroendocrinol. – 2012. – Vol. 33, № 3. – P. 287-300.
23. Thompson E. L. Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis / E. L. Thompson, M., Patterson, K.G. Murphy [et al.] // Neuroendocrinol. – 2004. – Vol. 16, № 10. – P. 850-858.
24. Thompson E.L. Chronic subcutaneous administration of kisspeptin-54 causes testicular degeneration in adult male rats / E.L. Thompson, K.G. Murphy, M. Patterson [et al.] // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. – 2006. – Vol. 291, № 5. – P. 1074-1082.

Надійшла до редколегії 17.06.14

М. Матвиенко, асп., Г. Кривошеєв, асп., Ю. Акимов, асп., А. Пустовалов, канд. біол. наук, М. Дзержинський, проф.
КНУ ім. Тараса Шевченка, Київ

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТОК ПРЕОПТИЧЕСКОГО ЯДРА ГИПОТАЛАМУСА КРЫС ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ α -АДРЕНЕРГИЧЕСКОЙ И КИСПЕПТИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

Стимуляция α -адренергической системы мезатоном вызывает активацию только нейронов, однако не астроцитов преоптического ядра гипоталамуса крыс в возрасте 3 месяца. Антагонист киспетину (P-234) полностью отменяет активирующее влияние мезатона. Празозин угнетает нейроны и астроциты и снимает стимулирующий эффект киспетину. Для активации клеток преоптического ядра гипоталамуса крыс в этом возрасте требуется высокий уровень активности обеих систем: киспетинергической и α -адренергической.

Ключевые слова: гипоталамус, нейрон, астроцит, киспетин, α -адренорецепторы.

M. Matvienko, PhD stud., R. Krivosheyev, PhD stud., Yu. Akimov, PhD stud., A. Pustovalov, PhD., M. Dzerzhinsky, Prof.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

MORPHOFUNCTIONAL CHANGES IN CELLS OF RAT PREOPTIC HYPOTHALAMIC NUCLEUS IN THE INTERACTION OF α -ADRENERGIC AND KISSPEPTINERGIC SYSTEMS

Stimulation of the α -adrenergic system with meztan causes the activation of only neurocytes, but not astrocytes of the preoptic hypothalamic nucleus of 3-months old rats. The kisspeptin antagonist (P-234) completely abolishes the activating meztan effect. Prazosin inhibites neurocytes and astrocytes and removes the stimulating kisspeptin effect. To activate the cells of the preoptic hypothalamic nucleus in rats at this age there is necessary a high level of activity of both kisspeptinergic and α -adrenergic systems.

Key words: hypothalamus, neurocyte, astrocyte, kisspeptin, α -adrenergic receptors.

УДК 577.21:612.34:616.33-008.821.14

А. Драницина, канд. біол. наук, У. Савко, асп.,
К. Дворченко, канд. біол. наук, О. Морганко, канд. біол. наук,
В. Верещака, д-р мед. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ЭКСПРЕСИЯ ГЕНА *PAR2* В ЭПИТЕЛИОЦИТАХ ДВНАДЦАТИПАЛОЇ КИШКИ ЩУРІВ ЗА УМОВ ТРИВАЛОЇ ГІПОАЦИДНОСТІ ШЛУНКА ТА ПРИ ВВЕДЕННІ МУЛЬТИПРОБІОТИКА СИМБІТЕР

*Показано зростання рівня експресії гена *Par2* в епітеліоцитах ворсинок та крипт дванадцятипалої кишки за гіпоацидних умов. При введенні мультипробіотика Симбітер за тих самих умов рівень експресії вищезазначеного гена в епітеліоцитах ворсинок був подібний до контролю, у той час як зменшувався в 1,4 раза в криптах.*

Ключові слова: шлункова гіпоацидність, дванадцятипала кишка, щурі, експресія гена *Chga*, мультипробіотик.

Вступ. За останні десятиліття найбільш ефективними фармакологічними засобами при терапії гастроентерологічних кислотозалежних захворювань лишаються інгібітори протонної помпи (ІПП) парієтальних клітин шлунка, поширеним представником яких є омепразол [19, 20]. Розвиток дисбіозу – один із ключових наслідків тривалої гіпоацидності, при якому спостерігається колонізація шлунково-кишкового тракту (ШКТ) умовно-патогенною мікрофлорою, яка формує резервуари стій-

кої ендогенної інфекції та є додатковим фактором, що, окрім гіпергастринемії, сприяє шлунковому канцерогенезу, а також виникненню спорадичних пухлин в інших ділянках ШКТ та асоційованих з ним органах [4, 21].

На сьогодні дослідження характеру експресії генів, залучених до розвитку запальних порушень у дванадцятипалій кишці (ДПК) за умов тривалого пригнічення кислотопродукуючої функції шлунка, відсутні [3]. Ген *Par2* кодує мембранний рецептор, що активується про-

теїназами II типу – PAR2 (proteinase-activated receptor 2), який належить до великої родини рецепторів, спряжених із G-білком [10]. Встановлено, що PAR2 активується у відповідь на часткове протеолітичне розщеплення позаклітинного домену сериновими протеазами під впливом р38 MAP (мітоген-активованого протеїну) кінази та за рахунок сигнального шляху ядерного фактору "капа-бі" (NFκB) переважно шляхом активації IKKb (інгібувальної "капа-бі" кінази) [17]. Прийнято розглядати зростання рівня експресії гена *Par2* як захисний механізм клітин від передчасної активації протеолітичних ферментів [10]. Зокрема, показано збільшення рівня експресії цього гена як при запаленні, так і за умов малигнізації тканин [17]. У клінічних дослідженнях доведено здатність пробіотичних препаратів не лише лікувати дисбіотичні стани, але й безпосередньо зменшувати ступінь ураження ШКТ [1, 7]. Мультипробіотичні препарати групи "Симбітер® ацидофільний" концентрований (далі Симбітер) характеризуються полікомпонентністю, широким спектром біологічної активності та складом, максимально наближеним до природних мікробіоценозів організму людини та тварин [1, 12]. При аналізі наукової літератури не було знайдено даних стосовно характеру експресії вищезазначеного гена в епітеліоцитах ДПК щурів за умов експериментальної гіпоацидності шлунка. Окрім цього, лишається невисвітленою дія пробіотичних препаратів на експресію гена *Par2* в ДПК за таких умов.

Таким чином, доцільним було проаналізувати експресію гена *Par2*, який є сенсором передчасної активації протеаз (у першу чергу – трипсину), в епітеліоцитах ДПК щурів як за умов тривалого пригнічення кислотної секреції шлунка блокатором H^+/K^+ -АТФази омепразолом (і, відповідно, за підвищених концентрацій циркулюючого в крові гастрину), так і при відновленні нормобіозу шлунка шляхом введення мультипробіотика Симбітер.

Об'єкт та методи досліджень. У дослідженні використовували білих неплідних статевозрілих щурів-самців із початковою масою 180-200 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. У роботі дотримувалися міжнародних рекомендацій для проведення медико-біологічних досліджень із використанням тварин відповідно до Європейської конвенції (European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes).

Тварин розділяли на чотири групи. В якості контролю (перша група) використовували щурів, яким протягом 28 діб вводили інтраперитонеально 0,2 мл та перорально 0,5 мл води для ін'єкцій. Тварини другої групи протягом 28 діб перорально отримували Симбітер (виробництва ТОВ "О.Д. Пролісок") у дозі 0,14 мл/кг, розчинений у 0,5 мл води для ін'єкцій. Моделювання гіпоацидного стану (третя група) проводили за допомогою внутрішньочеревного введення 14 мг/кг омепразолу, 1 раз на добу протягом 28 діб [22]. Четверта група щурів одночасно з інтраперитонеальним введенням омепразолу перорально отримувала Симбітер у вищезазначеній дозі. Кількість тварин у кожній експериментальній групі – 6.

Епітеліоцити ворсинок та крипти із ДПК ізолювали за допомогою низькотемпературного методу [11]. РНК отримували за методом Chomczynski [6]; кДНК синтезували в 20 мкл реакційної суміші, яка містила 2 мкг РНК,

1 мМ dNTP, 50 од. зворотної транскриптази (3T) "MultiScribe™ Reverse Transcriptase", відповідний буферний розчин, 20 од. рибонуклеазного інгібітору "RNase Inhibitor" ("Applied Biosystems", США), 1 мкМ зворотного праймеру. Синтез тривав 120 хв. за температури 37° С. Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили в 30 мкл реакційної суміші, що містила 3 мкл кДНК, буферний розчин для ПЛР, по 200 мкМ кожного dNTP ("MBI Fermentas", Литва), по 1 мкМ кожного праймера, до 2,5 мМ $MgCl_2$ та 1,5 од. Taq ДНК полімерази ("iTaQ™", "Bio-Rad", США). Ампліфікацію фрагментів ДНК здійснювали за таких температурних умов: ініціююча денатурація 95° С – 3 хв.; далі 35 циклів (для *Actb* (ген β-актину, що використовується в якості внутрішнього контролю реакції завдяки конститутивній експресії) – 28 циклів): денатурація ДНК 95° С – 45 с.; гібридизація праймерів 45° С – 45 с для *Par2* (357 п. н.) та 49° С – 40 с. для *Actb* (521 п. н.); добування ланцюга 72° С – 1 хв. 15 с. (для *Par2*) або 1 хв. (для *Actb*). Після цього проводили добування ампліфікатів при 72° С – 5 хв.

У реакціях було використано такі послідовності праймерів: для *Par2* – прямий – GAATGCACCGGGACCCAA та зворотний – TCCCCATAGGTCCAGTCGTT; для *Actb* – прямий – TGGGACGATATGGAGAAGAT та зворотний – ATTGCCGATAGTGATGACCT. Відтворюваність результатів ампліфікації було перевірено в паралельних експериментах шляхом повторення ПЛР на кДНК усіх тварин, із кожним праймером не менше трьох разів. Розділення продуктів ПЛР проводили електрофоретично в 1,6% агарозному гелі ("Agarose LE", "Roche", Німеччина), у 0,5-кратному TBE-буферному розчині при напруженні електричного поля 5-10 В/см за Sambrook et al. [18]. Для напівкількісного аналізу експресії ампліконів на основі денситометрії було використано програму ImageJ 1.45s ("NIH", США). Індекси експресії гена визначали для кожного зразку за Konturek et al. [13].

Математичну та статистичну обробку результатів досліджень проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики на комп'ютері з використанням програмного пакету GraphPad Prism 5.04 (GraphPad Software Inc., США). Отримані дані тестували на нормальне розподілення за допомогою тесту Шапіро-Вілка. Подальший обрахунок результатів відбувався за допомогою двофакторного дисперсійного аналізу (two-way ANOVA) із пост тестом Бонферонні. Отримані результати наведені у вигляді середнього арифметичного ± середньоквадратичне відхилення (дисперсія) – SD. Результати вважали достовірними, коли $P \leq 0,05$.

Результати та їх обговорення. У результаті проведених нами експериментальних досліджень було виявлено експресію мРНК гена *Par2* (продукт 3Т-ПЛР розміром – 357 п.н.) у зразках епітеліоцитів ворсинок і крипти ДПК як контрольної, так другої групи тварин, які отримували мультипробіотик Симбітер (рис. 1).

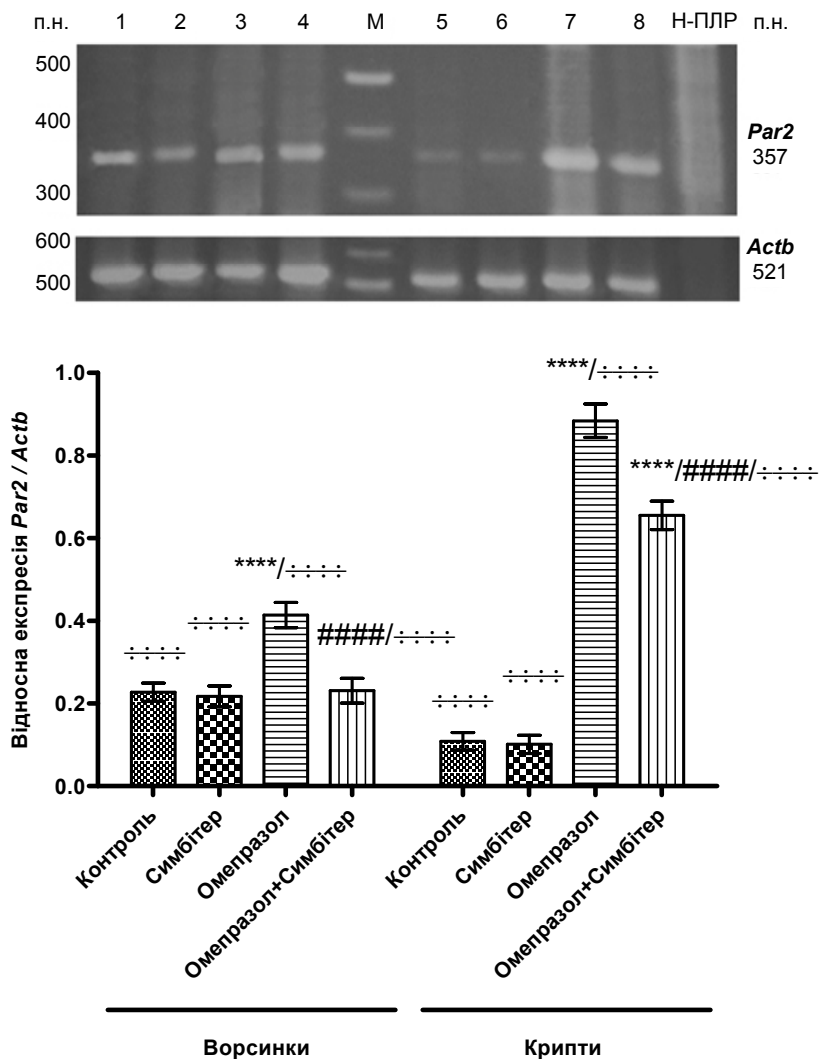


Рис. 1. Рівень експресії мРНК гена *Par2* в епітеліоцитах дванадцятипалої кишки щурів за умов тривалої гіпоацидності та при введенні мультипробіотика Симбітер

M – маркер молекулярної маси; епітеліоцити ворсинок: 1 – контроль; 2 – Симбітер; 3 – омепразол; 4 – омепразол + Симбітер; епітеліоцити крипти: 5 – контроль; 6 – Симбітер; 7 – омепразол; 8 – омепразол + Симбітер; Н-ПЛР – негативний контроль ПЛР; **** – $P \leq 0,0001$ відносно контролю; ##### – $P \leq 0,0001$ відносно тварин, яким вводили лише омепразол; ++++ – $P \leq 0,0001$ ворсинки порівняно з криптами.

Рівні експресії гена *Par2* в контрольній та другій групі епітеліоцитів крипти достовірно не відрізнялися, так само як і у ворсинках, на відміну від типів епітеліальних клітин. Рівні експресії цього гена в третій та четвертій

групах як ворсинок, так і крипти епітелію ДПК відрізнялися достовірно, так само як і між типами епітеліальних клітин ($P \leq 0,0001$) (рис. 1., табл. 1.).

Таблиця 1. Рівень експресії гена *Par2* в епітеліоцитах ДПК щурів за умов тривалої гіпоацидності та при введенні мультипробіотика Симбітер, ($m \pm SD$, $n=6$)

Група тварин	Типи епітеліоцитів	Відносна експресія <i>Par2/Actb</i>
Контроль	ворсинки	$0,227 \pm 0,0219$ ++++
	крипти	$0,108 \pm 0,0211$ ++++
Симбітер	ворсинки	$0,217 \pm 0,0250$ ++++
	крипти	$0,101 \pm 0,0222$ ++++
Омепразол	ворсинки	$0,414 \pm 0,0308$ ****/++++
	крипти	$0,884 \pm 0,0405$ ****/++++
Омепразол + Симбітер	ворсинки	$0,231 \pm 0,0299$ #####/++++
	крипти	$0,655 \pm 0,0344$ ****/#####/++++

Примітки: **** – $P \leq 0,0001$ порівняно з контролем;

– $P \leq 0,0001$ відносно тварин, яким вводили лише омепразол;

++++ – $P \leq 0,0001$ ворсинки порівняно з криптами.

Отримані результати (табл. 1, рис. 1) показали, що рівень експресії гена *Par2* був вищим в 1,8 раза ($P < 0,0001$) в епітеліоцитах ворсинок і в 8,2 раза

($P < 0,0001$) в епітеліоцитах крипти ДПК порівняно з контролем за умов тривалої шлункової гіпоацидності. У той же час, при одночасному введенні з омепразолом мульті-

типробіотику Симбітер рівень відповідної мРНК був в 1,8 та 1,4 раза нижчим, ніж у тварин третьої групи ($P < 0,0001$).

Встановлене зростання рівня мРНК гена *Par2* за умов тривалої шлункової гіпохлоргідрії в епітеліоцитах ворсинок та крипт ДПК щурів може свідчити про передчасну активацію протеолітичних ферментів, зокрема трипсину, що являється домінуючим активатором PAR2 [14]. Так, встановлене підвищення рівня мРНК гена *Par2* узгоджується з попередніми даними [2], де було продемонстровано зростання трипсинової активності в гомогенаті підшлункової залози щурів, оскільки трипсин є одним з основних природних активаторів PAR2 поряд із триптазою мастоцитів [2]. Більш того, встановлена наявність активованих катіонних ізоформ панкреатичних протеаз у панкреатичному соці [2] також може бути наслідком посиленої експресії гена *Par2*, оскільки активація PAR2 сприяє підвищенню секреції панкреатичного соку з розчиненими в ньому гідролазами. Крім того, активація PAR2 може викликати підвищену секрецію панкреатичного соку з розчиненими в ньому гідролазами з протоки в ДПК. Одночасно показано здатність PAR2 посилювати моторику ДПК [15]. Також підвищена експресія гена *Par2* узгоджується з нашими попередніми результатами [8, 9], де показано збільшення експресії генів регенеративних білків *Reg1α* та *TGF-β1* за тих же умов. Окрім цього, підвищений рівень експресії гена *Par2* за умов тривалої шлункової гіпоацидності в епітеліоцитах як ворсинок, так і крипт ДПК щурів може свідчити про розвиток запального процесу, оскільки відомо, що PAR2 також активується триптазами тучних клітин [5]. Це підтверджує посилену міграцію лейкоцитів у тканини органа з подальшим зростанням вмісту прозапальних цитокінів, синтезу молекул клітинної адгезії, проникності судин та генерації активних форм кисню в клітинах епітелію ДПК [5].

Отже, встановлені зміни експресії гена *Par2* в епітеліоцитах ворсинок та крипт за умов тривалої шлункової гіпоацидності свідчать про розвиток патологічних процесів у тканині ДПК, зокрема запалення. Різні рівні експресії та змін експресії проаналізованого гена в епітеліальних клітинах ворсинок та крипт обумовлені структурно-функціональними особливостями клітин ДПК [3]. Адже відомо, що на ранніх стадіях запальних захворювань тонкої кишки, зокрема ДПК, у першу чергу пошкоджуються епітеліоцити крипт за рахунок міграції нейтрофілів із судин у просвіт крипт, що призводить до формування криптових абсцесів [4].

Нормалізація цього показника при застосуванні мультіпробіотичного препарату, з одного боку, свідчить про відсутність передчасно активованих протеаз, а з іншого – може вказувати на важливу роль дисбіотично-запального шляху в розвитку пошкоджень в епітеліоцитах ДПК за умов тривалої гіпохлоргідрії, оскільки відомо, що рецептор PAR2 також активується бактеріальними протеазами [5]. Щодо можливих механізмів впливу мультіпробіотика Симбітер на експресію генів у ДПК, перш за все, слід зазначити його здатність ліквідовувати бактеріальну колонізацію ШКТ та дисбіоз, що знімає з ШКТ та асоційованих органів навантаження з боку патогенної мікрофлори [1, 7]. Також продукти життєдіяльності бактеріальних штамів, які представлені в препараті Симбітер (вітаміни, екзополісахариди, коротколанцюгові жирні кислоти, імуномодулятори тощо) володіють антиоксидантними властивостями, завдяки чому вони здатні гальмувати розвиток окисного стресу та знижувати інтенсивність запальних і деструктивних процесів у ДПК [8, 9, 12, 16]. Крім того, нещодавно у літературі з'явилися дані про зниження рівня гастрину в крові за умов тривалого введення Симбітеру [1]. Таким чином, можна

припустити, що встановлені в нашому дослідженні ефекти Симбітеру пов'язані не лише з нормалізацією мікробіоценозу ШКТ, але також з обмеженням прояву гіпергастринемії [1, 16]. Проте остаточне підтвердження або спростування цього припущення потребує проведення дослідження із застосуванням селективних антагоністів гастринового рецептора, що, у свою чергу, дозволить чітко відмежувати наслідки гіпергастринемії та бактеріальної колонізації ШКТ.

Висновки:

Нами показано, що стан експериментальної тривалої шлункової гіпоацидності супроводжується зміною характеру експресії гена *Par2* в епітеліоцитах дванадцятипалої кишки щурів. При введенні мультіпробіотика Симбітер за тих самих умов рівень експресії цього гена в епітеліоцитах крипт зменшується, у той час як патерн експресії зазначеного гена в ворсинках подібний до контролю. Отримані дані можуть свідчити про залучення гена *Par2* в розвиток запального процесу в ДПК за рахунок дисбіотичних змін за умов тривалої гіпохлоргідрії.

Список використаних джерел

1. Абдулахад К.Ф.А. Дослідження впливу мультіпробіотиків групи "Симбітер" на секреторну функцію шлунка у щурів в умовах тривалої гіпергастринемії: автореф. дис. канд. біол. наук: 03.00.13 / Абдулахад Кусай Ф. Абдулахад; Київ: нац. ун-т ім. Тараса Шевченка. – К., 2012. – 20 с.
2. Вакал С.Є. Біохімічні механізми пошкодження підшлункової залози щурів за умов тривалого пригнічення кислотної секреції шлунка: автореф. дис. канд. біол. наук: 03.00.04 / Вакал Сергій Євгенович; Київ: нац. ун-т ім. Тараса Шевченка. – К., 2013. – 20 с.
3. Alam T., Kenny D., Sweeney T., Buckley F., Prendiville R., McGee M., Waters S. Expression of genes involved in energy homeostasis in the duodenum and liver of Holstein-Friesian and Jersey cows and their F(1) hybrid // *Physiol Genomics*. – 2012. – Vol. 44 (2). – P. 198-209.
4. Barrett K., Ghishan F., Merchant J. etc. Physiology of the gastrointestinal tract. 4th edition. – New York: Academic Press, 2006. – 2080 p.
5. Bueno L. Protease activated receptor 2: a new target for IBS treatment // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* – 2008. – Vol. 12 (1). – P. 95-102.
6. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction // *Anal. Biochem.* – 1987. – Vol. 162. – P. 156-159.
7. Culligan E., Hill C., Sleator R. Probiotics and gastrointestinal disease: successes, problems and future prospects // *Gut Pathogens*. – 2009. – Vol. 1, N 19. – P. 38-49.
8. Dranitsina A., Dvorshchenko K., Savko U., Ostapchenko L. Expression of *Reg1a* gene in rat duodenal upon long-term hypoacidity and with administration of multiprobiotic "Symbiter®" acidophilic concentrated // *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kiev. Series Biology*. – 2013. – Vol. 2 (64). – P. 5-8.
9. Vakal S. E., Dvorshchenko K. O., Dranitsina A. S., Borodina T. V., Ostapchenko L. I. Expression of *Cckbr*, *Gast*, *Reg1a*, *Tgfb1* genes in rat pancreas upon long-term hypoacidity and with administration of multiprobiotic "Symbiter® acidophilic" concentrated // *Biopolym. Cell.* – 2012. – Vol. 28, N 6. – P. 376-383.
10. Gorelick F. Pancreatic protease-activated receptors: friend and foe // *F. Gorelick // Gut*. – 2007. – Vol. 56. – P. 901-902.
11. Flint N., Cove F.L., Evans G.S.H. A low-temperature method for the isolation of small-intestinal epithelium along the crypt-villus axis // *Biochem J.* – 1991. – Vol. 280 (Pt 2). – P. 331-334.
12. Iankovsky D., Dymant G. Microbiota and human health. – Kyiv: LLC Chervona Ruta-Turs, 2008. – 552 p.
13. Konturek P., Brzozowski T., Pierzchalski P. et al. Activation of genes for spasmolytic peptide, transforming growth factor alpha and for cyclooxygenase COX-1 and COX-2 during gastric adaptation to aspirin damage in rats // *Aliment. Pharmacol. Ther.* – 1998. – Vol. 12 (8). – P. 767-777.
14. Kawabata A., Kinoshita M., Nishikawa H., Kuroda R., Nishida M., Araki H., Arizono N., Oda Y., Kakehi K. The protease-activated receptor-2 agonist induces gastric mucus secretion and mucosal cytoprotection // *J Clin Invest* – 2001. – Vol. 107 (11). – P. 1443-1445.
15. Kawabata A., Kuroda R., Nishikawa H., Kawai K. Modulation by protease-activated receptors of the rat duodenal motility in vitro: possible mechanisms underlying the evoked contraction and relaxation // *Br J Pharmacol* – 1999. – Vol. 128 (4). – P. 865-872.
16. Lutgendorf F., Trullsson L. M., van Minnen L. P., Rijkers G. T., Timmerman H. M., Franzén L. E., Gooszen H. G., Akkermans L. M., Söderholm J. D., Sandström P. A. Probiotics enhance pancreatic glutathione biosynthesis and reduce oxidative stress in experimental acute pancreatitis // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2008. – 295, N 5. – P. 1111-1121.
17. Ritchie E., Saka M., MacKenzie C., Drummond R., Wheeler-Jones C., Kanke T., Plevin R. Cytokine upregulation of proteinase-activated receptors 2 and 4 expression mediated by p38 MAP kinase and inhibitory kappa B

kinase human endothelial cells // British Journal of Pharmacology. – 2007. – Vol. 150. – P. 1044 – 1054.

18. Sambrook J., Russell D. Molecular cloning: a laboratory manual. – Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3rd edition, 2000. – 2344 p.

19. Shin J., Vagin O., Munson K., Munson K., Kidd M., Modlin I. M., Sachs G. Molecular mechanisms in therapy of acid-related diseases // Cell. Mol. Life Sci. – 2008. – 65, N 2. – P. 264-281.

20. Sundstrom A., Blomgren K., Alfredson L., Wiholm B. Acid-suppressing drugs and gastroesophageal reflux disease as risk factors for

acute pancreatitis – results from a Swedish Case-Control Study // Pharmacoepidemiology and drug safety. – 2006. – 15, N 3. – P. 141-149.

21. Thomson A., Sauve M., Kassam N., Kamitakahara H. Safety of long-term use of proton pump inhibitors // World J. Gastroenterol. – 2010. – 16, N 19. – P. 2323-2330.

22. Tsyriuk O.I., Beregova T.V. Effect of omeprazole-induced hypergastrinemia on the basal gastric secretion in rats // Bulletin of biological and medical issues. – 2007. – № 3. – P. 38-43.

Надійшла до редколегії 20.06.14

А. Драницина, канд. біол. наук, У. Савко, асп., Е. Дворщенко, канд. біол. наук, А. Моргаєнко, канд. біол. наук, В. Верещака, д-р біол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА PAR2 В ЭПИТЕЛИОЦИТАХ ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ КРЫС ПРИ ДЛИТЕЛЬНОЙ ЖЕЛУДОЧНОЙ ГИПОАЦИДНОСТИ И ПРИ ВВЕДЕНИИ МУЛЬТИПРОБИОТИКА СИМБИТЕР

Показано увеличение уровня экспрессии гена Par2 в эпителиоцитах ворсинок и крипт двенадцатиперстной кишки крыс в гипоацидных условиях. При введении мультипробиотика Симбистер в тех же условиях уровень экспрессии данного гена в эпителиоцитах ворсинок был на уровне контрольных значений, в то время как уменьшался в 1,4 раза в криптах.

Ключевые слова: желудочная гипоацидность, двенадцатиперстная кишка, крысы, экспрессия гена Chga, мультипробиотик.

A. Dranitsina, PhD., U. Savko, PhD stud., K. Dvorchshenko, PhD., O. Morgaienko, PhD., V. Vereschaka, DSc.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

EXPRESSION OF PAR2 GENE IN RAT DUODENAL UPON LONG-TERM HYPOACIDITY AND WITH ADMINISTRATION OF MULTIPROBIOTIC SYMBITER

The increasing of Par2 gene's expression in rat duodenal villus and crypt epithelial cells upon gastric hypoacidic conditions was shown. The level of Chga expression was similar to the control value in villus while it was decreased (in 1.4 times) in crypt epitheliocytes upon treatment of hypoacidic rats with multiprobiotic Symbiter.

Keywords: gastric hypoacid, duodenum, rat, expression gene Chga, multiprobiotic.

УДК 615.339:616-002.2

Д. Голишкін, асп., О. Вірченко, асп., Т. Фалалєєва, д-р біол. наук,
Т. Галенова, канд. біол. наук, О. Савчук, д-р біол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ВМІСТ ЦИТОКІНІВ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ДІЇ СТРЕСУ ТА ВВЕДЕННЯ МЕЛАНІНУ

Було вивчено вміст прозапальних та антизапальних цитокінів у сироватці крові щурів за умов стресу та введення меланіну. Встановлено, що меланін зменшує рівень прозапальних цитокінів інтерлейкіну (ІЛ) – 1 β , ІЛ-12В р40, інтерферону- γ та фактору некрозу пухлин- α в сироватці крові щурів за умов стресу. Меланін також посилює антизапальні ІЛ-4 та ІЛ-10. Отримані результати свідчать про зменшення запалення під впливом досліджуваної сполуки за умов стресу. Антизапальні властивості меланіну є одним з механізмів стресадаптогенної та антивиразкової дії даної сполуки.

Ключові слова: меланін, стресові виразки, цитокіни, антизапальний ефект.

Вступ. Стресові виразки є проблемою важких хворих, які перебувають у відділеннях інтенсивної терапії і реанімації та викликають значну смертність хворих у критичному стані [1]. Особливо часто ці ускладнення виникають у хворих і потерпілих на тлі важкої серцевої – судинної, дихальної, печінкової і ниркової недостатності, а також при розвитку гнійно-септичних ускладнень. Гострі ерозії та виразки шлунково-кишкового тракту нерідко ускладнюються кровотечею або перфорацією. Частота виникнення стресових виразок шлунка та дванадцятипалої кишки у пацієнтів після поранень становить 27%, у пацієнтів з механічною травмою – 67%. Загальна частота виникнення стресових виразок становить 58%. Загальна летальність при ускладнених гострих ерозіях і виразках травного тракту залишається дуже високою і, за даними різних авторів, коливається від 35 до 95% [1].

Ключовими патогенетичними механізмами стресових виразок є зниження кровотоку в слизовій оболонці шлунка (СОШ) і ацидопептична агресія [2]. Провідна роль у профілактиці і терапії стресових виразок належить лікарським засобам, що істотно знижують продукцію гідрохлоридної кислоти, а отже, і активність пепсину. З появою в арсеналі кислотосупресивних засобів інгібіторів протонної помпи (ІПП) використовували раніше з цією метою антациди і H₂ – блокатори в даний час визнані недостатньо ефективними [3, 4].

В результаті численних порівняльних рандомізованих досліджень встановлено перевагу ІПП в здатності блокувати продукцію гідрохлоридної кислоти, збільшувати швидкість рубцювання виразок і ерозій, знижувати частоту хірургічних втручань і рецидивів кровотеч при пептичних виразках, а також підвищувати ефективність ерадикаційної терапії при інфекції, викликаній *Helicobacter pylori* [5, 6]. Проте тривале застосування блокаторів призводить також до збільшення розміру, ваги і кількості парієтальних клітин, зменшення кількості головних клітин СОШ і зниження синтезу мРНК пепсиногену. Основним негативним ефектом застосування інгібіторів протонної помпи є розвиток онкогенних процесів у СОШ [7].

Хоча на сьогодні розроблені і широко використовуються для лікування виразкової хвороби шлунка та дванадцятипалої кишки досить ефективні фармакологічні засоби, арсенал засобів для профілактики розвитку та рецидивів виразкової хвороби обмежений. Аналіз сучасної літератури та наші попередні дані дозволяють стверджувати, що можливими перспективними засобами профілактики стресових уражень СОШ і дванадцятипалої кишки будуть речовини природного походження на основі поліфенольних сполук. До таких речовин належить меланін, який є продуктом життєдіяльності чорних дріжджів *Nadsoniella nigra* штам X-1, висіяних з вертикальних скель о.Галіндез (Українська Антарктична станція акаде-

мік Вернадський). Меланін даного походження на 95% складається з поліфенолкарбонового комплексу.

В попередніх роботах нами було встановлено цитопротекторну дію меланіну та антиоксидантні його властивості [8, 9], що роблять перспективним використання меланіну для профілактики розвитку стресових уражень СОШ та для лікування пацієнтів з виразковою хворобою шлунка та дванадцятипалої кишки, які є нечутливими до традиційних схем лікування. Стрес, як фізичний, так і психологічний, здійснює значний вплив на імунну систему людини і тварин [10, 11]. Ушкодження СОШ за умов дії стресу викликає запалення та призводить до активації імунної системи організму. У першу чергу включаються регуляторні Т-лімфоцити – Т-хелпери 1 типу, які підвищують активність макрофагів. Останні продукують прозапальні цитокіни – інтерферон (ІНФ) – γ , фактор некрозу пухлин (ФНП) – α , інтерлейкіни (ІЛ) – ІЛ-1, ІЛ-2, ІЛ-6 та ін. Дані прозапальні цитокіни посилюють уражувачий вплив стресу на СОШ [12]. Тому метою роботи було дослідити вплив меланіну на вміст цитокінів у сироватці крові щурів за умов дії нервово-м'язового напруження та введення меланіну.

Матеріали і методи. Дослідження проводилися на 30 білих нелінійних щурах, самках, масою 140-160 г з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей [13]. Тварини були розділені на 3 групи по 10 тварин у кожній.

Схема експерименту була наступною:

1 група – контрольна. Тваринам за 15 хвилин перед початком дослідів внутрішньошлунково (в.ш.) вводили воду об'ємом 0,5 мл на щура.

2 група – стрес контроль: щури, яких умертвляли через 2 години від закінчення 3-годинної іммобілізації. Тваринам за 15 хвилин перед початком дослідів в.ш. вводили воду об'ємом 0,5 мл на щура.

3 група – стрес+меланін: щури, яких умертвляли через 2 години від закінчення 3-годинної іммобілізації. Тваринам за 15 хвилин перед початком дослідів в.ш. вводили меланін в дозі 5 мг/кг, розчинений у воді об'ємом 0,5 мл на щура.

Стресові ураження викликали методом нервово-м'язового напруження за Сельє. Даний метод рекомендований Державним фармакологічним центром України при проведенні доклінічних досліджень стреспротекторної дії фармакологічних засобів [14]. За даною методикою щурів іммобілізували на операційному століку на спині, атравматично фіксуючи за кінцівки. Тривалість іммобілізації складала 3 години. Через 2 години після припинення знерухомлення тварин умертвляли за допомогою цервікальної транслокації. Збирали кров для підготовки сироватки. Кров збирали в пробірки, відстоювали впродовж 30 хв та центрифугували 10 хв за 1000 g, після чого здійснювали відбір сироватки.

Визначали в сироватці крові щурів вміст прозапальних цитокінів (ІЛ-1 β , ІЛ-12В р40, ІНФ- γ , ФНП- α) та антизапальних цитокінів (ІЛ-4 та ІЛ-10) методом імуноферментного аналізу. Імуноферментний аналіз проводили у мікропланшетах із сорбційною здатністю за стандартною методикою для розчинних білків [15]. Матеріалом дослідження були солубілізовані фракції сироватки щурів,

білковий матеріал якої використовували як специфічні антигени (досліджувані цитокіни) до відповідних антитіл. Для визначення ІЛ-4 та ІЛ-10 використовували мишині моноклональні антитіла (Sigma), для ІЛ-12В р40 – кролячі поліклональні антитіла (Sigma), для ІЛ-1 β та ІНФ- γ – козячі поліклональні антитіла (Sigma). Антигени розводили 50 мМ Трис-НСІ буфером (рН 7,4), що містив 130 мМ NaCl, до концентрації 10 мкг/мл та інкубували у комірках планшетів протягом 60 хв при 37°C та постійному перемішуванні. Для видалення антигена, що не зв'язався, комірки відмивали Трис-НСІ буфером (рН 7,4), що містив 130 мМ NaCl. Надалі інкубацію проводили у 50 мМ Трис-НСІ буфері (рН 7,4), що містив 130 мМ NaCl (робочий буфер). Для блокування неспецифічних місць зв'язування використовували 3% розчин знежиреного молока або 2% розчин БСА. Комірки відмивали робочим буфером з вмістом 0,05% Твіну-20 та інкубували з розчином первинних антитіл протягом 60 хвилин при 37°C. Надалі проводили відмивку робочим буфером з вмістом 0,05% Твіну-20 та інкубували з вторинними антитілами (антимишиними, антикролячими або антикозячими), кон'югованими з лужною фосфатазою протягом 60 хвилин при 37°C. По закінченні інкубації комірки знову відмивали робочим буфером з вмістом 0,05% Твіну-20 та інкубували з субстратом для лужної фосфатази (1 мг/мл рNPP у 10% диетаноламіні, рН 9,8) при 37°C протягом 60 хв. Вимірювали оптичну густину при довжині хвилі 405 нм (робоча хвиля) та 492 нм (похибка вимірювання) на мікропланшетному спектрофотометрі "Synergy" (BioTek, США). Вміст антигену, специфічного до відповідних первинних антитіл, у досліджуваних зразках розраховували як різницю екстинцій при 405 нм та 492 нм і виражали в умовних одиницях (ум.од.).

Одержані результати перевіряли на нормальність розподілу за допомогою W тесту Шапіро-Вілка. Оскільки наші дані виявилися нормально розподілені, порівняння вибірок проводилися за допомогою t-критерію Стюдента для незалежних вибірок. Розраховували середнє значення (M), похибку середнього значення (m). Значущими вважали відмінності при $p \leq 0,05$.

Результати та обговорення. Встановлено, що в результаті дії стресу, викликаного нервово-м'язовим напруженням за Сельє, в сироватці крові щурів зростає вміст прозапальних цитокінів. Так, у групі стрес-контролю рівень ІЛ-1 β становив $0,735 \pm 0,042$ у.о., що перевищувало контрольні показники на 35% ($P < 0,001$) (рис. 1а). Вміст ІЛ-12В р40 під впливом стресу зростає до $0,460 \pm 0,021$ у.о., що більше на 28% ($P < 0,01$) порівняно з інтактним контролем (рис. 1б). У сироватці крові щурів після стресу значно збільшувався вміст ІНФ- γ (стрес-контроль проти інтактного контролю $0,521 \pm 0,044$ у.о. vs $0,348 \pm 0,029$ у.о., $P < 0,01$) (рис. 2а). За умов дії стресу вміст ФНП- α також був підвищений на 50% ($P < 0,01$) порівняно з інтактним контролем ($P < 0,01$) (рис. 2б). Отримані дані узгоджувалися з результатами, отриманими Hsu et al., 2013, які показали зростання прозапальних ФНП- α та ІЛ-1 β в СОШ щурів після 4-годинного водно-іммобілізаційного стресу [12].

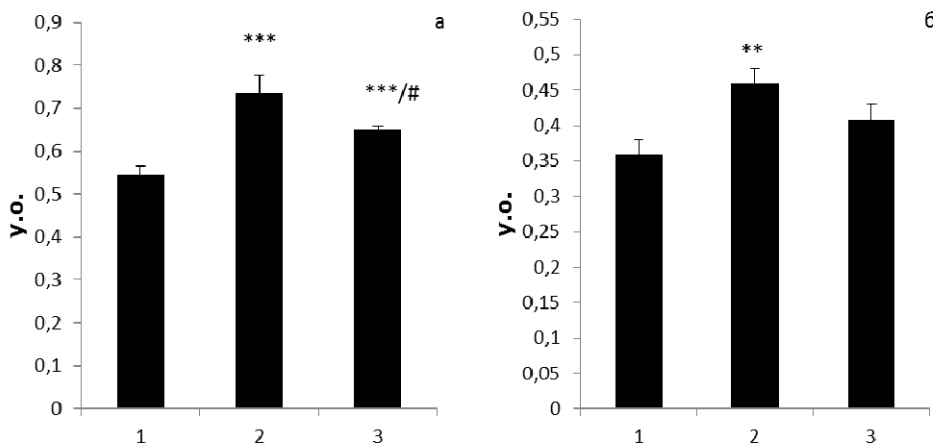


Рис. 1. Вміст інтерлейкіну 1β (а) та інтерлейкіну 12В р40 (б) в сироватці крові щурів за умов виразкоутворення, викликаного нервово-м'язовим напруженням за Сельє, та введення меланіну ($M \pm m$, $n=10$ в кожній групі):
1 – інтактний контроль, 2 – стрес-контроль, 3 – стрес+меланін

Примітка: ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ щодо інтактного контролю; # – $p < 0,05$ щодо стрес-контролю

Меланін, за умов його введення за 30 хв до стресу, зменшував вміст прозапальних цитокінів у сироватці крові щурів. Так, рівень ІЛ-1β знижувався до $0,651 \pm 0,009$ у.о., або на 12% ($P < 0,05$) щодо до групи стрес-контролю (рис. 1а), хоча вміст даного інтерлейкіну залишався більшим за відповідний показник інтактних щурів. Вміст ІЛ-12В р40 зменшувався до рівня інтактних щурів, проте значущо не відрізнявся від групи стрес-контролю (рис.

1б). Подібні результати були виявлені щодо вмісту ІНФ-γ: даний цитокін при введенні меланіну значущо не відрізнявся як від групи інтактного контролю, так і стрес-контролю (рис. 2а). Найбільш значний вплив меланін здійснював на вміст ФНП-α. В групі стрес+меланін даний показник складав $0,335 \pm 0,034$, що значуще менше на 23% ($P < 0,05$) порівняно з групою стрес-контролю та не відрізняється від рівня інтактних щурів (рис. 2б).

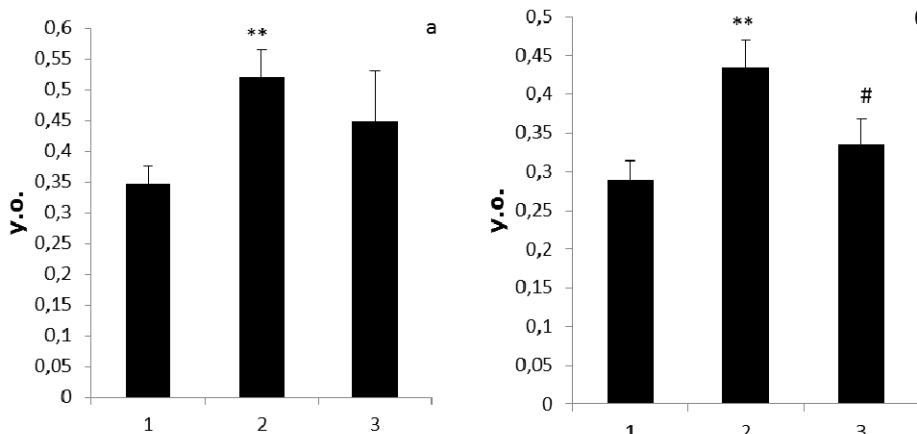


Рис. 2. Вміст інтерферону γ (а) та фактору некрозу пухлин-α (б) в сироватці крові щурів за умов виразкоутворення, викликаного нервово-м'язовим напруженням за Сельє, та введення меланіну ($M \pm m$, $n=10$ в кожній групі):
1 – інтактний контроль, 2 – стрес-контроль, 3 – стрес+меланін

Примітка: ** – $p < 0,01$ щодо інтактного контролю; # – $p < 0,05$ щодо стрес-контролю

При дослідженні рівня антизапальних цитокінів ІЛ-4 та ІЛ-10 після нервово-м'язового напруження за Сельє встановлено, що вміст ІЛ-4 після стресу незначно підвищувався на 16% ($P < 0,05$) щодо інтактного контролю (рис. 3а). Це може бути компенсаторною реакцією імунної системи у відповідь на запальну реакцію за умов стресу. Вміст ІЛ-10 в сироватці крові щурів одразу після дії стресу не змінювався (рис. 3б). За умов введення меланіну вміст ІЛ-4 в групі стрес+меланін становив $0,194 \pm 0,015$ у.о., що більше на 22% ($P < 0,05$) щодо стрес контролю та на 42% ($P < 0,01$) щодо інтактного

контролю (рис. 3а). Меланін також підвищував показники вмісту ІЛ-10 на 27% ($P < 0,05$) порівняно зі стрес контролем і на 21% ($P < 0,01$) порівняно з інтактним контролем (рис. 3б). Отже, отримані результати свідчать про антизапальний вплив досліджуваної сполуки за умов введення її до моделювання стресу. Посилення виділення ІЛ-4 та ІЛ-10 під впливом меланіну може бути одним з механізмів зменшення вмісту прозапальних цитокінів ІЛ-1β, ІЛ-12В р40, ІНФ-γ та ФНП-α в сироватці крові щурів за умов стресу.

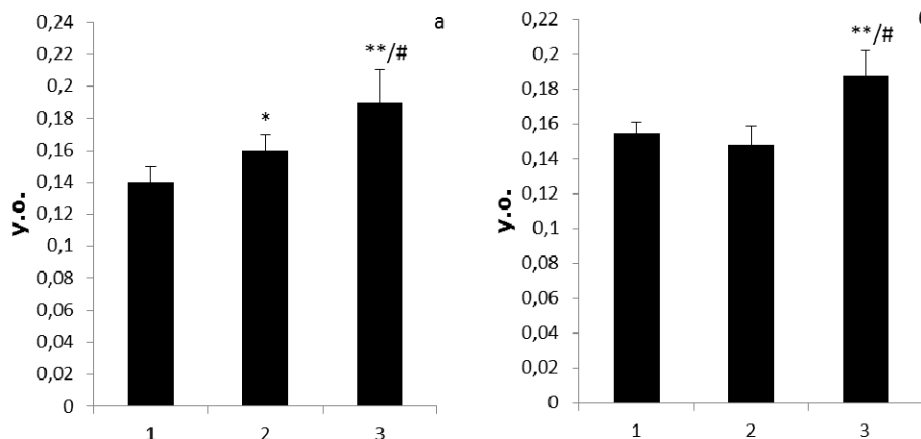


Рис. 3. Вміст інтерлейкіну 4 (а) та інтерлейкіну 10 (б) в сироватці крові щурів за умов виразкоутворення, викликаного нервово-м'язовим напруженням за Сельє, та введення меланіну ($M \pm m$, $n=10$ в кожній групі): 1 – інтактний контроль, 2 – стрес-контроль, 3 – стрес+меланін

Примітка: *, ** – $p < 0,05$, $p < 0,01$ щодо інтактного контролю; # – $p < 0,05$ щодо стрес-контролю

Отримані нами дані узгоджуються з дослідженнями інших авторів. Mohaghehpour et al. (2001) в *in vitro* дослідженнях встановили, що синтетичний меланін в не-токсичних концентраціях пригнічував експресію прозапальних цитокінів ІЛ-1 β , ІЛ-6 і ФНП- α моноцитами периферичної крові людини [16]. Механізмом такої дії вважають вплив на посттрансляційні процеси утворення даних цитокінів. В даній роботі нами досліджені антизапальні ефекти меланіну природного походження за умов стресу на *in vivo* моделях. Враховуючи результати наших попередніх досліджень про стресадаптогенну дію меланіну [9], можна зробити заключення, що вплив сполуки на цитокіновий профіль є одним з проявів її стресадаптогенної дії та механізмом підтримання гомеостазу СОШ за умов дії стресу. Варто відзначити, що меланін – це поліфенольна сполука, тому його ефекти на цитокіновий профіль можуть бути обумовлені впливом на експресію ядерних рецепторів PPAR [17, 18], участь яких у протизапальних процесах на сьогодні чітко встановлена [19, 20]. Дані механізми потребують подальших досліджень.

Висновки:

1. Меланін зменшує вміст прозапальних цитокінів ІЛ-1 β , ІЛ-12 β р40, ІНФ- γ та ФНП- α та збільшує вміст антизапальних цитокінів ІЛ-4 та ІЛ-10 в сироватці крові щурів за умов стресу.

2. Антизапальні ефекти меланіну є одним з механізмів його стресадаптогенної та антивиразкової дії.

Список використаних джерел

1. The attributable mortality and length of intensive care unit stay of clinically important gastrointestinal bleeding in critically ill patients / D. J. Cook [et al.] // Crit Care. – 2001. – Vol.5, № 6. – P.368-375.
2. Профилактика стресс-повреждений желудочно-кишечного тракта у больных в критических состояниях / Б. Р. Гельфанд [и др.] // Consilium medicum. – 2005. – Т.7, № 6. – С.464-467.
3. A model for integrative study of human gastric acid secretion / I.M. Joseph [et al.] // J Appl Physiol (1985). – 2003. – Vol.94, № 4. – P.1602-1618.
4. Tryba M. Sucralfate versus antacids or H2-antagonists for stress ulcer prophylaxis: a meta-analysis on efficacy and pneumonia rate / M. Tryba // Crit Care Med. – 1991. – Vol.19, № 7. – P.942-949.
5. Gastrointestinal peptic ulcer and Helicobacter pylori infection in children and adolescents / P. F. Bittencourt [et al.] // J Pediatr (Rio J). – 2006. – Vol.82, № 5. – P.325-334.

6. Stress ulcer prophylaxis in critically ill patients: a randomized controlled trial / I. Kantorova [et al.] // Hepatogastroenterology. – 2004. – Vol.51, № 57. – P.757-761.

7. Eslami L. Meta-analyses: does long-term PPI use increase the risk of gastric premalignant lesions? / L. Eslami, S. Nasser-Moghaddam // Arch Iran Med. – 2013. – Vol.16, № 8. – P.449-458.

8. Savytsky Y. Influence of melanin on the lesion in the gastric mucosa of rats caused by neuro-muscular tension by Selye / Y. Savytsky, D. Golyskin, T. Falalyeyeva // Annales universitatis Mariae Curie-Skłodowska. Lublin-Polonia, Sectio DDD. – 2010. – Vol.XXIII, № 1. – P.251-255.

9. Голишкін Д. В. Вплив меланіну на ураження в слизовій оболонці шлунка щурів, викликані методом нервово-м'язового напруження за Сельє / Д. В. Голишкін [та ін.] // Вісник проблем біології і медицини. – 2010. – № 1. – С.47-51.

10. Chronic restraint stress promotes lymphocyte apoptosis by modulating CD95 expression / D. Yin [et al.] // J Exp Med. – 2000. – Vol.191, № 8. – P.1423-1428.

11. Chronic restraint stress promotes immune suppression through toll-like receptor 4-mediated phosphoinositide 3-kinase signaling / Y. Zhang [et al.] // J Neuroimmunol. – 2008. – Vol.204, № 1-2. – P.13-19.

12. Protective effect of 3,4-methylenedioxyphephenol (sesamol) on stress-related mucosal disease in rats / D. Z. Hsu [et al.] // Biomed Res Int. – 2013. – Vol.213, № 1. – P.481827.

13. Rozemond H. Laboratory animal protection: the European Convention and the Dutch Act / H. Rozemond // Vet Q. – 1986. – Vol.8, № 4. – P.346-349.

14. Стефанов О. В. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації / О. В. Стефанов – Київ: Авіцена, 2001. – 528 с.

15. Crowther J. R. The ELISA Guidebook. Second Edition / J. R. Crowther – Vienna: Humana Press, 2009. – 574 с.

16. Synthetic melanin suppresses production of proinflammatory cytokines / N. Mohaghehpour [et al.] // Cell Immunol. – 2000. – Vol.199, № 1. – P.25-36.

17. Chrysanthemum morifolium extract attenuates high-fat milk-induced fatty liver through peroxisome proliferator-activated receptor alpha-mediated mechanism in mice / Y.Cui [et al.] // Nutr Res. – 2014. – Vol.34, № 3. – P.268-275.

18. Schluesener J. K. Plant polyphenols in the treatment of age-associated diseases: revealing the pleiotropic effects of icariin by network analysis / J. K. Schluesener, H. Schluesener // Mol Nutr Food Res. – 2013. – Vol.58, № 1. – P.49-60.

19. El-Sheikh A. A. Peroxisome Proliferator Activator Receptor (PPAR)- gamma Ligand, but Not PPAR-alpha, Ameliorates Cyclophosphamide-Induced Oxidative Stress and Inflammation in Rat Liver / A. A. El-Sheikh, R. A. Rifaai // PPAR Res. – 2014. – Vol.2014, № 1. – P.626319.

20. Metabolic nuclear receptor signaling and the inflammatory acute phase response / N. Venteclef [et al.] // Trends Endocrinol Metab. – 2011. – Vol.22, № 8. – P.333-343.

Надійшла до редколегії 10.06.14

Д. Голишкин, асп., А. Вирченко, асп., Т. Фалалеева, д-р биол. наук, Т. Галенова, канд. биол. наук, А.Савчук, д-р биол. наук
КНУ имени Тараса Шевченко, Киев

СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВИЯ СТРЕССА И ВВЕДЕНИЯ МЕЛАНИНА

Было изучено содержание провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови крыс в условиях стресса и введения меланина. Установлено, что меланин уменьшал уровень провоспалительных цитокинов интерлейкина (ИЛ) – 1 β , ИЛ-12 β p40, интерферона- γ и фактора некроза опухолей- α в сыворотке крови крыс в условиях стресса. Одним из эффектов меланина на иммунную систему было также усиление выделения противовоспалительных ИЛ-4 и ИЛ-10. Полученные результаты свидетельствуют об уменьшении воспаления под влиянием исследуемого соединения в условиях стресса. Противовоспалительные свойства меланина являются одним из механизмов стрессадаптогенного и антиязвенного действия данного соединения.

Ключевые слова: меланин, стрессовые язвы, цитокины, противовоспалительный эффект.

D. Golyshkin, PhD stud., O. Virchenko, PhD stud., T. Falalyeyeva, DSc., T. Halenova, PhD., O. Savchuk, DSc.
Taras Shevchenko National University of Kyiv

THE CYTOKINES CONTENT IN THE RATS SERUM UNDER STRESS AND ADMINISTRATION OF MELANIN

It was investigated proinflammatory and anti-inflammatory cytokines content in the rats serum under stress and administration of melanin. It was established that melanin reduced proinflammatory cytokines interleukin (IL) – 1 β , IL-12 β p40, interferon- γ and tumor necrosis factor- α in the rats serum under stress. Another effect of melanin on the immune system was the increase of anti-inflammatory IL-4 and IL-10 release. The findings suggest attenuation of inflammation under the influence of a test compound in stress conditions. The anti-inflammatory properties of melanin are one of the mechanism of stress-adaptive and anti-ulcer action of the compound.

Keywords: melanin, stress ulcers, cytokines, anti-inflammatory effect.

УДК 591.481.3

В. Пшиченко, преподаватель
Николаевский национальный университет им. В.А. Сухомлинского, Николаев

ГИСТОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ЭПИФИЗА КРЫС В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО СТРЕССА

Целью данного исследования анализ влияния хронического стресса на гистофизиологическое состояние эпифиза крыс. Материалом для исследования служили эпифизы 24 самцов крыс линии Вистар. Выявлено, что в ответ на экспериментальные условия происходят гистофизиологические изменения паренхимы органа, которые выражаются в компактном расположении пинеалоцитов, увеличении количества темных пинеалоцитов, занимающих преимущественно апикальную часть эпифиза, чрезмерном заполнении ядер светлых пинеалоцитов конденсированным хроматином и слабо выраженными процессами гидратации. Результаты гистологического исследования свидетельствуют о низкой функциональной активности эпифиза.

Ключевые слова: эпифиз, стресс, пинеалоциты.

Вступ. В последние десятилетия наблюдается углубление уровней исследования функций эпифиза и его гормона – мелатонина при различных физиологических и патологических состояниях организма [3, 10, 12, 14]. Многочисленными экспериментальными исследованиями установлено, что именно эпифизу принадлежит важная роль в обеспечении процессов адаптации организма к действию стрессовых факторов, ведь эпифиз оказывает влияние почти на все системы органов организма, с помощью гормона мелатонина, который он синтезирует и который является уникальным природным адаптогеном [1, 2, 3, 5, 15].

Однако, несмотря на тот факт, что проблема исследования механизмов развития патологических изменений в результате действия стрессовых факторов приобретает все большую актуальность [13], количество научных работ посвященных изучению морфологических особенностей эпифиза при хроническом стрессе незначительно [12]. Существующие же немногочисленные литературные данные, имеют фрагментарный и противоречивый характер. Поэтому изучение гистофизиологических особенностей эпифиза при хроническом стрессе на сегодняшний день является актуальным и требует проведения дальнейших детальных исследований.

Цель: изучение гистофизиологического состояния паренхимы эпифиза крыс в условиях хронического стресса.

Материалы и методы. Экспериментальное исследование проводилось на 44 половозрелых самцах крыс линии Вистар, массой 240-280 г. Животные были разделены на две группы по 24 особи в каждой. Эксперимент продолжался 30 дней. Первая группа (контроль) содержалась в стандартных условиях вивария и при естест-

венном освещении. Вторая группа животных также содержалась в стандартных условиях вивария, при естественном освещении. Начиная с 20 дня эксперимента, крысам моделировали хронический стресс, помещая в резервуар с водой, вместимостью 10 л. на 5 часов для принудительного плавания [7, 16]. Температура воды поддерживалась в пределах 24-26° С. Животных выводили из эксперимента путем декапитации с использованием кетаминного наркоза из расчета 40 мг/кг массы тела. Эвтаназия животных осуществлялась в строгом соответствии с принципами: Хельсинской декларации о гуманном обращении с животными, "Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях" (Страсбург, 1986), а также "Общих этических принципов экспериментов на животных принятых первым национальным конгрессом по биоэтике" (Киев, 2001).

После извлечения эпифиза вместе с прилегающими к нему кровеносными сосудами полученный комплекс погружали в фиксирующий раствор 10% нейтрального формалина. С помощью стандартных способов материала заключали в парафиновые блоки, из которых изготавливали срезы толщиной 4 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином. Полученные гистологические препараты изучали при различных увеличениях микроскопа "Primo Star Zeiss" с последующим фотографированием микропрепаратов цифровым зеркальным фотоаппаратом "Canon G10 Wide".

Результаты и их обсуждение. При гистологическом исследовании препаратов контрольной группы крыс отмечено, что шишковидная железа окружена тонкой капсулой, от которой внутрь органа отходят со-

единительнотканые перегородки, разделяющие паренхиму на дольки. В составе перегородок выявлены кровеносные сосуды разного калибра. Эти структурные элементы представляют собой строу шишковидной железы. Выявлено, что дольки железы имеют преимущественно округлую форму. Каждую дольку формируют высокоспециализированные элементы паренхимы шишковидной железы – пинеалоциты. В соответствии со своими морфофункциональными особенностями отмечено два типа пинеалоцитов. К первому типу мы отнесли светлые пинеалоциты. А к клеткам второго типа – темные пинеалоциты.

Выявлено, что светлые пинеалоциты представлены клетками овальной формы. Основной объем в клетке занимает ядро. Ядра имеют преимущественно округлую форму. Центральное положение в кариоплазме занимает ядрышко. Цитоплазма представлена узким ободком, занимающим пространство между цито- и кариолеммой. Цитоплазма выглядит прозрачной, бесструктурной. Выявлено, что темные пинеалоциты, по количеству значительно уступают светлым клеточным элементам. Кроме этого они локализованы преимущественно в глубоких слоях паренхимы органа. Так же установлено, что в отличие от светлых пинеалоцитов, темные – отличаются значительно меньшими размерами, овальной формой темных ядер. Выявлено, что у них даже при больших увеличениях микроскопа невозможно обнаружить любые структурные элементы. Ядрышки в таких клетках совершенно не проявляются вследствие наличия базофильного вещества (хроматина). Цитоплазма темных пинеалоцитов узкая и совершенно прозрачная (рис 1.).

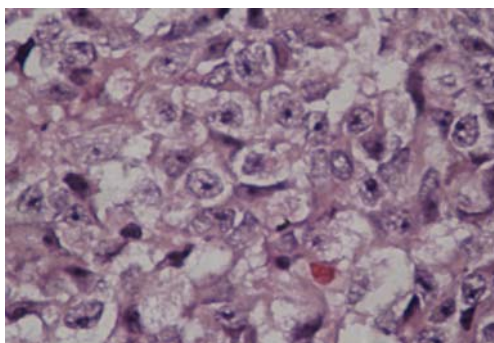


Рис. 1. Микрофотография среза шишковидной железы контрольной группы крыс
Окраска гематоксилин – эозин. Ув. $\times 400$.

Результаты нашего исследования совпадают с результатами исследований, посвященных изучению морфологии шишковидной железы человека и лабораторных животных других авторов [11, 17, 18].

При микроскопическом исследовании препаратов эпифиза группы животных, которым моделировали хронический стресс, установлено, что в апикальной части исследуемого органа практически постоянно обнаруживаются скопления темных пинеалоцитов, отличающихся интенсивной базофильной окраской. Обнаружено, что наиболее выраженные скопления темных пинеалоцитов сосредоточены преимущественно в самой узкой части апикального отдела шишковидной железы. В меньшем количестве эти анатомические структуры расположены на периферии ее апикального отдела. Можно отметить тесную связь во взаимоотношениях между светлыми и темными клеточными элементами паренхимы органа. Установле-

но, что светлые пинеалоциты окружены тесно прилегающими темными клетками (рис. 2).

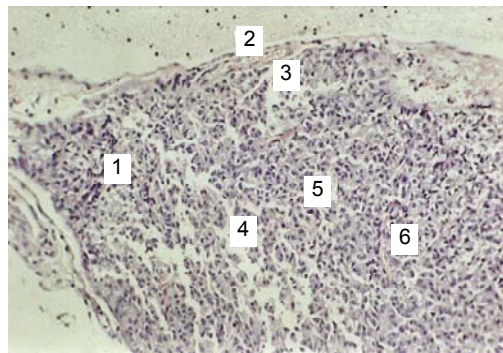


Рис. 2. Микрофотография клеточного состава паренхимы эпифиза крыс в области апикального отдела

1. Группа темных пинеалоцитов. 2. Капсула эпифиза. 3. Подкапсулярный кровеносный сосуд. 4. Следы прохождения кровеносных сосудов. 5. Светлые пинеалоциты. 6. Внутриорганный капилляр.

Окраска гематоксилин – эозин. Ув. $\times 100$.

Выявлено, что на гистологических срезах регионов шишковидной железы, удаленных от ее верхушки, общая гистологическая картина выглядит менее базофильной, что свидетельствует о преобладании в этих участках светлых пинеалоцитов. Темные пинеалоциты единичны и расположены преимущественно неупорядоченно (рис. 3). Важно отметить тот факт, что клеточные элементы паренхимы эпифиза, как на периферии, так и в центре органа расположены компактно (рис. 3.). Даная гистологическая особенность свидетельствует о низком уровне синтетических процессов.

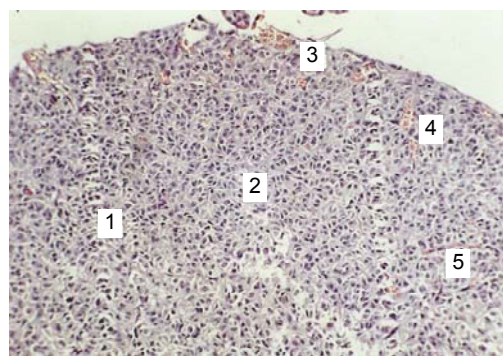


Рис. 3. Микрофотография клеточного состава центрального региона эпифиза крыс

1. Темные пинеалоциты. 2. Светлые пинеалоциты. 3. Подкапсулярные кровеносные сосуды. 4. Внутриорганные кровеносные сосуды. 5. Внутриорганные капилляры. Окраска гематоксилин – эозин. Ув. $\times 100$.

На гистологических срезах паренхима эпифиза имеет дольчатое строение. Выявлены большие дольки, ограниченные соединительноткаными перегородками и микродольки, ограниченные отростками пинеальных и глиальных клеток. Установлено, что пинеалоциты, как светлые, так и темные, которые входят в состав дольки, приобретают треугольную форму. При этом выявлено, что основание данного треугольника всегда обращено на периферию дольки, то есть к отросткам нейроглиальных клеток, а верхушки сходятся в центральной части микродольки (рис. 4).

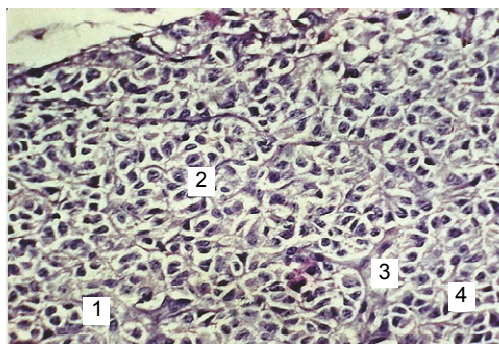


Рис. 4. Микрофотография структурной организации центральной части эпифиза крыс

1. Микрогдолька с темными пинеалоцитами. 2. Микрогдолька содержащая светлые пинеалоциты. 3. Соединительнотканная перегородка. 4. Глиальные клетки. Окраска гематоксилин – эозин. Ув. $\times 200$.

Цитоплазма большинства паренхиматозных клеток выглядит прозрачной. Иногда, в отдельных клетках, в цитоплазме находится бесструктурное слабобазофильное вещество. Выявлено, что на гистологических препаратах паренхимы шишковидной железы некоторых экспериментальных животных отмечаются явления слабо выраженной гидратации цитоплазмы отдельных пинеалоцитов или их групп. Установлено, что подобные очаги гидратации пинеальных клеток локализуются преимущественно в центральной части, но иногда встречаются и на периферии шишковидной железы (рис. 5, 6.). У таких клеток целостность и степень базофилии ядер практически сохраняется, хотя в отдельных случаях интенсивность окраски ядер снижается.

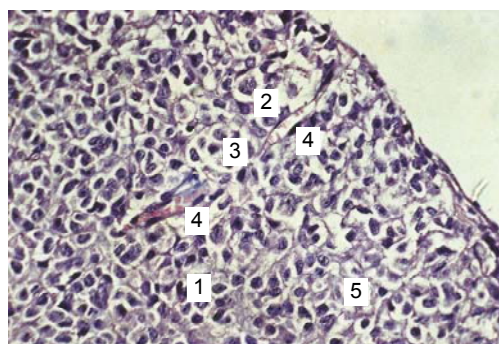


Рис. 5. Микрофотография структурной организации периферической зоны эпифиза

1. Темные пинеалоциты. 2. Гидратация отдельных светлых пинеалоцитов. 3. Гидратация микрогдолек. 4. Интраорганные кровеносные сосуды. 5. Лизис ядер и ядрышек светлых пинеалоцитов.

Окраска гематоксилин – эозин. Ув. $\times 400$.

Гидратация клеточных элементов вызывает значительное увеличение объема цитоплазмы и в связи с этим растяжение цитолеммы. Обнаружено, что в отдельных случаях гидратация цитоплазмы вызывает разрыв цитолеммы, в результате чего цитоплазматическая жидкость выливается в микрогдольки. Если такой процесс возникает в большинстве пинеалоцитов, то микрогдольки полностью заполняются цитоплазматической жидкостью (рис. 6.).

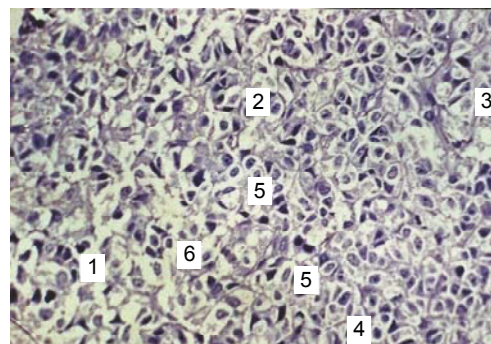


Рис 6. Микрофотография гидратации пинеалоцитов центральной части эпифиза крыс

1. Темные пинеалоциты. 2. Микрогдолька, содержащая светлые и темные пинеалоциты. 3. Микрогдолька содержащая светлые пинеалоциты. 4. Глиальные клетки. 5. Гидратация пинеалоцитов. 6. Гидратация дольки. Окраска гематоксилин – эозин. Ув. $\times 200$.

Установлено, что в большинстве светлых пинеалоцитов, ядрышки фактически не контурируются. Этот факт объясняется чрезмерным заполнением кариоплазмы базофильным веществом (конденсированным хроматином). В большинстве клеток хроматин не имеет однозначной структурной организации. Данная морфологическая особенность указывает на подавление функциональной активности отдельных светлых пинеалоцитов [4, 9]. Вместе с этим темные пинеалоциты имеют ряд характерных морфологических признаков, которые отличают их от светлых пинеалоцитов. Во-первых, темные пинеалоциты отличаются значительно меньшими размерами, по сравнению со светлыми клетками. Во-вторых, темные пинеалоциты отличаются интенсивно базофильной окраской [6, 14].

Вывод:

Морфологические проявления перестройки клеточного состава паренхимы эпифиза свидетельствуют о низком уровне ее функциональной активности в условиях хронического стресса.

Список используемых источников

1. Арушанян Э.Б. Эпифизарный мелатонин как антистрессовый агент / Э.Б. Арушанян, Л.Г. Арушанян // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1997. – №6. – С. 71-77.
2. Арушанян Э.Б. Гормон мозговой железы эпифиза мелатонин универсальный естественный адаптоген / Э.Б. Арушанян, Э.Б. Бейер // Успехи физиологических наук. – 2012. – №3. – С. 82-100.
3. Бейер Э.В. Антистрессовые возможности эпифизарного гормона мелатонина в зависимости от экспериментальной модели и выраженности стресса / Э.В. Бейер, А.С. Булгакова, А.А. Скорняков, Э.Б. Арушанян // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2010. – №2. – С. 59-63.
4. Букалев А.В. Роль эпифиза в организме / А.В. Букалев, И.А. Виноградова // Ученые Записки Петрозаводского Государственного Университета. – 2012. – №2(123). – С. 31-36.
5. Бондаренко Л.О. Вплив ікс – випромінювання в низьких дозах на шляхи біосинтезу і метаболізму індолів у пинеальній залозі / Л.О. Бондаренко // Український радіологічний журнал. – 2001. – №9. – С. 298 – 302.
6. Витер В.И. Функциональная морфология эпифиза при смерти от общего переохлаждения организма / В.И. Витер, Ю.С. Степанян // Проблемы экспертизы в медицине. – 2005. – №4 (19). – С. 16-18.
7. Дев'яткіна Т.О. Експерименти з використанням лабораторних тварин як передумова для створення нових стрес протекторів / Т.О. Дев'яткіна, Н.М. Дев'яткіна // Актуальні проблеми сучасної медицини. – 2009. – Т. 9, №2(26). – С.35-38.
8. Евсеев А.Н. Морфологические изменения в эпифизе при геморрагической микрорадке с почечным синдромом / А.Н. Евсеев // Избранные вопросы судебной медицины и экспертной практики. – 2005. – №7. – С. 156-158.
9. Клименко Т.М. Клинико-морфологические корреляты функции эпифиза мозга у недоношенных новорожденных / Т.М. Клименко, Т.М. Кварацхелия, Г.И. Губина – Вакулик // Здоровье ребенка. – 2008. – №3(12). – С. 108-112.
10. Малышева О.А. Клинико-патогенетическое значение гормона эпифиза – мелатонина в неврологии / О.А. Малышева // Неврологический журнал. – 1999. – №2. – С. 52-55.
11. Мартин Ю.В. Гістологічне дослідження заднього мозку та епіфіза у великої рогатої худоби різного віку / Ю.В. Мартин, А.З. Пилипець,

О.С. Грабовська, Р.Г. Сачко // Науково-технічний бюлетень. – 2012. – Т.13, №1-2. – С. 345-349.

12. Мозговая Т.П. Гистологический анализ эпифиза и гипофиза мозга родителей и потомков при моделировании стресса / Т.П. Мозговая, Г.И. Губина – Вакулик, Т.В. Горбач // Врачебная практика. – 2007. – №4. – С. 95-98.

13. Пішак В.П. Морфофункціональний стан щитоподібної залози в умовах стресу на фоні введення мелатоніну в різні терміни доби / В.П. Пішак, А.А. Ходоровська, Л.Я. Федонюк, Н.П. Пентелейчук // Буквинський медичний вісник. – 2006. – Т.10, №4. – С. 137-140.

14. Пішак В.П. Гістологічні та ультраструктурні критерії ефективності корекції мелатоніном та епіталом пінеалоцитів старих щурів після іммобілізаційного стресу / В.П. Пішак, Ю.В. Ломакіна, І.С. Давиденко // Проблеми старіння і довголіття. – 2008. – Т.17, №1. – С.3-8.

15. Afroz H. Microscopic study on the diameter of the pineal calcification of Bangladeshi Cadavers / H. Afroz, A.S. Nurunnabi, S. Ara, M. Rahman, T. Yesmin, A. Ara, K. Fatema, N. Nahar // Bangladesh Journal of Anatomy. – 2011. – Vol. 9, №2. – P. 71-74.

16. Bhatia N. Animal models in the study of stress: A review / N. Bhatia, P. Maiti, A. Choudhary, A. Tuli, D. Masih, M. Masih, Khan, T. Ara, A. Jaggi // Journal of Pharmacy and Healthcare Management. – 2011. – Vol. 02. – P. 42-50.

17. Ebada S. Morphological and immunohistochemical studies on the pineal gland of the donkey (*Equus asinus*) / S. Ebada // Journal of Veterinary Anatomy. – 2012. – Vol. 5, №1. – P. 47-74.

18. Gaikwad N.L. Pineal gland of goat: a histomorphological study / N. L. Gaikwad, U.P. Mainde, N.C. Nandeshwar, R.S. Dalvi, B.N. Meshram // Royal Veterinary Journal of India. – 2007. – Vol. 3, №1. – P. 37-38.

Поступила в редсовет 10.04.14

В. Пшиченко, викладач

Миколаївський національний університет імені В.О. Сухомлинського, Миколаїв

ГІСТОФІЗІОЛОГІЧНИЙ СТАН ЕПІФІЗУ ЩУРІВ В УМОВАХ ХРОНІЧНОГО СТРЕСУ

Метою дослідження було вивчення впливу хронічного стресу на гістофізіологічний стан епіфізу щурів. Матеріалом для дослідження стали епіфізи 24 самців щурів лінії Вістар. Встановлено, що у відповідь на експериментальні умови відбуваються гістофізіологічні зміни паренхіми органу, що виражаються в компактному розташуванні пінеалоцитів, збільшенні кількості темних пінеалоцитів, що займають апікальну частину епіфізу та заповненням ядер світлих пінеалоцитів конденсованим хроматином та слабо вираженими процесами гідратації. Результати гістологічного дослідження свідчать про низьку функціональну активність епіфізу.

Ключові слова: епіфіз, стрес, пінеалоцити.

V. Pshichenko, teacher

Nikolaev National University named after V.O. Sukhomlinskiy, Nikolaev

HISTOPHYSIOLOGICAL STATE OF THE PINEAL GLAND OF RATS UNDER CHRONIC STRESS

The aim of this study was to analyze the effect of chronic stress on the histological and physiological state of the pineal gland of rats. The material for the study were the epiphyses of 24 male Wistar rats. It was revealed that in response to the experimental conditions occur histological and physiological changes of the parenchyma the organ, which are expressed in a compact arrangement of pinealocytes, increasing the amount of dark pinealocytes primarily engaged in the apical part of the pineal gland, excessive filling of the nuclei of light pinealocytes condensed chromatin and mild hydration processes. Histological findings indicate low functional activity of the pineal gland.

Key words: pineal gland, stress, pinealocytes.

УДК 615.31: 616-006

М. Кузнєцова, асп., Т. Галенова, канд. біол. наук,

О. Савчук, д-р біол. наук

КНУ імені Тараса Шевченка, Київ,

Х. Болібрех, асп., С. Половкович, канд. хім. наук,

Національний університет "Львівська політехніка", Львів

ПОШУК ІНГІБІТОРІВ ТИРОЗИНОВИХ ПРОТЕЇНКІНАЗ СЕРЕД ПОХІДНИХ ХІНОНІВ ТА ХІНОКСАЛІНІВ

У ході роботи було оцінено ефект новосинтезованих похідних хінонів та хіноксалинів на тирозинпротеїнкіназну активність білків цитозольної та мембранної фракції клітин м'язової тканини щурів. Встановлено, що усі досліджувані сполуки чинять значний інгібуючий вплив на мембранозв'язані тирозинпротеїнкінази, тоді як лише п'ять із усієї серії сполук можуть інгібувати цитозольні ферменти.

Ключові слова: хінони, хіноксалини, тирозинпротеїнкіназна активність, канцерогенез.

Вступ. Нормальне функціонування організму передбачає координовану регуляцію росту, проліферації та диференціації кожної клітини. Регуляція цих процесів на молекулярному рівні відбувається за рахунок пост-трансляційних модифікацій білків, особливо шляхом фосфорилування [1]. Тирозинові протеїнкінази (ТПКази, КФ 2.7.1.112), – родина ферментів, до якої належать як рецепторні, так і цитозольні білки, що каталізують перенесення γ-фосфату з молекули АТФ на гідроксильну групу амінокислоти тирозину в складі білка-субстрату [2, 3]. Саме процес тирозинового фосфорилування є ключовим у забезпеченні міжклітинної комунікації, реалізації мітогенних сигналів та регуляції ряду важливих метаболічних змін у клітині [4]. Надмірна активація даного процесу може призводити до патологічної проліферації, індукції антиапоптичних ефектів. Ряд дослідників переконані, що активація ТПКази є загальним механізмом розвитку та росту пухлин, стимуляції ангиогенезу та метастазування [5-7]. Патологічна активація рецептора епідермального фактора росту часто призводить до розвитку раку молочних залоз [8], колоректального раку [9], раку легень [10] та шкіри [11]; надмірна активність рецептора фактора росту ендотелію судин корелює з розвитком злоякісного ангиогенезу

в умовах раку молочної, передміхурової, підшлункової залоз, сечового міхура та ободової кишки [12]; у той час як неконтрольована активація рецептора інсуліноподібного фактора росту є причиною прогресування меланоми [13]. Як показують останні дослідження, неконтрольована активація цитозольної кінази Src – сигнальної ланки між інтегінами та MAP-кіназним каскадом, є одним із патогенетичних факторів розвитку деяких пухлин товстого кишківника та молочної залози [14], патологічна активність злитого білка Bcr/Abl може бути причиною розвитку мієлолейкозу [15].

Враховуючи вищесказане, ТПКази розглядають як ключові мішені для дії інгібіторів в умовах терапії онкологічних захворювань, спричинених надмірною активністю даних ферментів. Інгібітори ТПКази широко застосовуються у лікуванні різного роду пухлин [16, 17]. Проте певними труднощами у їх використанні є побічні ефекти, пов'язані з розвитком резистентності організму до препаратів та/або недостатньою їх селективністю по відношенню до своїх мішеней. Резистентність організму до інгібіторів ТПКазиної активності впродовж лікування раку може бути наслідком компенсаторної активації або надекспресії рецепторних ТПКази та цитозольних сигнальних протеїнів, що володіють ТПКазиною активністю

[18]. Тому, пошук нових ефektorів ТПКазної активності залишається актуальною проблемою сьогодення, адже, на жаль, злoякісні новоутворення є однією з найбільш небезпечних проблем сучасності і займають друге місце серед причин смертності працездатного населення після серцево-судинних захворювань [19].

Метою роботи було дослідити ТПКазну активність білків цитозольної та мембранної фракції клітин м'язової тканини щурів за умов дії новосинтезованих хімічних сполук.

Матеріали та методи. Грубу фракцію плазматичних мембран та цитозоль отримували з клітин м'язової тканини здорових нелінійних щурів (230-250 г) за допомогою методу диференційного центрифугування [20]. Мембранні білки солюбілізували за присутності 1% неіонного детергенту Тритон X-100. ТПК-азну активність визначали методом імуноферментного аналізу, згідно рекомендацій [21]. Інкубаційне середовище для визначення ТПКазної активності, яке містило 50 мМ HEPES (pH 7,4), 20 мМ MgCl₂, 0,1 мМ MnCl₂, 0,2 мМ Na₃VO₄, 35 нМ АТФ вносили в лунки 96-лункового мікропланшету, попередньо покритого ТПКазним субстратом poly(Glu,Tyr) (Sigma, США). Реакцію фосфорилування ініціювали, додаючи до середовища інкубації 20 мкл білкового матеріалу цитозольної або солюбілізованої мембранної фракції, у холосту пробу вносили 20 мкл дистильованої води та інкубували 45 хв при 37°C. Подальші етапи аналізу проводили згідно класичного протоколу для імуноферментного аналізу [21], використовуючи для детекції фосфотирозинових залишків відповідні комерційні моноклональні антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому (Sigma, США).

У ході експерименту досліджували дію чотирнадцяти потенційних інгібіторів ТПКазної активності (табл. 1). Дані хімічні сполуки синтезовані співробітниками кафе-

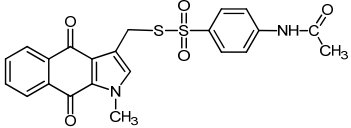
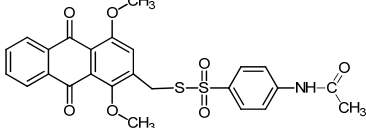
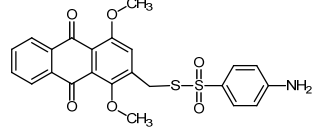
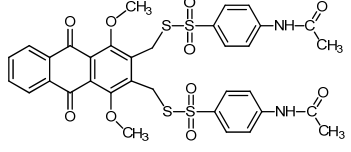
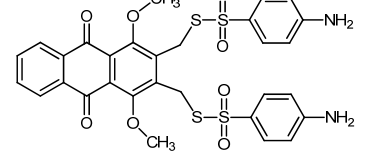
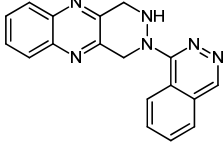
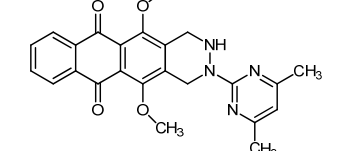
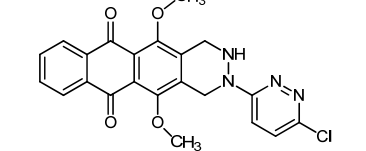
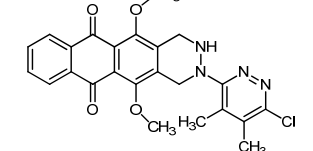
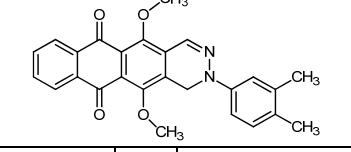
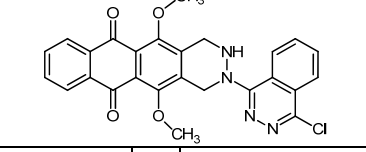
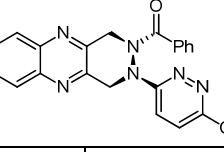
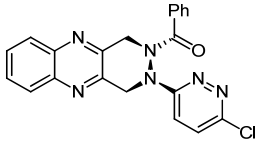
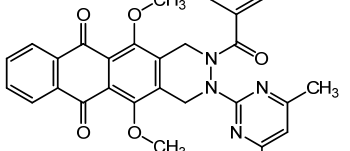
дри технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології Національного університету "Львівська політехніка" (Львів, Україна). Похідні 1-14 отримали взаємодією відповідних хінонів та хіноксалінів із солями тіосульфокислот, ароматичних, гетероциклічних гідразинів та гідразидів. Нуклеофільним заміщенням атомів галогену натрієвими солями тіосульфокислот одержали ряд сполук 1-5 [22]. Так у свою чергу, атакою електрофілів на ряд гідразинів та гідразидів реакція нуклеофільного заміщення проходить з утворенням похідних 9-14, що містять нову гетероциклічну систему, а саме піридазиновий цикл.

Перед проведенням аналізу сполуки розчиняли у 100% диметилсульфоксиді (ДМСО). Кінцева концентрація сполук у середовищі інкубації складала 100 мкМ, тоді як кінцева концентрація розчинника в пробах була фіксованою і становила 2%. Дана концентрація ДМСО викликала коливання базальної активності в межах $\pm 15\%$. З метою порівняння отриманих даних, показник ТПКазної активності, яку визначали за присутності у середовищі інкубації лише 2% ДМСО, приймали за 100%.

Статистичну обробку даних проводили, використовуючи параметричний критерій Стюдента. Різницю між показниками вважали статистично значущою при $P < 0,05$.

Результати та обговорення. Нами був проведений пошук потенційних інгібіторів ТПКазної активності серед похідних хінонів та хіноксалінів (1-14), які містять у своїй поліциклічній структурі одне або два неконденсованих ароматичних та гетероциклічних ядра. (табл. 1). Представники даного класу гетероциклів широко розповсюджені у природі та характеризуються високою біологічною активністю і часто застосовуються в медичній практиці, зокрема як протипухлинні агенти [23-26]. У таблиці 1 представлено структурні формули досліджуваних сполук 1-14.

Таблиця 1. Тіосульфонатні та гідразинові похідні хінонів та хіноксалінів 1-14

№	Хімічна формула	№	Хімічна формула	№	Хімічна формула
1		2		3	
4		5		6	
7		8		9	
10		11		12	
13		14			

Встановлено, що усі досліджувані похідні є інгібіторами ТПКазної активності мембранозв'язаних білків (рис. 1). Найкращий інгібуючий ефект – зниження ТПКазної активності білків мембранної фракції більше ніж на 70%, продемонстрували три тіосульфонатні похідні: 2, 3, 4 та одна гідразидна похідна 14 хінонів. При цьому максимальний інгібуючий ефект, зниження досліджуваного показника на 84%, був показаний для сполуки 4: S,S'-(1,4-диметокси-9,10-діоксо-9,10-дигідро-

антрацен-2,3-диіл)-біс(метилен))біс(4-ацетамідобензен-сульфоно-тіоату). Показники інгібування семи інших сполук (1, 5, 6, 7, 8, 10, 11) знаходились в межах від 48 до 67%. Сполука 9 – продукт взаємодії антрахінону із гідразином та дві інші: 12, 13 – стабільні конформери (3-(6-хлоропіридазин-3-іл)-3,4-дигідропіридазино[4,5-b]хіноксалін-2(1H)-іл)(феніл)метанону виявили дещо меншу активність – знижували ТПКазну активність на 42, 30 та 36% відповідно.

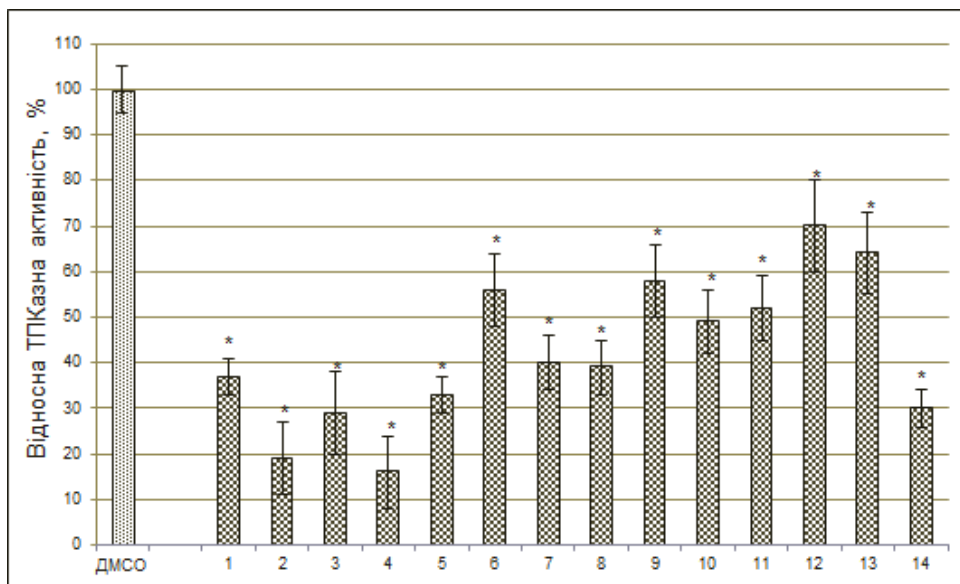


Рис. 1. ТПКазна активність білків мембранної фракції клітин м'язової тканини щурів за умов дії похідних хінонів та хіноксалінів 1-14 ($M \pm m$, $n=4$)

Примітки: 1-14 – порядковий номер сполук згідно таблиці 1; * – $P < 0,05$ порівняно з ТПКазною активністю за присутності в середовищі інкубації лише ДМСО.

При дослідженні впливу похідних хінонів та хіноксалінів на ТПКазну активність білків цитозольної фракції м'язової тканини були отримані наступні результати (рис. 2). Показано, що сполука 9 – 2-(6-хлоро-4,5-диметилпіридазин-3-іл)-5,12-диметокси-1,2,3,4-тетрагідро-нафто[2,3-g]фталазин-6,11-діон проявила найкращий інгібуючий ефект – знижувала ТПКазну активність цито-

зольних білків на 50%. У той же час за умов дії дизаймічених тіосульфонатних похідних 4, 5 та гідразидних похідних 10,11 антрахінону було встановлено зниження показника ТПКазної активності на 39, 32, 34 та 32% відповідно. Інші близькі структурні аналоги досліджуваної групи не мали ефекту на активність цитозольних ТПКаз.

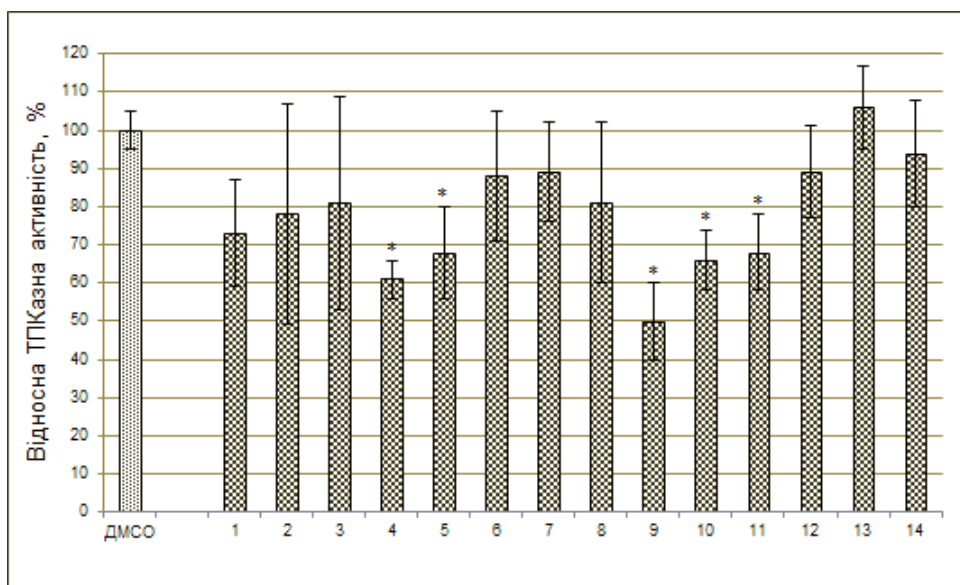


Рис. 2. ТПКазна активність білків цитозольної фракції клітин м'язової тканини щурів за умов дії похідних хінонів та хіноксалінів 1-14 ($M \pm m$, $n=4$)

Примітки: 1-14 – порядковий номер сполук згідно таблиці 1; * – $P < 0,05$ порівняно з ТПКазною активністю за присутності в середовищі інкубації лише ДМСО

Отримані дані свідчать, що мішенями дії обраних похідних хінонів та хіноксалинів можуть бути рецепторні білки, які володіють ТПКазною активністю. Окрім того, деякі з досліджуваних сполук є потенційними інгібіторами цитозольних ТПКаз. Такі результати мають наукову та практичну цінність, адже сьогоднішній пошук нових високоселективних препаратів на основі інгібіторів ТПКаз є актуальним напрямком онкотерапії. Таким чином, досліджувані хімічні сполуки є перспективними для подальших досліджень, направлених на пошук фармакологічних агентів для лікування раку.

Список використаних джерел

1. Till JH, Becerra M, Watty A, Lu Y, Ma Y, Neubert TA, et al. Crystal structure of the MuSK tyrosine kinase: insights into receptor autoregulation. *Structure*. 2002;10(9):1187-96.
2. Hubbard SR, Till JH. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem*. 2000;69:373-98.
3. Yancopoulos GD, Klagsbrun M, Folkman J. Vasculogenesis, angiogenesis, and growth factors: ephrins enter the fray at the border. *Cell*. 1998;93(5):661-4.
4. Henkemeyer M, Orioli D, Henderson JT, Saxton TM, Roder J, Pawson T, et al. Controls pathfinding of commissural axons in the mammalian central nervous system. *Cell*. 1996;86(1):35-46.
5. Lennartsson J. and L. Rönnstrand The Stem Cell Factor Receptor/c-KIT as a Drug Target in Cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 2006; 6: 561-571.
6. Zwick E, Bange J, Ullrich A. Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. *Endocrine-Related Cancer*. 2001; 8: 161-173.
7. Rongshi L, Pourpak A, Stephan W. Morris Inhibition of the Insulin-like Growth Factor-1 Receptor (IGF1R) Tyrosine Kinase as a Novel Cancer Therapy Approach. *J Med Chem*. 2009; 52(16): 4981-5004.
8. Slamo DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A and McGuire, WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/ neu oncogene. *Science*. 1987; 235: 177-182.
9. Kishiki T, Ohnishi H, Masaki T, Ohtsuka K, Ohkura Y, Furuse J, et al. Impact of genetic profiles on the efficacy of anti-EGFR antibodies in metastatic colorectal cancer with KRAS mutation. *Oncol Rep*. 2014; 5(15): 57-64.
10. Nishikawa R. A mutant epidermal growth factor receptor common in human Glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci*. 1994; 91: 7727-7731.
11. Burtner B. Targeted agents: management of dermatologic toxicities. *J Natl Compr Canc Netw*. 2014;12(5):793-6.
12. Fong TA, Shawver LK, Sun L, Tang C, App H, Powell TJ, Kim YH, Schreck R, Wang X, Risau W, Ullrich A, Hirth KP, McMahon G. SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor

receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Res*. 1999 Jan 1;59(1):99-106.

13. Yoshida M, Selvan S, McCue PA, DeAngelis T, Baserga R, Fujii A, et al. Expression of insulin-like growth factor-1 receptor in metastatic uveal melanoma and implications for potential autocrine and paracrine tumor cell growth. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2014;27(2):297-308.
14. Summy JM, Gallick GE. Src family kinases in tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2003;22(4):337-58.
15. Hanfstein B, Shlyakhto V, Laussek M, Hehlmann R, Saussele S, Dietz C, et al. Velocity of early BCR-ABL transcript elimination as an optimized predictor of outcome in chronic myeloid leukemia (CML) patients in chronic phase on treatment with imatinib. *Leukemia*. 2014; 6: 153-216.
16. Manash K. P., Anup K. Mukhopadhyay Tyrosine kinase – Role and significance in Cancer. *Int J Med. Sci*. 2004; 1(2): 101-115.
17. Zhang X, Munster PN. New protein kinase inhibitors in breast cancer: afatinib and neratinib. *Expert Opin Pharmacother*. 2014; 30:17-28.
18. Jaitak V. Drug Target Strategies in Breast Cancer Treatment: Recent Developments. *Anticancer Agents Med Chem*. 2014; 36: 17-12.
19. Schenk, PW, Snarr-Jagalska BE. Signal perception and transduction: the role of protein kinases. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1449: 1-24.
20. Остапенко Л.І., Михайлик І.В. Біологічні мембрани: методи дослідження структури та функцій : Навчальний посібник. – К.: Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", 2006. – 215 с.
21. Torlinska T., Perz M., Madry E., et al. Effect of hypothermia on insulin-receptor interaction in different rat tissues. *Physiol. Res.* – 2002; 51(3): 261 – 266.
22. Bolibrukh K, Monka N, Lubenets V, Novikov V, Khomeri O. Synthesis of new thiosulfonate derivatives with quinone and quinoxaline fragments. *Chemical Technology*. 2013; 64(2): 14-20.
23. Rauwald HW. Naturally Occurring Quinones and their Related Reduction Forms: Analysis and Analytical Methods. *Pharm Ztg Wiss*. 1990;5:169-181.
24. Driscoll JS. Structure-antitumor activity relationships among quinone derivatives. *Cancer Chemother.Rep*. 1974; 4:1-362.
25. Noolvi MN, Patel HM, Bhardwaj V, Chauhan A. Synthesis and in vitro antitumor activity of substituted quinoxaline and quinoxaline derivatives: Search for anticancer agent. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2011; 46(6): 2327-2346.
26. Ingle R, Marathe D, Magar, Patel HM, Surana S.J. Sulphonamido-quinoxalines: Search for anticancer agent / R. Ingle, R. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2013; 65:168-186.

Надійшла до редколегії 24.06.14

М. Кузнецова, асп., Т. Галенова, канд. биол. наук, А. Савчук, д-р биол. наук КНУ імені Тараса Шевченка, Київ,
Х. Болібрех, асп., С. Половкович, канд. хим. наук
Национальный университет "Львовская политехника"

ПОИСК ИНГИБИТОРОВ ТИРОЗИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗИ СРЕДИ ПРОИЗВОДНЫХ ХИНОНОВ И ХИНОКСАЛИНОВ

В ходе работы был оценен эффект новосинтезированных производных хинонов и хиноксалинов на тирозинпротеинкиназную активность белков цитозольной и мембранной фракций клеток мышечной ткани крыс. Установлено, что все исследуемые соединения оказывают значительное ингибирующее влияние на мембраносвязанную тирозинпротеинкиназную активность, в то время как только пять из всей серии соединений могут ингибировать цитозольные ферменты.

Ключевые слова: хиноны, хиноксалины, тирозинпротеинкиназная активность, канцерогенез.

M. Kyznetsova, Phd student, T. Halenova, Phd, O. Savchuk, doctor of sciences
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv,
K. Bolibrukh, Phd student, S. Polovkovich, Phd
National University "Lviv Polytechnic", Lviv

SEARCHING OF TYROSINE PROTEIN KINASE INHIBITORS AMONG QUINONE AND QUINOXALINE DERIVATIVES

In this work the effect of novel derivatives of quinoxaline and quinones on cytosolic and membrane tyrosine kinase activities in muscle rat's tissue was estimated. It was found that all the tested derivatives had a significant inhibitory effect on membrane-bound tyrosine kinase activity, while only five of them were capable to inhibit cytosolic enzymes.

Keywords: quinones, quinoxalines, tyrosine kinase activity, carcinogenesis.

УДК: 612.323+577.175.73+616.33-002.27

О. Цирюк, канд. біол. наук, Т. Берегова, д-р біол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ПОШУК ЗАСОБІВ КОРЕКЦІЇ СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ЗМІН В ШЛУНКУ ЗА УМОВ ТРИВАЛОЇ ГІПОАЦИДНОСТІ

Встановлено, що гіпергастринемія, викликана введенням щурам омепразолу впродовж 28 днів, призводить до загальної гіперплазії слизової оболонки шлунка, внаслідок чого підвищується її здатність виробляти кислоту. Компенсаторний вплив агоністів PPAR γ (піоглітазону, меланіну) та мультипробіотика "Симбітер" на рівень шлункової секреції кислоти вказує на уповільнення процесу гіпертрофії слизової оболонки, викликаної гіпергастринемією. Таким чином, агоністи PPAR γ та мультипробіотик "Симбітер" є перспективними і ефективними засобами попередження негативних структурно-функціональних змін у слизовій оболонці шлунка.

Ключові слова: секреція шлункового соку, омепразол, гастрин, активатор проліферації пероксисом рецепторів гамма, мультипробіотик.

Вступ. Гастрин, як традиційний гормон, синтезується та виділяється з G-клітин антрального відділу шлунка та стимулює секрецію соляної кислоти в шлунку. Гіпергастринемія розвивається внаслідок зниження кислотності шлункового соку, причиною якої є атрофічні гастрити та тривалий прийом антисекреторних препаратів [2]. Тривала гіпергастринемія викликає новоутворення, які походять з ECL-клітин [7,15], які можуть започатковувати шлункові карциноми дифузного типу, частота яких збільшилась упродовж останніх десятиліть [22].

У зв'язку із відсутністю засобів профілактики структурно-функціональних змін у шлунку на фоні тривалого зниження секреції соляної кислоти, актуальним є пошук засобів профілактики трофічної дії гастрину.

Так як гастрин на клітинні мішені реалізується через гастрин/холецистокінінові рецептори (ГХР), на першому етапі наших досліджень ми вважали перспективним у профілактиці трофічної дії гастрину застосування блокатора ГХР проглуміду.

Нещодавно було показано, що гастрин може опосередковувати свою трофічну дію через пригнічення ядерних рецепторів-активаторів проліферації пероксисом типу гамма (PPAR γ), зменшуючи їх експресію як в нормальній тканині товстого кишечника, так і в тканинах колоректальної карциноми, аденомах товстого кишечника, тощо [8]. У зв'язку з цим наші дослідження були спрямовані на дослідження агоністів PPAR γ як можливих засобів профілактики розвитку гіперплазії в слизовій оболонці шлунка щурів, викликаної тривалою гіпергастринемією. В якості агоністів PPAR γ нашу увагу привернули піоглітазон, один із представників групи тіазолідиндіонів, із групи препаратів, що використовуються в клінічній практиці для лікування хворих з цукровим діабетом II типу, та природний полімер фенольних сполук меланін [19], продуцентом якого є чорні дріжджі *Nadsoniella nigra* штам X-1. Останні висіяні із зразків вертикальних скель о. Галіндес (Українська Антарктична станція академік Вернадський), які надані нам Національним антарктичним науковим центром України згідно договору №07ДФ036-08.

Зниження секреції соляної кислоти не тільки призводить до гіпергастринемії, але і сприяє посиленню колонізації шлунка різноманітними мікроорганізмами, так як соляна кислота є найголовнішим фактором захисту проти бактеріальної колонізації, попереджаючи розвиток синдрому посиленого росту бактерій та кишкових інфекцій [1]. Показаний взаємозв'язок між бактеріальним інфікуванням шлунку та секрецією гастрину [23]. Так, колонізація шлунку *Helicobacter pylori* (H. pylori) запускає імунну відповідь Т-хелперів першого порядку (Th-1) [11] з вивільненням головного Th-1 цитокіну – інтерферону-гамма (ІФН- γ), який стимулює секрецію

гастрину [16]. А бактеріальний білок (OmpA-подібний білок), ізолюваний і клонований із *Acinetobacter spp.*, прямо посилює експресію генів гастрину. Таким чином, усунення дисбіозу в шлунку за допомогою мультипробіотика "Симбітер" ацидофільний концентрований є перспективним шляхом профілактики трофічної дії гастрину в умовах тривалої гіпоацидності.

Мета роботи полягала у дослідженні ефективності блокатора ГХР проглуміду, агоністів PPAR γ та мультипробіотика "Симбітер" в усуненні негативних наслідків тривалого зниження секреції соляної кислоти в шлунку.

Матеріал та методи дослідження. Дослідження проведені на 84 білих нелінійних щурах, самцях вагою 180-220 г. згідно етичних принципів, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики, міжнародним угодам та національному законодавству у цій галузі [4].

Проведено 4 серії експериментів, кожна з яких включала контрольну групу щурів, яким упродовж 28 днів вводили 0,2 мл води, та групу щурів, яким упродовж 28 днів вводили омепразол (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA) (14 мг/кг, внутрішньочеревинно (в/о), розчиненого в 0,2 мл води). Серії досліджень різнились між собою лише третьою групою тварин, яким упродовж 28 днів одночасно вводили відповідно омепразол та блокатор ГХР проглумід (10 мг/кг, в/о), омепразол та агоніст PPAR γ піоглітазон ("Мікро Лабс Лімітед", 30 мг/кг, per os), омепразол та меланін (0,1 мг/кг per os), що проявляє властивості агоніста PPAR γ , омепразол та мультипробіотик "Симбітер" ацидофільний концентрований (ТОВ "О.Д. Пролісок", Україна, 0,14 мл/кг, per os).

Через добу після останнього введення досліджуваних речовин або води проводили експеримент, в якому визначали рівень базальної секреції кислоти в шлунку методом перфузії ізолюваного шлунку за Хошем та Шільдом [14] під уретановим знечуженням (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA) (1,15 г/кг, в/о). Гастрин в плазмі крові визначали радіоімунним методом із використанням аналітичного набору фірми "MP Biomedicals, LLC" (USA).

Одержані результати досліджень перевіряли на нормальність розподілу за допомогою W тесту Шапіро-Вілکا. Оскільки дані виявилися нормально розподіленими, порівняння вибірок проводилося за допомогою t-критерію Стюдента для незалежних вибірок. Розраховували середнє значення (M), стандартне відхилення (SD). Рівень значущості приймали $p < 0,05$ [5].

Результати дослідження та їх обговорення. В результаті проведених досліджень встановлено, що через добу після 28 днів введення щурам омепразолу концентрація гастрину в плазмі крові збільшувалась на 189,3% ($p < 0,05$) (рис.1).

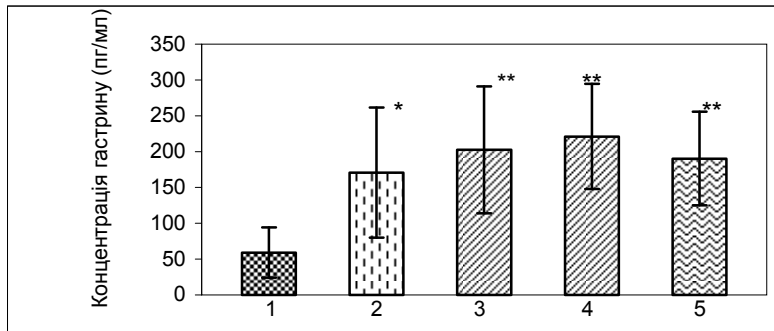


Рис. 1. Концентрація гастрину в плазмі крові, (M±SD):

1 – контроль; 2 – омепразол; 3 – омепразол + проглумід; 4 – омепразол + піоглітазон; 5 – омепразол + меланін;
* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ у порівнянні з контролем

Одночасно на 173,9% ($p < 0,001$) зростав дебіт кислоти базальної шлункової секреції (рис.2), що, як показано нами та іншими дослідниками [6, 13, 21], є результатом розвитку гіперплазії ентерохромафіноподібних та парієтальних клітин у відповідь на гіпергастринемію, викликану тривалим пригніченням секреції

соляної кислоти. Зроблено припущення, що карциноідні пухлини в шлунку розвиваються внаслідок прогресуючих гастринстимульованих подій: від зростаючої гіперплазії ентерохромафіноподібних клітин до дисплазії та формування карциноїду [20].

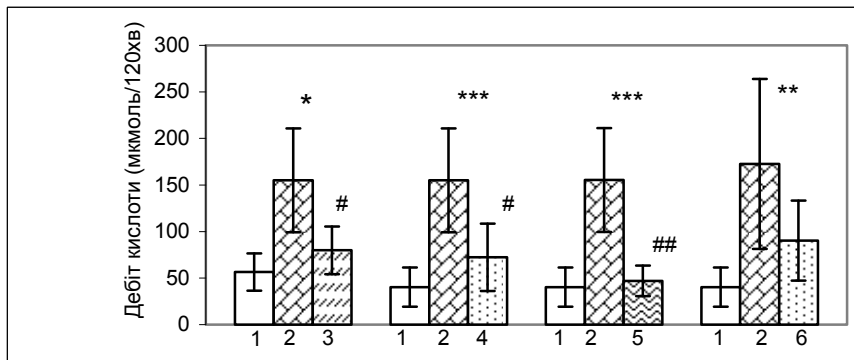


Рис. 2. Базальна шлункова секреція кислоти у щурів після 28-денного ізолюваного та сумісного введення омепразолу (14 мг/кг), (M±SD):

1 – контроль; 2 – омепразол; 3 – омепразол+проглумід (10 мг/кг); 4 – омепразол+піоглітазон (30 мг/кг, per os); 5 – омепразол+меланін (0,1 мг/кг, per os); 6 – омепразол+"Симбітер" (0,14 мл/кг); * – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$ у порівнянні з контролем (група 1), # – $p < 0,05$, ## – $p < 0,01$ у порівнянні з омепразолом (група 2)

Через добу після одночасного 28 денного введення щурам проглуміду та омепразолу дебіт базальної секреції кислоти статистично значущо не відрізнявся від контролю (рис.2), що свідчить про відсутність помітних змін в парієтальних клітинах, не дивлячись на те, що гіпергастринемія зберігалась (рис.1). На користь нашого висновку свідчать роботи, в яких показана відсутність гістологічних змін в слизовій оболонці шлунка щурів за умов одночасного 28 денного введення омепразолу та проглуміду [1]. Таким чином, здається доцільним за умов необхідності тривалого прийому блокаторів протонної помпи або у людей із гіпергастринемією різного ґенезу (гіпоацидність шлункового соку, ахілія, синдром Золінгера-Еллісона, атрофічні гастрити) призначати блокатор ГХР проглумід з метою запобігання трофічної дії гастрину, а значить профілактики гіперплазії клітин слизової оболонки шлунка. Зважаючи на роль гастрину та холецистокініну в регуляції секреції жовчі та стимуляції моторики жовчного міхура [18, 24], зроблено висновок про неможливість тривалого застосування блокатора ГХР з метою профілактики гіперплазії клітин слизової оболонки шлунка. За умов одночасного 28 денного введення агоністів PPAR γ (піоглітазону або меланіну) з омепразолом дебіт кислоти базальної шлункової секреції статистично значущо не відрізнявся від контролю (рис.2) на фоні вираженої гіпергастринемії

(рис.1). Так як секреція кислоти в шлунку залежить від кількості та розміру парієтальних клітин, ми дійшли висновку, що за умов одночасного введення агоністів PPAR γ та омепразолу явище гіперплазії було менш вираженим або відсутнім. На користь нашого висновку свідчать дані літератури про те, що активація PPAR γ в умовах *in vitro* та *in vivo* стимулює термінальну диференціацію первинних клітин ліпосаркоми людини, які характеризується накопиченням внутрішньоклітинних ліпідів, та індукцією адипоцитспецифічних генів [9]. У хворих на рак молочної залози, активація PPAR γ є причиною акумулювання ліпідів і змін у експресії генів злоякісних епітеліальних клітин молочної залози, пов'язаних із переходом до більш диференційованих, і відповідно, менш злоякісних форм пухлин [17]. А у клітинних лініях раку підшлункової залози агоністи PPAR γ збільшують рівень маркерів диференціації [10].

При дослідженні базальної шлункової секреції у щурів з комбінованим веденням омепразолу та мультипробіотика "Симбітер" спостерігалось зменшення базальної шлункової секреції на 47,6% у порівнянні з групою, що отримувала лише омепразол (рис.2). Позитивний вплив "Симбітеру" на секреторну функцію шлунка, як показника стану парієтальних клітин, є результатом нормалізації якісного та кількісного складу мікрофлори шлунка [1], зниження рівня ІФН- γ , який робить певний

вносок у розвиток гіпергастринемії [3], та через активацію PPAR γ , яку викликають певні штами мікроорганізмів [12], що входять до складу "Симбітеру".

Висновки:

Наші дані дозволяють зробити висновок, що: 1) гіпергастринемія, викликана 28 денним веденням омепразолу щурам, призводить до загальної гіперплазії слизової оболонки шлунка, і така слизова оболонка має підвищену здатність виробляти кислоту; 2) компенсаторний вплив агоністів PPAR γ піоглітазону, меланіну та мультипробіотика "Симбітер" на рівень шлункової секреції кислоти вказує на уповільнення процесу гіпертрофії слизової оболонки, викликаній гіпергастринемією. Таким чином, агоністи PPAR γ та мультипробіотик "Симбітер" є перспективними і ефективними засобами попередження структурно-функціональних змін в слизовій оболонці шлунка.

Список використаних джерел

1. Берегова Т.В., Цирюк О.І. Мультипробіотик "Симбітер" як засіб профілактики структурно-морфологічних змін в шлунку, що виникають на фоні зниженої кислотності шлункового соку // Збірник праць Сателітного симпозіуму "Сучасні аспекти застосування пробіотиків в педіатрії". – 2008. – С.52-57.
2. Ивашкин В.Т., Шептулин А.А. Перспективы применения блокаторов протонного насоса в гастроэнтерологии // Болезни органов пищеварения. – 2001. – Т. 3, №1 – С.78-84.
3. Короткий О., Пилипенко С., Компанець І., Цирюк О., Остапченко Л., Берегова Т.В. Вплив мультипробіотиків на вміст інтерферону-гамма в сироватці крові щурів за умов тривалої гіпоацидності // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. – 2009 – №54. – С. 47-49.
4. Мальцев В.И. Этическая оценка методик проведения исследований / Мальцев В.И., Белоусов Д.Ю. // Ежедневник Аптека. – 2001. – № 34. – С. 35.
5. Філімонова Н.Б., Філь І.О., Михайлова Т.С. Статистичний аналіз даних відповідно до засад науково обгрунтованої медицини. Первинний аналіз кількісних даних, подання результатів експерименту // Медицина залізничного транспорту України. – 2004. – №4. – С.85-93.
6. Цирюк О.І., Берегова Т.В. Вплив омепразол-викликаній гіпергастринемії на базальну шлункову секрецію у щурів // Вісник проблем біології і медицини. – 2007. – №3. – С. 38-43.
7. Bamba T., Kosugi S., Kanda T., Tsubono T., Sakai Y., Musha N. Multiple carcinoids in the duodenum, pancreas and stomach accompanied with type A gastritis: a case report // Gastroenterol. – 2007. – Vol. 13, №15. – P. 2247-2249.
8. Chang A.J., Song D.H. and Wolfe M.M. Attenuation of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) Mediates Gastrin-stimulated

Colorectal Cancer Cell Proliferation // The Journ of Biol Chem. – 2006. – Vol. 281, №21. – P.14700-14710.

9. Demetri G.D., Fletcher C.D., Mueller E. et al. Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand troglitazone in patients with liposarcoma // Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. – 1999. – Vol. 96, № 7. – P.3951-3956.

10. Elnemr A., Ohta T., Iwata K., Ninomia I., Fushida S. PPARgamma ligand (thiazolidinedione) induces growth arrest and differentiation markers of human pancreatic cancer cells // Int.J.Oncol. – 2000. – Vol. 17, № 6. – P.1157-1164.

11. Ernst P.B., Gold B.D. The disease spectrum of Helicobacter pylori: The immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer // Annu. Rev. Microbiol. – 2000. – Vol. 54. – P. 615-640.

12. Ewaschuk J.B., Walker J.W., Diaz H. Bioproduction of conjugated linoleic acid by probiotic bacteria occurs in vitro and in vivo in mice // J. Nutrition. – 2006. – Vol. 136. – P.1483-1487.

13. Frucht, H., Maton P. N., Jensen R. T. Use of omeprazole in patients with the Zollinger-Ellison syndrome // Dig. Dis. Sci – 1991. – Vol. 36. – P. 394-404.

14. Ghosh M.N., Shild H.O. Continuous recording of acid gastric secretion in the rat // Br. J. Pharmacol. – 1958. – P. 13-14.

15. Jensen R.T. Consequences of long-term proton pump blockade: insights from studies of patients with gastrinomas // Basic Clin.Pharmacol.Toxicol.-2006.- Vol. 98, № 1.-P.4-19.

16. Lehmann F.S., Golodner E.H., Wang J., Chen M.C., Avedian D., Calam J., Walsh J.H., Dubinett S., Soll A.H. Mononuclear cells and cytokines stimulate gastrin release from canine antral cells in primary culture // Am J Physiol. – 1996. – Vol. 270. – P. 783-788.

17. Mueller E., Sarraf P., Tontonoz P. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma // Mol.Cell. – 1998. – Vol. 1, № 3. – P.465-470.

18. Otsuki M. Pathophysiological role of cholecystokinin in humans. // J Gastroenterol Hepatol. – 2000. – Vol. 15 – P.71-83.

19. Plonska P., Grabacka M. Melanin synthesis in microorganisms – biotechnological and medical aspects // Acta Biochimica Polonica. – 2006. – Vol.53, № 3. – P. 429-443.

20. Solcia E., Rindi G., LaRosa S., Capella C. Morphological, molecular, and prognostic aspects of gastric endocrine tumors // Microsc. Res. Tech. – 2000. – Vol. 48 – P. 339-348.

21. Tsyryuk O., Radchuk O., Rybalchenko V., Beregova T. The influence of multiprobiotic "Symbiter" acidophilic on structurally functional state of gastric mucosa in omeprazole-treated rats // Annales universitatis Mariae Curie-Sklodowska. – Lublin-Polonia. – Vol.XXI. – N.1,46, 2008. – P.257-260.

22. Waldum H.L., Brenna E., Sandvik A.K. Long-term safety of proton pump inhibitors: risks of gastric neoplasia and infections. // Expert Opin Drug Saf. – 2002. Vol.1, № 1. – P.29-38.

23. Zavros Y., Rieder G., Ferguson A., Mershan J.L. Gastritis and hypergastrinemia due to Acinobacter lwofii in mice // Infection and Immunity. – 2002. – Vol. 70. – P. 2630-2639.

24. Zheng Q., Chen Y. The effects of cholecystojejunostomy and biliary drainage on biliary motor. // J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci. – 2002. – Vol. 22, № 2. – P.144-147.

Надійшла до редколегії 19.06.14

Е. Цирюк, канд. биол. наук, Т. Береговая, д-р биол. наук
КНУ имени Тараса Шевченко, Киев

ПОИСК СРЕДСТВ КОРРЕКЦИИ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ЖЕЛУДКЕ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОЙ ГИПОАЦИДНОСТИ

Установлено, что гипергастринемия вызванная введением крысам омепразола в течение 28 дней, приводит к общей гиперплазии слизистой оболочки желудка, и такая слизистая имеет повышенную способность вырабатывать кислоту. Компенсаторное влияние агонистов PPAR γ (пиоглітазона, меланіна) и мультипробіотика "Симбітер" на уровень желудочной секреции указывает на замедление процесса гипертрофии слизистой оболочки, вызванной гипергастринемией. Таким образом, агонисты PPAR γ и мультипробіотик "Симбітер" есть перспективными и эффективными средствами в профилактике структурно-функциональных изменений в слизистой оболочке желудка.

Ключевые слова: желудочная секреция соляной кислоты, омепразол, гастрин, гамма рецепторы активаторов пролиферации пероксисом, мультипробіотик.

O. Tsyryuk, PhD., T. Beregova, DSc
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

FINDING WAYS OF CORRECTION THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHANGES IN THE STOMACH UNDER PROLONGED HYPOACIDITY

It was established that hypergastrinemia in rats evoked by 28 days injection of omeprazole, leads to total hyperplasia of gastric mucosa and this mucosa has enhanced ability to produce hydrochloric acid. It was shown compensatory influence of peroxisome proliferator-activated receptors gamma agonists (pioglitazone, melanin) and multiprobiotic "Symbiter" acidophilic concentrated on the level of gastric acid secretion. This testifies to the slowing-down of process of gastric mucosa hypertrophy, evoked by hypergastrinemia. Thus of peroxisome proliferator-activated receptors gamma agonists and multiprobiotic "Symbiter" are perspective and effective agents in prevention of structural and functional changes in gastric mucosa.

Key words: gastric acid secretion, omeprazole, gastrin, peroxisome proliferator-activated receptors gamma, multiprobiotic.

УДК 577.359/57.043:57.053

М. Мельник, асп., В. Мартинюк, д-р біол. наук, О. Артеменко, канд. біол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ВПЛИВ ЕЛЕКТРОМАГНІТНИХ ПОЛІВ ЧАСТОТАМИ 8 І 50 ГЦ НА ДИНАМІКУ КОНЦЕНТРАЦІЇ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОГО КАЛЬЦІЮ В ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВИХ КЛІТИНАХ

Досліджено внутрішньоклітинну концентрацію вільних іонів кальцію в гладеньком'язових клітинах шлунку щурів. Продemonстровано, що в суспензії клітин внутрішньоклітинна концентрація кальцію з часом збільшується як в контрольних зразках, так і під впливом електромагнітного поля, але під впливом поля ці зміни є суттєвішими. Водночас з цим вплив електромагнітного поля частотою 50 Гц індукцією 25 мкТл призводить до більш суттєвих змін, порівняно з впливом електромагнітного поля частотою 8 Гц.

Ключові слова: іони кальцію, електромагнітне поле, внутрішньоклітинний кальцій.

Вступ. Електромагнітне поле (ЕМП), яке має як природнє, так і техногенне походження, являється важливим фактором навколишнього середовища, що здатний впливати на живі об'єкти. Досить довгий час можливість електромагнітних полів, а зокрема слабких (не-теплових) низькочастотних, впливати на організми і клітини вважалась сумнівною. Але на сьогоднішній день завдяки використанню сучасного обладнання та багато точніших методик, що дозволяють досліджувати найменші зміни в біологічних процесах, вплив слабких наднизькочастотних ЕМП на живі організми, клітини та процеси, що відбуваються в них, є експериментально доведеним [10, 12, 13].

Зі спектру наднизькочастотних ЕМП біологічну активність проявляють не всі частоти, зокрема до біологічно активних, відносять 8 Гц і 50 Гц. Так, було показано, що ЕМП частотою 50 Гц пригнічувало активність секреторних клітин залозистого епітелію простати [7]. ЕМП частотами 7-72 Гц та індукцією 13-114 мкТл в комбінації зі статичним полем індукцією 27-37 мкТл напруму змінювало ймовірність відкритого стану кальцієвих каналів плазматичної мембрани [1]. Оглядова стаття [7] демонструє участь потенціал-керованих кальцієвих каналів в розвитку магнітобіологічного ефекту на різних типах клітин. Також було продемонстровано, що ЕМП частотою 50 Гц та індукцією 0,2 мТл інгібують Ca^{2+} -канали Т-типу впливаючи на сигнальний шлях арахідонової кислоти та лейкотрієну E_4 [4]. Біологічна активність 8 Гц була продемонстрована на тучних клітинах [12]. ЕМП частотами від 2 до 100 Гц індукцією 25 мкТл в залежності від частоти пригнічувало або активувало деградування тучних клітин. Також було показано, що ЕМП 8 Гц збільшувало пошкоджуючий ефект пероксиду на ДНК [9]. Добре відомо, що функціонування гладеньких м'язів безпосередньо визначає фізіологічну діяльність внутрішніх органів, зокрема шлунково-кишкового тракту, судин, сечового міхура, матки, проток сечостатевої системи. Не дивлячись на те, що на сьогодні отримана значна кількість підтверджуючих даних про вплив слабких наднизькочастотних ЕМП на живі структури, вплив ЕМП на гладенькі м'язи залишається маловивченим питанням. Зміна внутрішньоклітинної концентрації кальцію ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) в гладеньком'язових клітинах (ГМК) являється пусковим процесом в скороченні гладеньких м'язів. Збільшення або зменшення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в ГМК відбувається внаслідок функціонування каналів і рецепторів плазматичної мембрани та саркоплазматичного ретикулу – депо кальцію в ГМК, а також ряду сигнальних каскадів в клітинах [2, 6]. В нашій попередній роботі ми показали пригнічуючу роль ЕМП частотою 8 Гц та індукцією 25 мкТл на стимульоване K^+ -деполяризацією скорочення гладенького м'язу сліпої кишки щурів [15], а також на викликане K^+ -деполяризацією збільшення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в суспензії ГМК шлунку щурів [14]. Водночас з

цим питання про вплив електромагнітних полів наднизьких частот на базовий рівень вільного кальцію в гладеньких м'язах залишається мало вивченим. Таким чином, дослідження впливу ЕМП частотами 8 і 50 Гц на концентрацію внутрішньоклітинного кальцію в суспензії ГМК являється актуальним питанням. Враховуючи зазначене, **метою роботи** було дослідити вплив ЕМП частотою 8 Гц і 50 Гц й індукцією 25 мкТл на зміну з часом внутрішньоклітинної концентрації кальцію в гладеньком'язових клітинах шлунку щурів.

Матеріали і методи. В експериментах використовувались нелінійні білі щури-самці (середня вага 250 г). Тварини утримувались в стандартних умовах віварію ННЦ "Інститут біології" Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Вся робота проводилась відповідно до конвенції Ради Європи щодо захисту хребетних тварин, яких використовують у наукових цілях.

Шлунок очищали від сполучних тканин в безкальцієвому розчині Кребса, нарізали на фрагменти приблизно 3х3 мм. Фрагменти поміщали в бюкс та інкубували в 2 мл розчину ферментів при температурі 37 °С впродовж 22 хв. Після інкубування, за допомогою сепаратора з надплавленням носиком, з тканинних фрагментів вилучали клітинну суспензію. Потім отриману суспензію завантажували флуоресцентним кальцієвим зондом індо-1 [11] (на 1 мл суспензії 5 мкл індо-1 та 5 мкл Pluronic F-127) впродовж 40 хв. Далі в клітинній суспензії розчин безкальцієвого Кребсу змінювали на розчин нормального Кребсу.

Для реєстрації змін концентрації кальцію суспензію ГМК піддавали впливу імпульсного прямокутного ЕМП індукцією 25 мкТл та частотою 8 і 50 Гц, яке генерувалось за допомогою котушок Гельмгольца та генератора Г6-28. Вектор індукції ЕМП був паралельним вертикальній складовій геомагнітного поля. Експозиція ЕМП відбувалась впродовж 32 хвилин, під час якої кожні 4 хвилини вимірювали концентрацію кальцію двофлуориметричним методом [11] за допомогою спектрофлуориметра СДЛ-2 (ЛОМО). У зв'язку з тим, що базова концентрація іонів кальцію варіювала в різних експериментальних зразках в межах до 50 нМ/л, її значення в кожній часовій точці з 4-хвилинним інтервалом нормалізували відносно початкового значення, що відповідає нульовому часовому підрахунку і, відповідно, нульовому значенню зміни концентрації. В експерименті використовували нормальний розчин Кребсу (мМ): 135 NaCl, 5,9 KCl, 1,2 MgCl₂, 11,5 глюкози, 2,5 CaCl₂, 11,6 HEPES; безкальцієвий розчин Кребсу (аналогічний нормальному, але без CaCl₂); розчин ферментів (мг на 1 мл безкальцієвого Кребсу): 1 колагенази 1А, 1 соєвого інгібітору трипсину, 1 САБ, 0,5 протеази.

Для порівняння показників зміни концентрації кальцію з часом під впливом ЕМП 8 і 50 Гц використовували t-критерій Стюдента. Достовірними вважали результати

при $P < 0,05$. Отримані результати представлені як середнє значення ($n = 6$) $\pm$ стандартна похибка середнього.

Результати та їх обговорення. Досліджували вплив ЕМП частотою 8 і 50 Гц та індукцією 25 мкТл на концентрацію $[Ca^{2+}]_i$ в ГМК шлунку щурів. Було показано, що ЕМП частотою 50 Гц значно змінювало концент-

рацію внутрішньоклітинного кальцію в суспензії ГМК, тоді як ЕМП частотою 8 Гц суттєво не відрізнялось від контролю (рис. 1, 2). До того ж, було продемонстровано, що з часом (32 хв) концентрація внутрішньоклітинного кальцію самочинно зростає як під впливом ЕМП, так і за відсутності впливу (рис. 1).

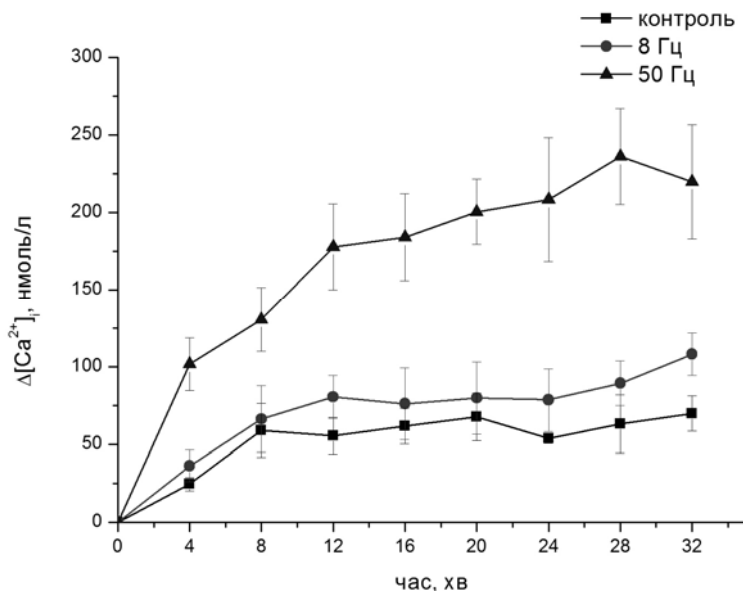


Рис. 1. Зміна внутрішньоклітинної концентрації кальцію в ГМК шлунку щурів під впливом ЕМП частотою 8 Гц, 50 Гц та за відсутності впливу ЕМП (контроль).
За "0" прийнято базову концентрацію $[Ca^{2+}]_i$ в нульовий момент часу

З рис. 1 і 2 видно, що ЕМП частотою 50 Гц значно збільшувало $[Ca^{2+}]_i$, а частотою 8 Гц принципово не змінювало її порівняно з контролем. Зміна внутрішньоклітинної концентрації кальцію мала часозалежний характер. При чому, спочатку збільшення концентрації було стрімким, а на 8-12 хвилини реєстрації набувало менш стрімкого характеру, і для контрольних зразків та зразків, що піддавались впливу ЕМП 8 Гц були схожі на плато.

До того ж з графіку (рис. 1) видно, що внутрішньоклітинна концентрація кальцію змінювалась з часом як в зразках, що піддавались впливу ЕМП, так і в контрольних зразках. Така зміна концентрації кальцію з часом може бути пов'язана з тим, що інкубація клітин не являється природним процесом і з часом витік кальцію в цитоплазму збільшується.

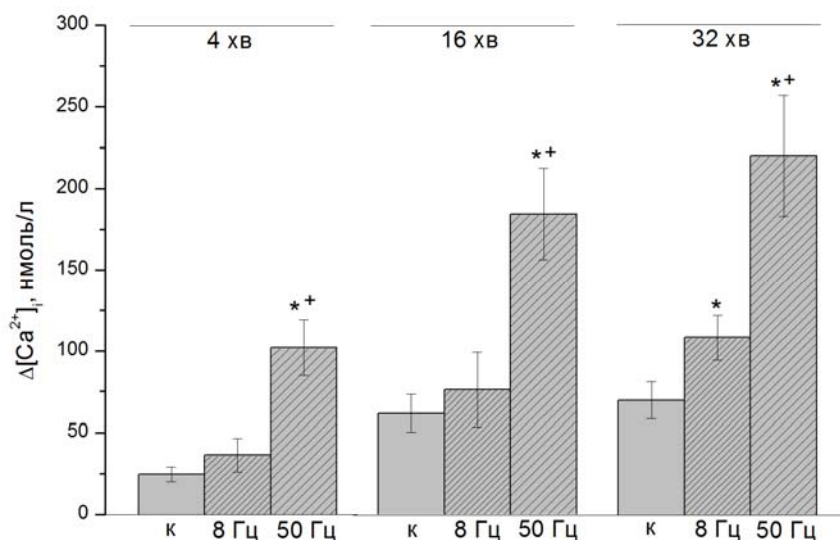


Рис. 2. Зміна концентрації $[Ca^{2+}]_i$ з часом (через 4, 16, 32 хв) в контрольних зразках (к) та в зразках під впливом ЕМП частотами 8 і 50 Гц

За "0" прийнято базову концентрацію $[Ca^{2+}]_i$ в нульовий момент часу;

* – $P < 0,05$ порівняно з контролем в даній часовій групі;

+ – $P < 0,05$ порівняно зі зразками під впливом ЕМП 8 Гц в даній часовій групі.

На рис. 2 продемонстрована зміна концентрації внутрішньоклітинного кальцію в контролі, під впливом ЕМП 8 і 50 Гц в окремо взяті моменти часу. За 4 хвилини відбувається незначне збільшення концентрації внутрішньоклітинного кальцію під дією ЕМП 50 Гц, через 16 хвилин концентрація кальцію значно збільшується порівняно з контролем та зі зразком під впливом ЕМП 8 Гц. Через 32 хвилини експозиції ЕМП 50 Гц $[Ca^{2+}]_i$ збільшується приблизно вдвічі порівняно з цим показником через 4 хвилини. Також через 32 хвилини експозиції незначним чином, але достовірно збільшується концентрація кальцію в ГМК під впливом ЕМП 8 Гц. Зараз відомо, що збільшення внутрішньоклітинної концентрації кальцію відбувається за рахунок функціонування ряду рецепторів і каналів. Майже 80% кальцію надходить в клітину через потенціал-керовані кальцієві канали [3]. Також вхід кальцію відбувається через неселективні катіонні канали та рецептор-керовані канали. Нейромедіатори та гормони зв'язуються з їх специфічними рецепторами, активуючи різні типи G-білків, що спряжені з різними іонними каналами та ферментами, та модулюють їх активність. Зокрема, до таких ферментів відносять фосфоліпазу C, яка розщеплює фосфатидилінозитол з утворенням інозитол-1,4,5-трифосфату (IP_3) й діацилгліцеролу, та аденілатциклазу, яка перетворює АТФ на цАМФ. До того ж, збільшення $[Ca^{2+}]_i$ відбувається внаслідок виходу кальцію з саркоплазматичного ретикулу. Це відбувається внаслідок активації внутрішньоклітинним кальцієм ріанодинових рецепторів, або IP_3 -рецепторів, що активуються IP_3 [2, 5, 6].

Як було показано різними дослідниками [4, 7], ЕМП здатні активувати або пригнічувати діяльність потенціал-керованих кальцієвих каналів. В наших попередніх роботах було продемонстровано, що ЕМП частотою 50 Гц збільшувало, а 8 Гц пригнічувало K^+ -викликані скорочення гладеньких м'язів шлунку щурів завдяки пригніченню K^+ -викликаного зростання внутрішньоклітинної концентрації кальцію в ГМК [14]. Ми з отриманих результатів висунули припущення, що даний ефект був пов'язаний з участю потенціал-керованих кальцієвих каналів. В даному експерименті гладеньком'язові клітини не стимулювались додаванням KCl. Тим не менш, ЕМП частотою 50 Гц збільшувало приблизно на 230 нмоль/л концентрацію внутрішньоклітинного кальцію в суспензії ГМК (рис. 1, 2). Таким чином, можна сказати, що ЕМП здатне змінювати концентрацію кальцію в гладеньком'язових клітинах за відсутності дії жодного активуючого агента хімічної природи. У роботі [8] припустили, що нетеплові ЕМП частотою до 100 Гц ймовірно можуть впливати на електричний диполь сенсору потенціалу в іонних каналах. З цього можна припустити, що в розвитку магнітобіологічного ефекту в нашому експерименті приймають участь потенціал-керовані кальцієві канали навіть за відсутності стимуляції їх активності KCl. Але при цьому не можна виключати можливої участі й інших структур та процесів у цьому, зокрема таких як вивільнення кальцію з депо або ролі складних сигнальних шляхів в клітині.

Висновки:

Отримані експериментальні дані показують, що електромагнітне поле частотою 50 Гц та індукцією 25 мкТл з часом збільшує концентрацію внутрішньоклітинного кальцію в гладеньком'язових клітинах шлунку щурів. Електромагнітне поле частотою 8 Гц та індукцією 25 мкТл суттєво не збільшувало концентрацію внутрішньоклітинного кальцію в гладеньком'язових клітинах порівняно з контролем. Зміна концентрації внутрішньоклітинного кальцію мала часозалежний характер і збільшувалась самочинно як під впливом електромагнітних полів, так і в контрольних зразках. З'ясування механізму, що залучений до розвитку магнітобіологічного ефекту в гладеньких м'язах має стати справою майбутніх досліджень.

Список використаних джерел

1. Bauréus Koch C.L., Sommarin M., Persson B.R., Salford L.G., Eberhardt J.L. Interaction between weak low frequency magnetic fields and cell membranes // Bioelectromagnetics. – 2003, Sep. – Vol. 24, № 6. – P. 395-402.
2. Bolton T.B., Prestwich S.A., Zholos A.V., and Gordienko D.V. Excitation-contraction coupling in gastrointestinal and other smooth muscles // Annu. Rev. Physiol. – 1999. – Vol. 61. – P. 85-115.
3. Catterall W.A. Voltage-Gated Calcium Channels // Cold Spring Harb Perspect Biol. – 2011.
4. Cui Y., Liu X., Yang T., Mei Y.-A., Hu C. Exposure to extremely low-frequency electromagnetic fields inhibits T-type calcium channels via AA/LTE₂ signaling pathway // Cell Calcium. – 2014, Jan. – Vol. 55, Is. 1. – P. 48-58.
5. Herrera G.M., Nelson M.T. Sarcoplasmic reticulum and membrane currents // Novartis Found Symp. – 2002. – Vol. 246. – P. 189-203.
6. Karakia H., Ozaki H., Hori M., Mitsui-Saito M., and other. Calcium Movements, Distribution, and Functions in Smooth Muscle // Pharmacological Reviews. – 1997. – Vol. 49, No. 2.
7. Khaki A. A., Arash Khaki D. V. M., Garachourlou S., and other. Pre and post natal exposure of 50 Hz electromagnetic fields on prostate glands of rats: an electron microscopy study // Iranian Journal of Reproductive Medicine. – 2008. – Vol. 6, No. 2. – P. 77-82.
8. Pall M.L. Electromagnetic fields act via activation of voltage-gated calcium channels to produce beneficial or adverse effects // J. Cell. Mol. Med. – 2013. – Vol. 17, No. 8. – P. 958-965.
9. Saunders R.D., Jefferys J.G.R. A neurobiological basis for ELF guidelines // Health Phys. – 2007. – Vol. 92. – P. 596-603.
10. Sobko V.M., Martynyuk V.S., Shevchenko V.B., Protopopov M.V. Effect of electromagnetic field with 8 Hz frequency on thymocytes nucleuses injury caused by nanostructured silicon and hydrogen peroxide // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского, Серия "Биология, химия". – 2011. – Том 24 (63), № 2. – С. 261-267.
11. Sul A.R., Park S.-N. and Suh H. Effects of Sinusoidal Electromagnetic Field on Structure and Function of Different Kinds of Cell Lines // Yonsei Medical Journal. – 2006. – Vol. 47, No. 6. – P. 852-861.
12. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. – М., 1986.
13. Мартынюк В.С., Абу Хада Р.Х. Реакция тучных клеток на действие переменных магнитных полей в условиях in vitro // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия "Биология, химия". – 2001. – Т. 14 (53), № 2. – С. 3-7.
14. Мартынюк В.С., Цейслер Ю.В., Темурьянц Н.А. Интерференция механизмов влияния слабых электромагнитных полей крайне низких частот на организм человека и животных // Геофизические процессы и биосфера. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 16-39.
15. Мельник М., Мартинюк В., Цимбалюк О., Артеменко О. Вплив електромагнітного поля наднизької частоти на викликане K^+ -деполяризацію збільшення внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію в гладеньком'язових клітинах // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Серія "Проблеми регуляції фізіологічних функцій". – 2014, № 1 (17). – С. 56-59.
16. Цимбалюк О.В., Мартынюк В.С. Влияние магнитного поля крайне низкой частоты на вызванную K^+ -деполяризацией и ацетилхолином сократительную активность интестинальных гладких мышц // Физика живого. – 2011. – Т. 19, № 1. – С. 20-25.

Надійшла до редколегії 03.07.14

М. Мельник, асп., В. Мартынюк, д-р біол. наук, А. Артеменко, канд. біол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ ЧАСТОТОЙ 8 И 50 ГЦ НА ДИНАМИКУ КОНЦЕНТРАЦИИ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО КАЛЬЦИЯ В ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТКАХ

Исследованы внутриклеточную концентрацию свободных ионов кальция в гладкомышечных клетках желудка крыс. Продemonстрировано, что в суспензии клеток внутриклеточная концентрация кальция со временем увеличивается как в контрольных образцах, так и под воздействием электромагнитного поля, но под воздействием поля эти изменения являются существенными. Одновременно с этим влиянием электромагнитного поля частотой 50 Гц индукцией 25 мкТл приводит к более существенным изменениям по сравнению с воздействием электромагнитного поля частотой 8 Гц.

Ключевые слова: ионы кальция, электромагнитное поле, внутриклеточный кальций.

M. Melnyk, PhD stud., V. Martynuk, DPhil, O. Artemenko, PhD
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

EXPOSURE OF ELECTROMAGNETIC FIELD WITH FREQUENCIES OF 8 AND 50 HZ ON DYNAMIK OF THE INTRACELLULAR CALCIUM CONCENTRATION IN SMOOTH MUSCLE CELLS

The intracellular free calcium concentration in gastric smooth muscle cells of rats has been researched. It has been demonstrated that intracellular calcium concentration in cell suspension increases with time in control as well as under electromagnetic exposure, but under electromagnetic exposure these changes are more essential. At the same time exposure of electromagnetic field with frequency of 50 Hz and induction of 25 μ T results in more essential changes in comparison with exposure of electromagnetic field with frequency of 8 Hz.

Key words: calcium ions, electromagnetic field, intracellular calcium.

УДК: 577.3

Д. Ноздренко, канд. біол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ЗАХИСНИЙ ЕФЕКТ ФУЛЛЕРЕНУ C₆₀ НА РОЗВИТОК ПРОЦЕСІВ ВТОМИ В MUSCLE SOLEUS ЩУРА ПІСЛЯ ШТУЧНОЇ ІШЕМІЗАЦІЇ

Проведено дослідження впливу C₆₀FAS при дозі 1мг/кг на ішемічно пошкоджений м'яз т. soleus щура. Досліди проводили після 5 денної часткової ішемізації. Скорочення м'яза реєстрували при внутрішньовенному та внутрішньом'язовому введенні препарату. Показано виражений захисний ефект фуллерена на скоротливу функцію м'яза. Використання фуллерена C₆₀ зменшувало розвиток процесів втоми на 20-35% при внутрішньовенному введенні і 15% при внутрішньом'язовому введенні препарату.

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

Вступ. Посттравматичне ішемічне ушкодження м'яза відбувається внаслідок місцевого гіпертензивного ішемічного синдрому [1]. Ішемічні травми скелетних м'язів після гострої артеріальної оклюзії у багатьох випадках є причиною важких патологій і смерті [2]. Також ішемічні травми скелетних м'язів, є одним з головних факторів розвитку патологій і після хірургічних процедур [3]. Швидке виявлення рівня ішемічної травми має вирішальне значення для подальшої терапії, проте нині немає точних діагностичних тестів, доступних для досягнення цієї мети [4]. Процеси ішемізації знижують силу скорочення м'яза до 40% після 1-ої години ішемії і до 90% після 2-ої год. Відновлення силової продуктивності м'яза спостерігали тільки після 2-го тижня після ішемії [5]. Патологічні процеси після ішемізації тривають в м'язі декілька днів з прогресуючою динамікою. Процеси регенерації починаються і недостатня вивченість їх роботи в умовах ішемічного ушкодження нерідко не дозволяють пояснити багато чисельні дані експериментальних досліджень. Фіксований нами в ході експерименту розвиток процесів втоми в ішемізованому м'язі дає можливість встановити важливі співвідношення між реальними макроскопічними параметрами стану ішемізованого м'язу та рівнем еферентної активності, що поступає до нього.

В роботі [6] показано що внутрішньовенне введення C₆₀(FC4S) за 15 хвилин до оклюзії в дозах 10 и 100 мг/кг, значно знижує рівень фокальної церебральної ішемії, при цьому не змінюючи рН і газовий склад крові, частоту серцевих скорочень та артеріальний тиск, і таким чином розчин фуллеренів може використовуватись як нейропротекторний агент при ішемічних ушкодженнях тканин. Літературні дані наводять безліч доказів того, що вільні радикали, а саме супероксид і гідроксид радикал є основним патогенним чинником в процесі ішемічних ушкоджень тканин. Вони спричиняють ініціацію перекисного окиснення ліпідів, пряме інгібування мітохондріальних ферментів дихального ланцюга, інактивацію гліцеральдегід-3-фосфат-дегідро-

генази, інгібують АТФ-азну активність, інактивують мембранні натрієві канали і т.д [7].

В роботах пов'язаних з пошуком препаратів які здатні впливати на патологічні процеси після процесів ішемізації показано, що аскорбінова кислота є визнаним антиоксидантом і може мати позитивний ефект для зменшення ушкоджень отриманих в результаті ішемії [8]. Також передбачається, що фуллерени можна розглядати як потужний поглинач вільних радикалів утворення яких відбувається при ішемічній травмі тонкої кишки [9]. Показано що фуллерени також можуть зменшувати ішемічні ушкодження легенів [10]. Усе це дало нам основу для дослідження впливу C₆₀FAS на динаміку протікання процесів втоми на фоні розвитку ішемічних патологій які виникають в м'язі упродовж 5 днів після ішемізації.

Методи та матеріали. Експерименти проводили на щурах-самцях лінії Wistar віком 3 місяці вагою 170±5г. C₆₀FAS у дозі 1 мг/кг вводили двома способами: внутрішньовенне і внутрішньом'язово за 1 год до початку експерименту. Анестезію тварин здійснювали внутрішньочеревним введенням нембуталу (40 мг/кг). Для ішемізації м'язів лігатурами перетягували гілку стегнової артерії тварини, яка забезпечує кровопостачання досліджуваного м'язу. Підготовка експерименту також включала канюлювання (а. carotis communis sinistra) для введення фармпрепаратів і вимірювання тиску, трахеотомію і ламінектомію на рівні поперекового відділу спинного мозку. Камбаловидний м'яз щура (muscle soleus) звільняли від оточуючих тканин. У дистальній частині уперек перерізували його сухожильну частину. Для модульованої стимуляції еферентів у сегментах L7-S1 перерізували вентральні корінці в місцях їхнього виходу зі спинного мозку.

Зміну сили скорочення м'язу реєстрували за допомогою надчутливих тензометричних датчиків, які працюють на основі вимірювання зміни опору масиву одностінних вуглецевих нанотрубок (SWCNTs) за їх деформації. SWCNTs були розташовані у задній частині мікропіпетки, а до передньої її частини приєднували сухожилок досліджуваного м'язу. Для формування стимулюючих електричних сигналів використовували програмовані генератори сигналів спеціальної форми.

Силу скорочення м'язу вимірювали на 5 добу після його ішемізації. Дослідження динамічних властивостей м'язового скорочення проводили за умов активації м'я-

зу з використанням методу модульованої стимуляції еферентів. П'ять філаментів перерізаних вентральних корінців закріплювали на стимулюючих електродах і за допомогою спеціального пристрою здійснювали циклічний розподіл послідовності електричних стимулюючих сигналів по філаментах. Розподілена стимуляція дозволила одержати монотонне та однорідне скорочення м'язу на невисоких частотах стимуляції окремих філаментів. Стимуляцію еферентів у сегментах L7-S1 здійснювали електричними імпульсами тривалістю 2 мс, сформованими за допомогою генератора імпульсів, керованим АЦП через платинові електроди. Характеристики стимулюючого сигналу задавали програмно і передавали з комплексу АЦП-ЦАП на генератор. Контроль зовнішнього навантаження на м'яз здійснювали за допомогою системи механостимуляторів.

Одержані експериментальні криві відображають зміну сили скорочення у відсотках від контрольних зна-

чень непошкодженого м'язу, які приймали за 100%. Статистичну обробку результатів вимірювання проводили методами варіаційної статистики за допомогою програмного забезпечення Origin 8.0.

Результати та їх обговорення. Важливим параметром м'язової динаміки при вивченні патогенезу ішемічного ушкодження м'язової тканини є кінетика розвитку м'язової втоми, яка викликається безрелаксацийними пулами стимуляції. В нормальних умовах скорочення, пов'язані зі втомою, здійснюють зміни в динаміці скоротливого процесу muscle soleus які проявляються тільки після 5-6 годинної стимуляції. В умовах ішемізації (рис. 1) вже після 30-40 хвилин безрелаксацийної стимуляції muscle soleus не здатний відповідати генерацією сили на стимуляційний сигнал. Лінійне зниження сили до продуктивності ішемізованого м'язу проявлялось протягом всього часу експерименту.

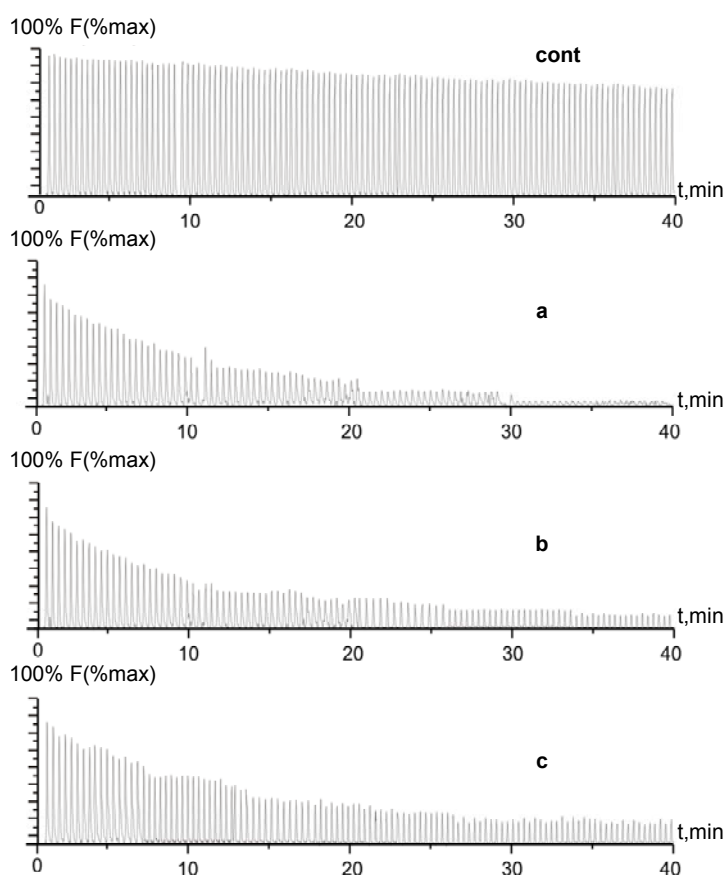


Рис. 1. Криві генерації сили ішемізованого muscle soleus (5 доба після ішемізації): а) без впливу; б) внутрішньом'язове введення C_{60} 1мг/кг; в) введення C_{60} втрутливо (доза 1 мг/кг)

Введення фуллерена C_{60} виявило захисний ефект на розвиток м'язової втоми на рівні 15% при внутрішньом'язовому і 20-23% при внутрішньовенному введенні (рис. 2). Слід відмінити що при введенні препарату muscle soleus продовжував генерувати сили відповіді на пули стимуляції на рівні 20-25% від контролю при внутрішньовенному і 10-15% при внутрішньом'язовому введенні упродовж 2 годин, не знижуючи досягнутого рівня сили відповіді. При внутрішньовенному введенні C_{60} на 25-30 хвилині дослідження зниження сили до продуктивності muscle soleus зупинялась і трималась на досягнутому рівні, упродовж 2 годин безрелаксацийної стимуляції.

Ці ефекти можуть бути пов'язані з тим, що, 2 годинна ішемія камбаловидного м'язу істотно знижує концентрацію АТФ, одночасно з значним збільшенням рівня лактату. При 3 годинній ішемії виснаження запасів АТФ складає близько 95%, а глікоген вичерпаний на 88% [11]. Ці результати підтверджують гіпотезу, що велика кількість високоенергетичних фосфатів витрачається пошкодженою м'язовою клітиною на підтримку гомеостазу, в результаті порушення обміну речовин і призводить тим самим до великого рівня втомлюваності м'язу. Тому захисна дія C_{60} FAS на процеси втоми ішемічного пошкодженого м'язу швидше за все пов'язана з його антиоксидантними властивостями.

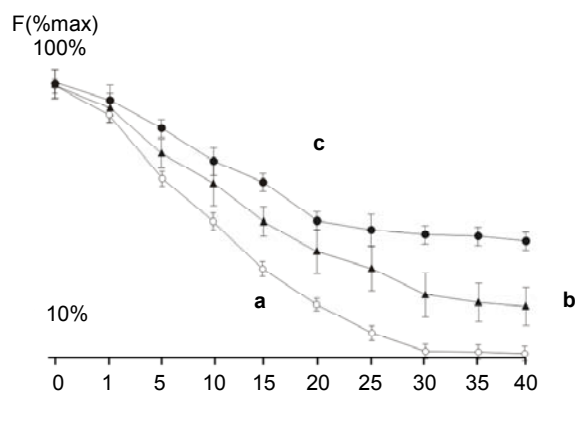


Рис. 2. Зміна сили ішемізованого м'язу (muscle soleus) при втомі, викликаній стимуляційними пулами без релаксації (5 доба після ішемізації): (a) – ішемія без впливу препарату (контроль); (b) – внутрішньом'язове введення C₆₀FAS (1 мг/кг); (c) внутрішньовенне введення C₆₀FAS – (1 мг/кг)

Таким чином розвиток медичних нанотехнологій із застосуванням C₆₀FAS, з урахуванням їх виражених антиоксидантних властивостей, і відсутність даних про гострі і хронічні інтоксикації ними – усе це відкриває нові можливості для лікування і профілактики ішемічних патологій. Одержані результати значно поглиблюють та розширюють уявлення про біофізичні механізми функціонування скелетних м'язів при дії наночастинок. Встановлена в експериментах протекторна дія C₆₀ фулеренів на динамічні параметри скорочення ішемічно пошкодженої поперечно-посмугованої м'язової тканини може скласти основу для розробки рекомендацій щодо лікування зазначеної патології скелетної мускулатури.

Список використаних джерел

1. Murdock M, Murdoch MM. Compartment syndrome: a review of the literature. Clin Podiatr Med Surg. 2012 Apr;29(2):301-10.
2. Effects of ascorbic Acid, alpha-tocopherol and allopurinol on ischemia-reperfusion injury in rabbit skeletal muscle: an experimental study. Erkut B, Özyazıcıoğlu A, Karapolat BS, Koçoğulları CU, Keles S, Ateş A, Gundogdu C, Kocak H. Drug Target Insights. 2007;2:249-58. 2007 Nov 2.
3. The role of mast cells and fibre type in ischaemia reperfusion injury of murine skeletal muscles. Bortolotto SK, Morrison WA, Messina A. J Inflamm (Lond). 2004 Sep 27;1(1):2.

4. Muscle fiber viability, a novel method for the fast detection of ischemic muscle injury in rats. Turóczy Z, Arányi P, Lukáts Á, Garbaisz D, Lotz G, Harsányi L, Szijártó A. PLoS One. 2014 Jan 13;9(1).

5. The functional and morphological damage of ischemic reperfused skeletal muscle. Rácz IB, Illyés G, Sarkadi L, Hamar J. Eur Surg Res. 1997;29(4):254-63.

6. Neuroprotective effect of hexasulfobutylated C60 on rats subjected to focal cerebral ischemia. Huang SS, Tsai SK, Chih CL, Chiang LY, Hsieh HM, Teng CM, Tsai MC. Free Radic Biol Med. 2001 Mar 15;30(6):643-9.

7. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Pharmacol Rev 2001; 53:135-159.

8. Effects of ascorbic Acid, alpha-tocopherol and allopurinol on ischemia-reperfusion injury in rabbit skeletal muscle: an experimental study. Erkut B, Özyazıcıoğlu A, Karapolat BS, Koçoğulları CU, Keles S, Ateş A, Gundogdu C, Kocak H. Drug Target Insights. 2007;2:249-58. 2007 Nov 2.

9. Free radical scavenging activity of fullerene on the ischemia-reperfusion intestine in dogs. Lai HS, Chen WJ, Chiang LY. World J Surg. 2000 Apr;24(4):450-4.

10. Fullerene derivative attenuates ischemia-reperfusion-induced lung injury. Lai YL, Murugan P, Hwang KC. Life Sci. 2003 Jan 31;72(11):1271-8.

11. Metabolic and contractile responses of fast and slow twitch rat skeletal muscles to ischemia and reperfusion. Carvalho AJ, McKee NH, Green HJ. Plast Reconstr Surg. 1997 Jan;99(1):163-71.

Надійшла до редколегії 03.07.14

Д. Ноздренко, канд. біол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ЗАЩИТНЫЙ ЭФФЕКТ ФУЛЛЕРЕНА C₆₀ НА РАЗВИТИЕ ПРОЦЕССОВ УСТАЛОСТИ В MUSCLE SOLEUS КРЫСЫ ПОСЛЕ ИСКУССТВЕННОЙ ИШЕМИЗАЦИИ

Проведено исследование влияния C₆₀FAS при дозе 1мг/кг на ишемически поврежденную мышцу m. soleus крысы. Опыты проводили после 5 дневной частичной ишемизации. Сокращения мышцы регистрировали при внутривенном и внутримышечном введении препарата. Показан выраженный защитный эффект фуллерена на сократительную функцию мышцы. Использование фуллерена C₆₀ уменьшало развитие процессов усталости на 20-35% при внутривенном введении и 15% при внутримышечном введении препарата.

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

D. Nozdrenko, PhD
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

PROTECTIVE EFFECT OF FULLERENES C₆₀ ON MUSCLE SOLEUS DEVELOPMENT PROCESS AFTER ARTIFICIAL ISCHEMIA

The effect of C₆₀FAS (dose 1mg/kg) on ischemized soleus muscle of rat was investigated. Experiments were carried out after 5 day partial ischemia. Muscle contraction was recorded in different animals after intravenous and intramuscular administration of the drug. Results demonstrate evident protective effect of fullerene on function of ischemized muscle. C60 helped to preserve muscle endurance at the level 15% and 20-23% higher refer to control after intravenous and intramuscular infusion accordingly.

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

УДК 616-006.04:277.3

Л. Гарманчук, д-р біол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ЕПІДЕРМАЛЬНИЙ ФАКТОР РОСТУ ПІДСИЛЮЄ ЦИТОТОКСИЧНИЙ/ЦИТОСТАТИЧНИЙ ЕФЕКТ НІМОТУЗУМАБУ ТА ПРОАПОПТИЧНУ ДІЮ β -D-КСИЛОФУРАНОЗИДУ НА КЛІТИНИ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

Оцінено ефективність комбінованого впливу на пухлинні клітини раку молочної залози лінії MCF-7 антитіл до рецептора епідермального фактору росту – німотузамабу, синтетичної сполуки – β -D-ксилофуранозиду (Nu-13, глікозидний аналог 6-азацитидину) в поєднанні з мітогеном епідермальним фактором росту. Показано, що ЕФР підсилює цитотоксичну/цитостатичну дію німотузамабу, та проапоптичну Nu-13.

Ключові слова: пухлинні клітини, рак молочної залози, епідермальний фактор росту.

Вступ. Стратегії комбінованої терапевтичної проти-пухлинної дії на сьогодні включають вплив на різні молекулярні та клітинні мішені, які задіяні в прогресії новоутворень і є нечутливими до проапоптичних ендогенних та екзогенних сигналів [1-2]. Найбільш вивченим механізмом пригнічення апоптозу, який лежить в основі пухлинної трансформації, є аутокринне і паракринне підвищення експресії ростових факторів і/чи рецепторів до них в клітинах пухлинного клону. Більшість пептидних факторів росту проявляють мітогенні властивості і можуть діяти в аутокринних і/чи паракринних метаболічних петлях, визначаючи ступінь злоякісності пухлин [3-5]. Рецептори з тирозинкіназною активністю, індукція яких специфічними мітогенами відбувається переважно за аутокринним механізмом за пухлинного росту, є однією із головних мішеней селективної направленої проти-пухлинної терапії [2, 6]. РЕФР – тирозинкіназний рецептор епідермального фактору росту, функціональна роль котрого пов'язана з адгезією, проліферацією та міграцією клітин [6-8]. Порушення взаємодій у системі ліганд-РЕФР приводить до посилення експресії клітинних протоонкогенів. Підвищена експресія РЕФР спостерігається у 30% карцином людини і корелює з рівнем пухлинної інвазії та метастазування [7,8]. Зокрема вважають, що ErbB1 відіграє важливу роль у розвитку раку легень і товстої кишки, а ErbB2 (або HER2) слугує потужним онкогеном, задіяним у патогенезі раку молочної залози [9]. Тому пригнічення експресії рецепторів родини РЕФР на сьогодні є одним із широко використовуваних прийомів проти-пухлинного впливу. Прикладом таргетної терапії, мішенню якої є система ліганд-РЕФР, є застосування герцептину – гуманізованих моноклональних антитіл до рецептору ЕФР другого типу (Erb B II/Her 2 neu) [9-12]. Таргетна проти-пухлинна терапія зазначеної спрямованості включає блокування рецепторів специфічними моноклональними антитілами, інгібування тирозинкіназ цих рецепторів, використання кон'югатів "ліганд-токсин" з цитотоксичною активністю, неспецифічне блокування рецепторів антагоністами, використання антисенсорних олігонуклеотидів, направлених на регуляцію експресії рецепторів або їх лігандів [8-10]. Одним із перспективних напрямків вирішення проблеми пригнічення проліферації злоякісно трансформованих клітин є розробка кон'югатів цитотоксичних препаратів з векторними поліпептидами [13]. Вибірковість транспорту в даному випадку досягається за рахунок здатності ліганду (вектора) до високоафінного зв'язування із специфічними рецепторами, експресованими лише/переважно на клітинах-мішенях. Однак, створення лікарських форм препаратів на основі таких кон'югатів потребує додаткових технологічних розробок, дослідження їх фармакодинаміки, фармакокінетики, тощо. З іншого боку, суттєвою проблемою в проти-пухлинній терапії є клітини пухлин, що знаходяться в G₀-фазі клітинного циклу, оскільки біодоступність до них як хіміопрепаратів, так і гуманізованих антитіл є ниж-

чою, ніж до клітин проліферативного пулу (S+G₂/M). Тому розробляються додаткові підходи щодо застосування сполук, які можуть синхронізувати пухлинні клітини в синтетичній фазі (S), чутливість яких висока до проти-пухлинних препаратів, що є інтерколяторами ДНК; до антибулінових препаратів (G₂-M перехід); підвищувати чутливість до р53-індукованого апоптозу та ін. Саме тому, в даному експерименті в якості екзогенного стимулятора синтезу ДНК в клітинах MCF-7 (аденокарцинома молочної залози) з високим рівнем експресії РЕФР було використано ліганд РЕФР – ЕФР та оцінено його вплив на клітини в поєднанні з новосинтезованою сполукою – глікозидним аналогом 6-азацитидину - β -D-ксилофуранозидом (Nu-13), що проявила виражений цитотоксичний/антипроліферативний ефект до цих клітин [14] та німотузамабом (НТМ) – проти-пухлинним препаратом, вплив якого індукується шляхом інгібування кіназ-залежного фосфорилування РЕФР, що призводить до зупинки клітинного циклу в G₁ фазі. Отже, **мета** роботи полягала у визначенні цитотоксичного/цитостатичного, проапоптичного впливу НТМ, та Nu-13 у поєднанні з ЕФР по відношенню до клітин MCF-7.

Матеріали та методи досліджень. Клітини MCF-7 інкубували в середовищі DMEM (Sigma, США) з додаванням 10% ембріонального телячого сироватки (ЕТС, Sigma, США), 2мМ L-глутаміна та 40 мкг/мл гентаміцину за стандартних умов при 37°C та 5% CO₂. Досліджувані сполуки додавали до клітин, що досягали 70-80% моношару. У випадку визначення комбінованого впливу, ЕФР вносили в середовище інкубації в концентрації 5 нМ за півгодини до внесення Nu-13 або НТМ. Nu-13 титрували в діапазоні концентрацій 10⁻⁶-10⁻³ М. НТМ використовували у лікарській формі (терапевтична доза складає 150 мг/м² за введення 1 раз на тиждень – або у нашому випадку із розрахунку на 100 тис кл/мл інкубаційного середовища – 1,5 мкг НТМ). Цитотоксичний/цитостатичний, антипроліферативний ефект та життєздатність клітин визначали в МТТ-тесті [15, 16] за включенням в живі клітини розчинного в фізіологічних буферах барвника 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифеніл-2-тетразоліум броміду та перетворення його мітохондріальними дегідрогеназами в нерозчинні кристали форми фармачеу фіолетового кольору. Після розчинення останніх в диметилсульфоксиді, концентрацію живих клітин визначали за інтенсивністю забарвлення розчину в колориметричному аналізі при довжині хвилі 570 нм.. Співвідношення живих та мертвих клітин, за включенням в останні барвника трипанового синього, визначали рутинним підрахунком в камері Горяєва. Розподіл пухлинних клітин згідно фаз клітинного циклу та відносну кількість апоптичних клітин аналізували методом проточної цитофлуориметрії [17]. Субстратну залежність та морфологію клітин було оцінено після зафарбовування клітин фіолетовим кристалічним як описано нами раніше [18]. Досліджувані показники визначали після 48 годинної інкубації клітин з агентами.

Як контроль використовували клітини, які інкубували за таких же умов без агентів. Цитотоксичний ефект визначали за відсотком мертвих клітин, цитостатичний – відносним вмістом клітин в G_0 -фазі та концентрацією живих клітин відносно контролю. Субстратну залежність визначали за концентрацією прикріплених клітин до субстрату. Статистичний аналіз проводили за t-критерієм, достовірно значимими вважали відмінності при $P < 0.05$

Результати та їх обговорення. Як свідчать наведені дані, цитотоксичний/цитостатичний ефект НТМ в комбінації з ЕФР по відношенню до клітин MCF-7 становив 56% ($p < 0,05$) відносно контролю, в той час як додавання НТМ призводило до зменшення вмісту живих клітин, порівняно з контролем на 45% ($p < 0,05$); (рис.1).

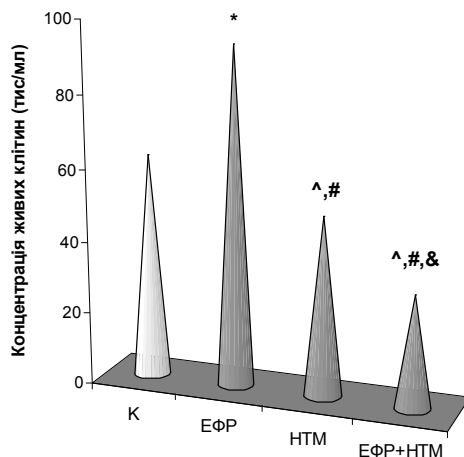


Рис.1. Вміст живих клітин MCF-7 за впливу німотузамабу (НТМ), та НТМ в комбінації з ЕФР. Термін інкубації клітин з агентами та в контролі – 48 годин

* – $P < 0.05$, порівняно з контролем; [^] – $P < 0.05$, порівняно з НТМ; & – порівняно з ЕФР

Як видно з наведених даних, концентрація живих клітин, визначена за рутинним підрахунком та в МТТ-тесті, за впливу НТМ знизилась в 1,2 рази ($P < 0.05$) проти контролю, тоді як за спільного впливу НТМ та ЕФР цей показник був нижчим вдвічі ($P < 0.05$) проти контролю і в 1,6 рази ($P < 0.05$) проти НТМ, та майже втричі –

порівняно з дією ЕФР. Такий же ефект по відношенню до клітин MCF-7 спостерігався за комбінованою дією Nu-13 з ЕФР: – інкубація клітин з Nu-13 в концентраціях 0,064, 0,016, 1 та 4 мМ та передінкубацією з ЕФР в концентрації 5 нМ, характеризувалась підсиленням цитотоксичного ефекту в середньому на $21,4 \pm 3,1\%$ ($P < 0.05$) (рис.2).

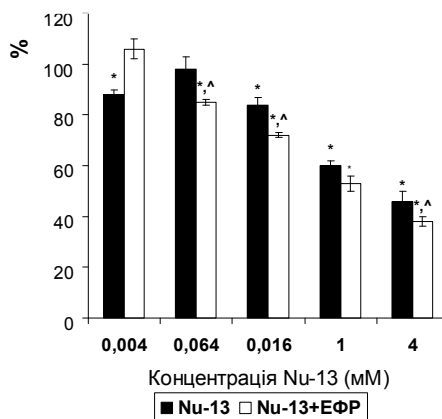


Рис. 2. Цитотоксичний/цитостатичний скринінг Nu-13 в діапазоні концентрацій (0,004-4мМ), застосованого самостійно та у комбінації з ЕФР (5 нМ), по відношенню до клітин MCF-7

* – $P < 0.05$, порівняно з контролем, [^] – $P < 0.05$, порівняно з Nu-13

При визначенні розподілу клітин за фазами циклу, 60% яких в контролі перебували в G_0/G_1 фазі (табл.1) було показано, що тест-агенти по-різному впливали на ці показники.

Таблиця 1. Розподіл клітин MCF-7 згідно фаз клітинного циклу за впливу НТМ, Nu-13, ЕФР, застосованих самостійно та у поєднанні

Тест-зразки	G_0/G_1 , %	S, %	G_2/M , %
Контроль	$58,8 \pm 2,1$	$32,6 \pm 1,3$	$8,4 \pm 1,6$
ЕФР	$38,9 \pm 0,9^*$	$46,9 \pm 1,4^*$	$14,0 \pm 1,9$
НТМ (1,5 мкг/мл)	$73,4 \pm 1,4^*$	$25,3 \pm 3,1$	$3,0 \pm 0,3^*$
НТМ (1,5 мкг/мл)+ЕФР(5нМ)	$78,3 \pm 2,2^{*^{\wedge}}$	$20,4 \pm 1,3^*$	$3,9 \pm 1,3^*$
Nu-13 ($1,6 \times 10^{-5}$ М)	$62,2 \pm 0,9$	$34,9 \pm 3,6$	$2,9 \pm 0,4^*$
Nu-13 ($1,6 \times 10^{-5}$ М)+ЕФР (5 нМ)	$49,0 \pm 3,7^{*^{\wedge}}$	$41,5 \pm 0,1^{*^{\wedge}}$	$9,5 \pm 2,2$

* – $P < 0.05$, порівняно з контролем; [^] – $P < 0.05$, порівняно з НТМ та Nu-13, застосованих самостійно

Як свідчать отримані дані, НТМ мав цитостатичний, цитотоксичний та проапоптичний вплив (табл.1 табл.2). Так, при додаванні до культивованих клітин НТМ, відносна кількість клітин у фазах G_0/G_1 зростала в 1,2 рази ($P<0.05$), порівняно з контролем, відсоток апоптичних клітин зростав в 4 рази ($P<0.01$), а мертвих клітин майже в 2 рази ($P<0.05$). Попередня інкубація клітин з ЕФР (5 нМ) 0,5 години перед додаванням НТМ характеризувалась збільшення відносного вмісту клітин в G_0/G_1 фазі до $78,3 \pm 2,2\%$, проти $73,4 \pm 1,4\%$ за впливу НТМ, $58,8 \pm 2,1\%$ в контролі та $38,9 \pm 0,9\%$ за впливу ЕФР.

Відбувся також перерозподіл в концентрації апоптичних та мертвих клітин – зменшення відсотку апоптичних, порівняно з впливом самого лише НТМ та збільшення мертвих, відповідно.

За впливу Nu-13 відсоток клітин в G_0/G_1 майже не відрізнявся від такого у контролі, тоді як за впливу Nu-13+ЕФР можна було спостерігати збільшення популяції клітин проліферативного пулу, як в порівнянні з контролем, так і з Nu-13 (табл.1). Проте, виявлено збільшення відносної кількості апоптичних клітин, як порівняно з контролем, так і за дії Nu-13 (табл.2)

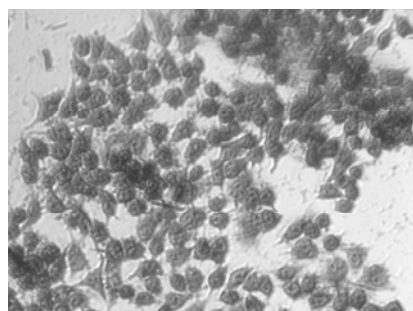
Таблиця 2. Відсоток апоптичних та мертвих клітин MCF-7 за впливу НТМ, Nu-13, ЕФР, застосованих самостійно та у поєднанні

Тест-зразки	Вміст апоптичних клітин, %	Вміст мертвих клітин, %
Контроль	$6,4 \pm 1,1$	$9,3 \pm 1,8$
ЕФР	$2,1 \pm 0,2^*$	$0,5 \pm 0,0^*$
НТМ (1,5 мкг/мл)	$24,5 \pm 0,3^*$	$17,4 \pm 3,5^*$
НТМ (1,5 мкг/мл)+ЕФР(5нМ)	$11,3 \pm 0,9^* \wedge$	$34,6 \pm 2,2^* \wedge$
Nu-13 ($1,6 \times 10^{-5} M$)	$13,5 \pm 2,8^*$	$14,4 \pm 0,3^*$
Nu-13 ($1,6 \times 10^{-5} M$)+ЕФР (5 нМ)	$19,4 \pm 0,7^* \wedge$	$16,7 \pm 2,1^*$

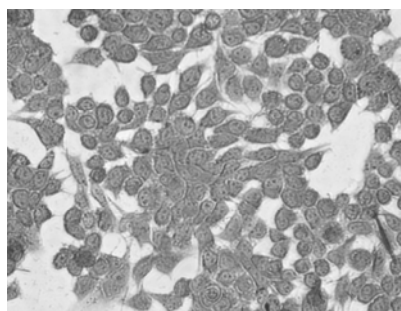
* $\wedge$ – $P<0.05$, порівняно з контролем та одноосібним використанням тест-зразка

При визначенні морфологічних особливостей та формування локусів адгезії за дії всіх досліджуваних тест-зразків клітини після відмивки фізіологічними буферами профарбовували фіолетовим кристалічним, як описано [18]. Як видно із фото (рис.3.), за впливу НТМ

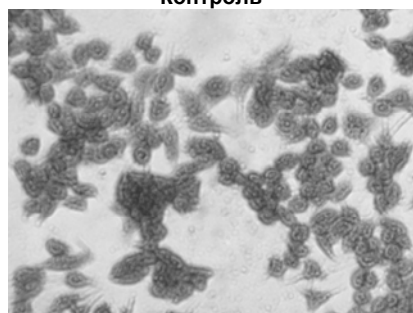
самостійно та в поєднанні з ЕФР спостерігалось скупчення клітин, з формуваннями в окремих зонах аналогів багатоклітинних сфероїдів, тоді як під впливом Nu-13 та Nu-13+ЕФР клітини набували еліпсоїдної фіорми з видовженими відростками.



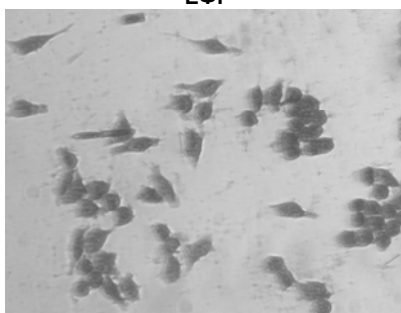
Контроль



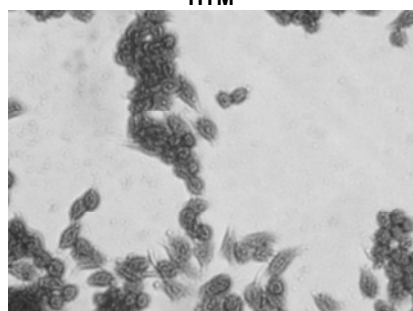
ЕФР



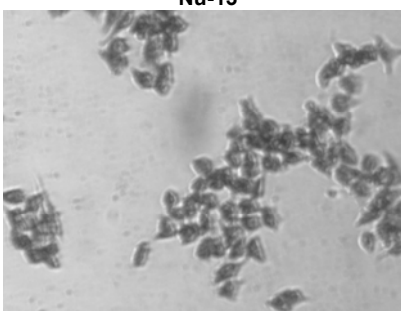
НТМ



Nu-13



НТМ+ЕФР



Nu-13+ЕФР

Рис.3. Морфологічні особливості прикріплених до субстрату клітин за дії ЕФР, НТМ, Nu-13, застосованих самостійно та в поєднанні; забарвлення фіолетовим кристалічним; $\times 320$

Отже, проведене дослідження з використанням культивованих пухлинних клітин MCF-7 з високим рівнем експресії РЕФР показало, що цитотоксичний/цитостатичний ефект за спільної дії специфічного ліганду до РЕФР у поєднанні з препаратом таргетної дії, направленої на РЕФР зростає. Поєднання впливу ЕФР та глікозидного аналогу 6-азацитидину Nu-13 характеризувалось збільшенням відносного вмісту апоптичних клітин, як порівняно з контролем, так і за впливу одного лише Nu-13. Визначення механізмів комбінованого впливу ЕФР із НТМ та Nu-13 потребують подальших досліджень.

Висновок:

Таким чином, застосування гуманізованих антитіл (німотузумаба) до рецептора ЕФР 1 типу в комбінації з ЕФР може розглядатись як ефективна антипроліферативна комбінація по відношенню до пухлинних клітин з експресією рецепторів ЕФР. Щодо Nu-13, то за сумісної дії з ЕФР виявлено збільшення відносного вмісту апоптичних клітин.

Список використаних джерел

1. Boyd M Status of NCI. Preclinical antitumor drug discovery screen. // Principles and practice of oncology. – 1989. – v.3, N10. – P.1-12.
2. Vacchelli E et al. Trial Watch: Tumor-targeting monoclonal antibodies in cancer therapy. *Oncimmunology*. 2014 Jan 1;3(1):e27048. PMID 24605265.
3. Копнин Б.П. Неопластическая клетка: основные свойства и механизмы их возникновения // Практическая онкология. – 2002. – Т.3, №4 – с.229-237.
4. Чумаков П.М. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме // Успехи биологической химии. – 2007. – Т.42, с3-52.
5. Edelweiss E, Balandin TG, Ivanova J Let all Barnase as a new therapeutic agent triggering apoptosis in human cancer cells // *PLoS One*. – 2008. – Т. 18. – P234-287.
6. Knowlden J.M., Hutcheson I.R., Jones H.E., et al. Elevated levels of epidermal growth factor receptor/c-erbB2 heterodimers mediate an

autocrine growth regulatory pathway in tamoxifen-resistant MCF-7 cells. // *Endocrinology*. – 2003. – Vol.144, No.3. – P.1032-44.

7. Riese D.J., Stern D.F. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. // *Bioessays*. – 1998. – Vol.20. – P.41-8.

8. Oliveira S, van Bergen en Henegouwen PM, Storm G, Schifferle RM. Molecular biology of epidermal growth factor receptor inhibition for cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2006;6(6):605-17.

9. Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:505-16.

10. R.Melarkode.An. Eswaraiiah, T. Crombet, et all. Nimotuzumab, a promising therapeutic monoclonal antibody for treatment of tumors of epithelial origin. // *MAbs* 2009,1 (1): 41-48. PMID 20046573.

11. Biswas DK1, Cruz AP, Gansberger E, Pardee AB. Epidermal growth factor-induced nuclear factor kappa B activation: A major pathway of cell-cycle progression in estrogen-receptor negative breast cancer cells // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2000. – 97(15). – 8542-7.

12. Mateo C, Moreno E, Amour K, Lombardero J, Harris W, Pérez R. Humanization of a mouse monoclonal antibody that blocks the epidermal growth factor receptor: Recovery of antagonistic activity. *Immunotechnology* 1997;3:71-81 PMID 9154469.

13. Severin S.E., Moskaleva E.Yu., Posypanova G.A., et all In vivo antitumor activity of cytotoxic drugs conjugated with human α -fetoprotein. // *Tumor Targeting*. – 1996. – Vol. 2. – P. 299-306.

14. Пальчиковська Л.Г., Гарманчук Л.В., Алексеева І.В., та ін. N1-глікозидні аналоги 6-азацитидину. II. Цитотоксична дія та вплив на транскрипцію in vitro. *Біополімери і клітина*, 2005, 21, №5, 432-438.

15. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays // *J Immunol Methods*. – 1983. – 65, N 1-2. – P. 55-63.

16. Alley M.C., Scudiero D.A., Monks P.A. Hursey M.L., Czerwinsky M.J, Fine D.L., Abbott B.J., Mayo J.G., Shoemaker R.H., Boyd M.R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay // *Cancer Research*. – 1988. – 48. – P.589-601.

17. Nicoletti I., Migliorati G., Pagliacci M.C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry // *J. Immunol. Methods* 1991;139(2):271-280.

18. Л.В.Гарманчук, О.М.Перепелицина, І.І.Гринюк, та ін. Вплив фулеренів C60 на адгезивні властивості клітин раку молочної залози // *Доповіді національної академії наук України*, 2009, №4. – с. 164-167.

Надійшла до редколегії 08.07.14

Л. Гарманчук, д-р биол. наук.

КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ЭПИДЕРМАЛЬНЫЙ ФАКТОР РОСТА УСИЛИВАЕТ ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ / ЦИТОСТАТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ НИМОТУЗУМАБУ И ПРОАПОПТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ β -D-КСИЛОФУРАНОЗИДУ НА КЛЕТКИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Оценена ефективність комбінованого впливу на опухолеві клітини раку молочної залози лінії MCF-7 антитіл к рецептору епідермального фактора росту – німотузумабу, синтетического соединения – β -D-ксилофуранозиду (Nu-13 глікозидну аналог 6-азацитидину) в соєднанні з мітогеном епідермальним фактором росту. Показано, що ЕФР посилює цитотоксическое / цитостатическое действие німотузумабу и проапоптотичну Nu-13.

Ключевые слова: опухолевые клетки, рак молочной железы, эпидермальный фактор роста.

L. Garmanchuk, DSc

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

EGF INCREASES CYTOTOXIC/CYTOSTATIC EFFECT OF NIMOTUZUMAB AND PROAPOPTOTIC ACTION OF 6-AZACYTOSINE β -D-XYLOFURANOSIDE TO CELLS OF BREAST ADENOCARCINOMA (MCF-7)

The efficiency of the combined effects on tumor cells of breast cancer MCF-7 antibodies to epidermal growth factor receptor – nimotuzumab, synthetic compounds – β -D-xylofuranoside (Nu-13, glycoside analogue 6 azacytosine) in combination with epidermal growth factor. Shown that EGF enhances the cytotoxic / cytostatic effect nimotuzumabu and proapoptotic action Nu-13.

Keywords: tumor cells, breast cancer, epidermal growth factor.

Наукове видання



ВІСНИК
КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
БІОЛОГІЯ
Випуск 2(67)

Друкується за авторською редакцією

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

Автори опублікованих матеріалів несуть повну відповідальність за підбір, точність наведених фактів, цитат, статистичних даних, відповідної галузевої термінології, імен власних та інших відомостей. Редколегія залишає за собою право скорочувати та редагувати подані матеріали. Рукописи та матеріали на електронних носіях не повертаються.



Формат 60x84^{1/8}. Ум. друк. арк. 10,8. Наклад 300. Зам. № 214-7084.
Гарнітура Arial. Папір офсетний. Друк офсетний. Вид. № Б 2.
Підписано до друку 11.07.14

Видавець і виготовлювач
Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет"
01601, Київ, б-р Т. Шевченка, 14, кімн. 43
☎ (38044) 239 3222; (38044) 239 3172; тел./факс (38044) 239 3128
e-mail: vpc@univ.kiev.ua
<http://vpc.univ.kiev.ua>
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 1103 від 31.10.02