

DOI 10.17721/1728_2748.2020.80.1-68

Наведено 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 та медицини" у 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.

Приведены экспериментальные данные об особенностях строения, развития и функционирования растительных и животных организмов, флору и фауну Украины, полученные на основе исследований, проводимых учеными УНЦ "Институт биологии и медицины" 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 and medicine" 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	Л. І. Остапченко, д-р біол. наук, проф.
РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ	Є. О. Торгалло, канд. біол. наук (відп. секр.); С. Є. Вакал, канд. біол. наук (техн. секр.); Шандор Макай, д-р біол. наук, проф. (м. Сомбатхей, Угорщина); Іван Бубриак, канд. мед. наук (Оксфорд, Велика Британія); В. Г. Хоперія, д-р мед. наук, проф.; Д. М. Говорун, д-р біол. наук, проф., чл.-кор. НАН України (м. Київ, Україна); В. С. Мартинюк, д-р біол. наук, проф.; М. Ю. Макаруч, д-р біол. наук, проф.; Н. Ю. Таран, д-р біол. наук, проф.; А. В. Сиволюб, д-р біол. наук, проф.; В. В. Джаган, канд. біол. наук, доц.; А. Г. Мойсєєнок, д-р біол. наук, проф., чл.-кор. (м. Гродно, Білорусь), О. В. Жолос, д-р біол. наук, проф.; Брайон Каленгхем, д-р мед. наук, проф. (м. Кембридж, Великобританія); Т. В. Берегова, д-р біол. наук, проф.; С. В. Пилипенко, д-р біол. наук, проф. (м. Полтава, Україна); М. Є. Дзержинський, д-р біол. наук, проф.; О. Я. Скляр, д-р мед. наук, проф. (м. Львів, Україна); Абенаволі Людовіко, д-р мед. наук (м. Катандзаро, Італія)
Адреса редколегії	ННЦ "Інститут біології та медицини"; просп. акад. Глушкова, 2а, Київ, Україна, 03127 ☎ (38044) 521-35-98; www.biovestnik.com ; bulletin.vestnik@gmail.com
Затверджено	Вченою радою ННЦ "Інститут біології та медицини" 10.03.20 (протокол № 8)
Атестовано	Вищою атестаційною комісією України. Постанова Президії ВАК України № 1-05/3 від 14.04.10
Зареєстровано	Міністерством юстиції України. Свідоцтво про державну реєстрацію КВ № 16053-4525 ПР від 09.11.09
Засновник та видавець	Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет"
Адреса видавця	Свідоцтво внесено до Державного реєстру ДК № 1103 від 31.10.02 ВПЦ "Київський університет" (кімн. 43), 6-р Т. Шевченка, 14, Київ, Україна, 01030 ☎ (38044) 239 31 72, 239 32 22; факс 239 31 28
Журнал входить до наукометричних баз / Abstracted and Indexed:	Index Copernicus (з 2012 р. ICV-2013 = 5,93), Cite Factor (з 2014 р.), Research Bible (з 2013 р.), Academic Keys (з 2013 р.), DOAJ (з 2013 р.), EBSCO.EJS (з 2012 р.), Free medical journals list of Geneva Foundation for Medical Education and Research (з 2014 р.); HINARI (з 2013 р.); Medical Journals Links (з 2013 р.); OAJI (з 2012 р.); The Knowledge Network (з 2014 р.); Ulrich's Periodicals Directory (з 2012 р.); WorldCat (з 2013 р.).

DOI 10.17721/1728_2748.2020.80.1-68

Collection of articles written by the scientists of ESC "Institute of biology and medicine" 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.

Наведено 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 та медицини" у 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.

Приведены экспериментальные данные об особенностях строения, развития и функционирования растительных и животных организмов, флору и фауну Украины, полученные на основе исследований, проводимых учеными УНЦ "Институт биологии и медицины" 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.

EDITOR-IN-CHIEF	Ostapchenko Lyudmila, Dr. Sci., Prof.
EDITORIAL BOARD	Torgalo Elizabeth, Ph. D.; Sergii Vakal, Ph. D. (Tech. Editor); Sandor Makai, Prof. Dr. habil. Dr. h. c. (Szombathely, Hungary); Ivan Boubriak, Ph. D. (Oxford, United Kingdom); Koperiay Viktoriay, Dr. Sci.; Dmytro Hovorun, Dr. Sci., Prof., Corresponding Member of the NASU, Deputy Director (Kyiv, Ukraine); Viktor Martynyuk, Dr. Sci., Prof.; Mykola Makarchuk, Dr. Sci., Prof. Head of the Chair; Nataliia Taran, Dr. Sci., Prof., Head of the Chair of Plant Biology; Andrii Sivolob, Dr. Sci., Prof.; Veronika Dzhagan, Ph. D., Assoc. Prof.; Andrei Moisieenok, Dr. Sci., Prof., Corresponding Member of the NASB (Grodno, Belarus), Alexander Zholos, Dr. Sci., Prof.; Brian Callingham, Dr. Sci., M. D., Prof. (Cambridge, United Kingdom); Tetiana Berehova, Dr. Sci., Prof.; Sergey Pilipenko, Dr. Sci., Prof. (Poltava, Ukraine); Mykola Dzerzhynskyi, Dr. Sci., Prof.; Olexandr Sklyarov, Dr. Sci., M. D., Prof. (Lviv, Ukraine); Ludovico Abenavoli, Ph. D., M. D., Assoc. Prof. (Catanzaro, Italy)
Editorial address	ESC "Institute of Biology and Medicine", 2a, acad. Glushkov av., Kyiv, 03127, Ukrainian ☎ (38044) 521 35 98; www.biovestnik.com; bulletin.vestnik@gmail.com
Approved by	The Academic Council of the ESC "Institute of Biology and Medicine" 10.03.20 (Protokol № 8)
Attested by	Higher Attestation Commission of Ukraine HAC Presidio decree № 1-05/3 (April 14th, 2010)
Registered by	Ministry of Justice of Ukraine. Registration certificate KV № 16053-4525 ПП (November 9th, 2009)
Founded and Published	Taras Shevchenko National University of Kyiv, Publishing house "Kyiv University". Certificate included in the State Register ДК № 1103 від 31.10.02
Publisher's Address	Publishing and Printing Centre "Kyiv University" (off. 43), 14 Taras Shevchenko av., Kyiv, 01030, Ukraine ☎ (38044) 239 31 72, 239 32 22; Fax: 239 31 28
Abstracted and Indexed:	Academic Keys, CiteFactor, Directory of Open Access Journals (DOAJ), E-Library.ru, Hinari, Geneva Foundation for Medical Education and Research, DRJI, Open Academic Journal Index (OAJI), Quality Open Access Market (QOAM), ResearchBib, Ulrich's Periodicals, WorldCat, Ukrainian scientific journals

ЗМІСТ

Кир'яченко Є., Оскирко О., Удовиченко І., Галенова Т. Гемолітична активність секретів шкірних залоз амфібій, поширених на території України	6
Ставнійчук А., Савчук О., Абдул Хе Хан, В. К. Янкевіч, Дж. Д. Іміг, Д. Мерк Вплив сполуки DM509 на фіброз нирок в умовах експериментальної моделі	10
Дмитрик В., Савчук О., Яковлев П. Показники деяких компонентів системи активації плазміногену при раку сечового міхура	15
Олійник Ж., Сенчило Н., Довбинчук Т., Степаненко С., Гузик М. Реактивний астрогліоз у щурів із ЛПС-індукованою хворобою Паркінсона	19
Чернишенко К., Колесник О., Веселовський М. Закономірності спонтанного квантового вивільнення глутамату в синапсах нейронів первинної культури гіпокампа при довготривалій депресії синаптичної передачі	25
Куценко Т. Вплив когнітивного навантаження на прояв емоційного ефекту Струпа	30
Кравченко В., Демидова К. Варіативність серцевого ритму при перегляді емоційно забарвлених зображень у жінок у різні фази менструального циклу	35
Короткий О., Кот Л., Дворщенко К. Перекисне окиснення ліпідів у хрящовій тканині щурів за умов експериментального остеоартриту та при введенні мультипробіотика	41
Бончковський А., Безсмертна О. Особливості рослинної сукцесії у кар'єрі цегельного заводу в с. Новий Тік (Рівненська область)	44
Калмикова О., Чумак К., Вороніна О., Держинський М. Морфофункціональний стан підшлункової залози щурів при введенні мелатоніну під час розвитку ожиріння: хронотерапевтичний підхід	50
Гудзь С., Сківка Л., Присяжнюк О., Цвей Я. Мікробіологічна активність ґрунту за вирощування сої з різними варіантами добрив	57
Лященко Т., Завгородній М., Жидик М., Погребна А., Весельський С., Цапенко П. Вплив ендогенних простанодів на жовчосекреторну функцію у щурів різних вікових груп	63

СОДЕРЖАНИЕ

Кирияченко Е., Осирко А., Удовиченко И., Галенова Т. Гемолитическая активность секретов кожных желез амфибий, распространенных на территории Украины	6
Ставнийчук А., Савчук А., Абдул Хе Хан, Янкевич В. К., Дж. Д. Имиг., Д. Мерк Влияние соединения DM509 на фиброз почек в условиях экспериментальной модели	10
Дмитрик В., Савчук А., Яковлев П. Показатели некоторых компонентов системы активации плазминогена при раке мочевого пузыря.....	15
Олийник Ж., Сенчило Н., Довбинчук Т., Степаненко С., Гузик М. Реактивный астроглиоз у крыс с ЛПС-индуцированной болезнью Паркинсона	19
Чернишенко К., Колесник О., Веселовский Н. Закономерности спонтанного квантового высвобождения глутамата в синапсах нейронов первичной культуры гиппокампа при длительной депрессии синаптической передачи.....	25
Куценко Т. Влияние когнитивной нагрузки на проявление эмоционального эффекта Струпа	30
Кравченко В., Демидова Е. Вариативность сердечного ритма при просмотре эмоционально окрашенных изображений у женщин в различные фазы менструального цикла.....	35
Короткий А., Кот Л., Дворченко Е. Перекисное окисление липидов в хрящевой ткани крыс при экспериментальном остеоартрите и при введении мультипробиотика.....	41
Бончковский А., Безсмертная О. Особенности растительной сукцессии в карьере кирпичного завода в с. Новый Ток (Ровенская область)	44
Калмыкова О., Чумак К., Воронина Е., Держинский Н. Морфофункциональное состояние поджелудочной железы крыс при введении мелатонина при развитии ожирения: хронотерапевтический подход	50
Гудзь С., Скивка Л., Присяжнюк О., Цвей Я. Микробиологическая активность почвы при выращивании сои с различными вариантами удобрения.....	57
Лященко Т., Завгородний Н., Жидык М., Погребна А., Весельский С., Цапенко П. Влияние эндогенных простаноидов на желчсекреторную функцию у крыс разных возрастных групп.....	63

CONTENTS

Kyriachenko Y., Oskyrko O., Udovychenko I., Halenova T. Hemolytic activity of skin secretions of amphibians that inhabit the Ukraine territory	6
Stavniichuk A., Savchuk O., Abdul Hye Khan, Wojciech K. Jankiewicz., John D. Imig., Daniel Merk The effect of compound DM509 on kidney fibrosis in the conditions of the experimental model.....	10
Dmytryk V., Savchuk O., Yakovlev P. Changes in the content of some components of the plasminogen activation system in the plasma of bladder cancer patients	15
Oliynyk Zh., Senchylo N., Dovbynychuk T., Stepanenko., Guzik M. Reactive astrogliosis in rats with LPS-induced Parkinson's diseases.....	19
Chernyshenko K., Kolesnyk O., Veselovskiy N. The analysis of quantal characteristics of spontaneous evoked excitatory post synaptic potential sin long-term depression of glutamatergic neurotransmission between cultured hippocampal neurons	25
Kutsenko T. Influence of cognitive load on expression of the emotional stroop effect.....	30
Kravchenko V., Demidova K. Heart rhythm variation during affective pictures vieming in women in different phases of the menstrual cycle	35
Korotkyi O., Kot L., Dvorshchenko K. Lipid peroxidation in rat cartilage under experimental osteoarthritis and administration of multiprobiotic.....	41
Bonchkovskyi A., Bezsmertna O. Features of vegetation succession in the loess quarry of the brick factory in Novui Tik village (Rivne region, Ukraine).....	44
Kalmukova O., Chumak K., Voronina O., Dzerzhynsky M. Morpho-funktsional state of rats pancreas under melatonin administration during obesity development: chronotherapeutic approach.....	50
Hudz S., Skivka L., Prysiazhniuk O., Tsvei Ya. Micribiological activity of soils by soybean with different variants of fertilization.....	57
Lyaschenko T., Zavhorodnii M., Zhydyk M., Pohrebna A., Veselsky S., Tsapenko P. Endogenous prostanoids influence on bile secretion in different groups of rats	63

HEMOLYTIC ACTIVITY OF SKIN SECRETIONS OF AMPHIBIANS THAT INHABIT THE UKRAINE TERRITORY

*Secretions derived from amphibian skin glands serve as a potential reservoir of various valuable active molecules. Currently, the multiple substances with diverse therapeutic activities among the components of glandular secretions of different species of amphibians have been found. It has been proven that they have antibacterial, antifungal, antiprotozoal, antidiabetic, antineoplastic, analgesic, and sleep-inducing properties. Taking this into consideration, to get the basic knowledge about the properties of the components of skin secretions of some Anura species that inhabit the territory of Ukraine is crucial for further investigation of the most potential ones. The red blood cell hemolysis assay is a prevalent test to study the cytotoxicity of studied samples. The aim of the present study was to analyze the hemolytic activity of skin secretions of *Bombina bombina*, *Bombina variegata*, *Bufo viridis*, *Rana temporaria*, *Pelophylax ridibundus*, and *Pelobates fuscus*, and to obtain the primary data on the possible mechanism of their toxicological action on the blood cells membranes. The skin secretions of six amphibian species mentioned above were incubated with erythrocyte suspension in different concentrations. Eminently active *B. variegata* skin secretions, having the HD₅₀ value at 0.5 µg/ml, were taken for the subsequent researches, where the effects of osmotic protectants, divalent cations, antioxidants, chelating agent, and serine protease inhibitor on the cell lysis ability of *B. variegata* skin secretions was studied. All studied cations inhibited the hemolytic activity of *B. variegata* secretions in a dose-dependent manner. While the serine protease inhibitor, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), markedly decreased the hemolytic activity of studied skin secretions. We can assume that the bioactive peptides in these skin secretions have an enzymatic mechanism of action.*

Keywords: biologically active molecules, amphibians, hemolytic activity, skin gland secretions.

Introduction. The Amphibians skin provides a rich source of bioactive molecules (peptides, proteins, steroids, alkaloids, opioids) that have some effective therapeutic potencies, such as: antibacterial, antifungal, antiprotozoal, antidiabetic, antineoplastic, analgesic and sleep-inducing properties [1]. Isolation and identification of novel metabolites from amphibian skin secretions could be a promising course to create efficient drugs with valuable therapeutic and pharmaceutical potential [2, 3, 4]. Nevertheless, the composition and the mechanism of action of biologically active compounds from amphibian skin secretions are not fully investigated by this time.

Toxicity of an active molecule is a key factor during drug design, and the hemolytic activity represents a useful starting point in this regard. It provides the primary information on the interaction between molecules and biological entities at cellular level. Hemolytic activity of any compounds is an indicator of general cytotoxicity towards normal healthy cells. On the other hand, some proteins that affect the biological membranes might induce the formation of pores or channels in natural and model bilayer lipid membranes [5, 6]. Thus, hemolytic activity that is induced by these protein toxins could be used as a sensitive toxicological tool to investigate the targeting and attachment of proteins to the cell membranes.

Thus, the aim of this work was to study the hemolytic activity of skin secretions of amphibians prevalent on the territory of Ukraine, such as *Bombina bombina*, *Bombina variegata*, *Bufo viridis*, *Rana temporaria*, *Pelophylax ridibundus*, and *Pelobates fuscus*, and to get the basic information on the possible mechanism of their toxicological action on the blood cells membranes.

Materials and Methods. Adult specimens (both sexes) of *B. bombina*, *B. variegata*, *B. viridis*, *R. temporaria*, *P. ridibundus* and *P. fuscus* were collected and authenticated by the Department of Zoology and Ecology of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine. All animal procedures followed the European Directive 2010/63/EU (EC, 2010) on protecting animals used for experimental and other scientific purposes. All manipulations were approved by the Ethical Committee of Educational and Scientific Centre "Institute of Biology and Medicine", Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine.

The crude skin secretions were collected after a short-term mechanical irritation of amphibian skin. The secret was washed with a small amount of distilled water, filtrated, lyophilized (Testar Lyo Quest, Spain) and stored at 4 °C until use. Before each experiment dried material was dissolved in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2, that contained 137 mM NaCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 2.7 mM KCl and 8.1 mM Na₂HPO₄. Further, the suspension was centrifuged at 2500 g for 10 min and the supernatant was collected and used in the study. Bradford method [7] was used to measure the concentration of total protein in the samples.

Rabbit blood was collected from the ear artery in the tubes containing 3.8 % sodium citrate in ratio of 9:1 to prevent coagulation, and centrifuged at 500 g for 10 min at 4 °C. Plasma was removed carefully and the erythrocytes were washed for additional three times in 5 volumes of PBS, pH 7.2. Washed erythrocytes were stored at 4 °C and used within 6 h for the hemolysis assay. For the experiment 2 % (v/v) erythrocyte suspension was prepared by mixing 0.1 ml of packed red blood cells with 4.9 ml of PBS, pH 7.2.

For the preliminary study of hemolytic activity of the skin secretions of six studied amphibian species, erythrocyte suspension was incubated with various concentrations of these secretions (the final concentrations of total protein were 0.5, 5 and 50 µg per 1 ml of erythrocyte suspension) at 37 °C for 30 min and then centrifuged at 2500 g for 6 min. The absorbance of supernatant was measured at 541 nm to establish the amount of hemoglobin released due to erythrocytes lysis. Two controls were prepared (both without frog secretions): negative control contained only PBS, and positive control – 1 % Triton X-100 that was taken as 100 % cell lysis. The most active *B. variegata* skin secretion, which had HD₅₀ value 0.5 µg/ml, was used for further research to establish basic information on its toxicological properties. For this purpose we investigated the effects of different factors on the skin secretion hemolytic activity, including osmotic protectants – 25 mM D-glucose and 25 mM D-lactose; divalent cations, such as Mn²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺ in concentration range from 1 to 100 mM, Fe²⁺ in concentration range from 10 to 50 µM, and Cu²⁺ in concentration range from 1 to 100 µM; antioxidants – 2 mM ascorbic acid and 2 mM cysteine; chelating agent – 2 mM EDTA; serine protease inhibitor – 2 mM PMSF.

Each of these was added to erythrocytes suspension followed by addition of *B. variegata* skin secretion (the final concentration of total protein in all experiments was 0.5 µg per 1 ml of erythrocytes). After incubation at 37 °C for 30 min, the hemolytic activity was determined as described above.

Data analysis was performed using Student's t test to evaluate the statistical significance of experimental groups. The results were recorded as means $M \pm SD$. $p \leq 0.05$

Results and Discussion. Granular glands (also called serous glands or poison glands) of amphibian skin produce a large variety of bioactive substances, including antimicrobial peptides [8], neurotoxic peptides [9], gastric disturbance peptides [10], and alkaloids [11]. In the middle of the grand the granules with active peptides are located. When the animal is injured or alarmed, the content is released through skin secretions [12]. Despite the immense richness of wild amphibians in Ukraine, current knowledge about the presence of bioactive molecules and mechanisms of their action is limited to only few species. The literature data on the biological activity of peptides isolated from amphibians indicates that skin secretions could be an attractive source of new therapeutic candidates. Although, the therapeutic potential of many active molecules from amphibian skin secretions is limited due to their high hemolytic activity against human erythrocytes.

Taking into account that skin secretions, which are used for isolation and purification of bioactive molecules, have to be evaluated for their potential hemolytic activity, in this study we examined the effect of skin secretions from six amphibian species widespread on Ukrainian territory – *B. bombina*, *B. variegata*, *R. temporaria*, *B. viridis*, *P. fuscus* and *P. ridibundus* on the red cell membrane integrity.

The hemolytic activity of the amphibian crude skin secretions was tested at three protein concentrations 0.5, 5 and 50 µg per 1 ml of erythrocytes suspension (Table 1). According to the obtained results, the skin secretions of *R. temporaria* and *B. viridis* had no effect on the erythrocytes integrity even at the highest level of tested concentrations (50 µg/mL), while skin secretions of other studied species with various intensity induced the erythrocyte lysis. As follows, the skin secretion of *P. ridibundus* showed significant hemolytic values (76 %) only at the concentration of 50 µg/mL, while at the lower concentration no negative influence on the red blood cells was observed. *B. bombina*, *P. fuscus* and *B. variegata* skin secretions showed strong hemolytic effect in a concentration-dependent manner. As demonstrated in the Table 1, the most harmful effect on the erythrocytes was observed while studying the *B. variegata* skin secretion, which caused 50 % of cell lysis even at the lowest concentration – 0.5 µg/mL. The skin secretion of this species therefore has been chosen for further experiment to investigate the possible mechanism of its action.

Table 1. The degree of erythrocyte lysis (%) caused by skin secretions of studied amphibian species

Species	Total protein concentration (µg per 1 ml of erythrocyte suspension)		
	0.5	5	50
<i>B. variegata</i>	48 ± 5*	72 ± 7*	76 ± 6*
<i>P. fuscus</i>	17 ± 3*	42 ± 5*	66 ± 6*
<i>B. bombina</i>	5 ± 3	18 ± 3*	63 ± 5*
<i>P. ridibundus</i>	4 ± 2	5 ± 3	76 ± 4*
<i>B. viridis</i>	3 ± 2	4 ± 3	9 ± 4
<i>R. temporaria</i>	3 ± 2	4 ± 2	6 ± 4

* $p \leq 0.05$ the difference is comparable to the effect of PBS (negative control)

To evaluate the HD_{50} value – the concentration of secretion causing 50 % hemolysis of red blood cells – erythrocyte suspension was incubated with various concentrations of *B. variegata* skin secretion (the final concentrations of total protein were 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25 µg per 1 ml). The HD_{50} value of *B. variegata* skin secretion was found to be 0.5 µg/mL (Fig. 1). Thus, the

degree of hemolysis caused by this concentration of *B. variegata* skin secretions was used as the reference value in our following experiments, which were carried out to investigate the effects of different factors, such as osmotic protectants, divalent cations, antioxidants, EDTA, and serine protease inhibitor (PMSF) on skin secretion hemolytic activity.

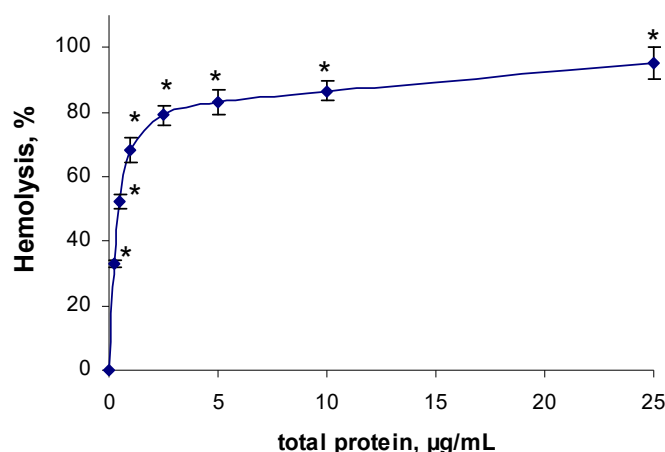


Fig. 1. Dose-response curve of the *B. variegata* skin secretion hemolytic activity

All the results are expressed as the mean $\pm$ SD ($n = 3$);

* $p \leq 0.05$ the difference is comparable to the effect of PBS (negative control)

The influence of cations on the hemolytic activity of *B. variegata* skin secretion was determined using divalent cations Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} at different concentrations. Cations were incubated separately with erythrocyte suspension and skin secretion at the final concentration of total protein of 0.5 $\mu\text{g/mL}$ for 30 minutes, centrifuged and the absorbance of supernatant was measured at 541 nm.

As shown in Fig. 2, all cations decreased the hemolytic activity of *B. variegata* skin secretion in dose-depend

manner, but with different intensity. The lowest effect had Mg^{2+} which at its highest concentration decreased the hemolytic effect only to 29 ± 2 %. Ca^{2+} at low concentrations (1–10 mM) enhanced the cell lysis to 69 ± 7 %, but inhibited it at highest studied concentration (100 mM) to 26 ± 3 %. Mn^{2+} showed full inhibition effect on hemolytic activity at concentration of 50 mM, while Cu^{2+} and Fe^{2+} had the same effect at concentration of 50 μM . Zn^{2+} at concentration ranging from 1 to 100 mM completely inhibited the hemolytic activity of *B. variegata* skin secretion (Fig. 2).

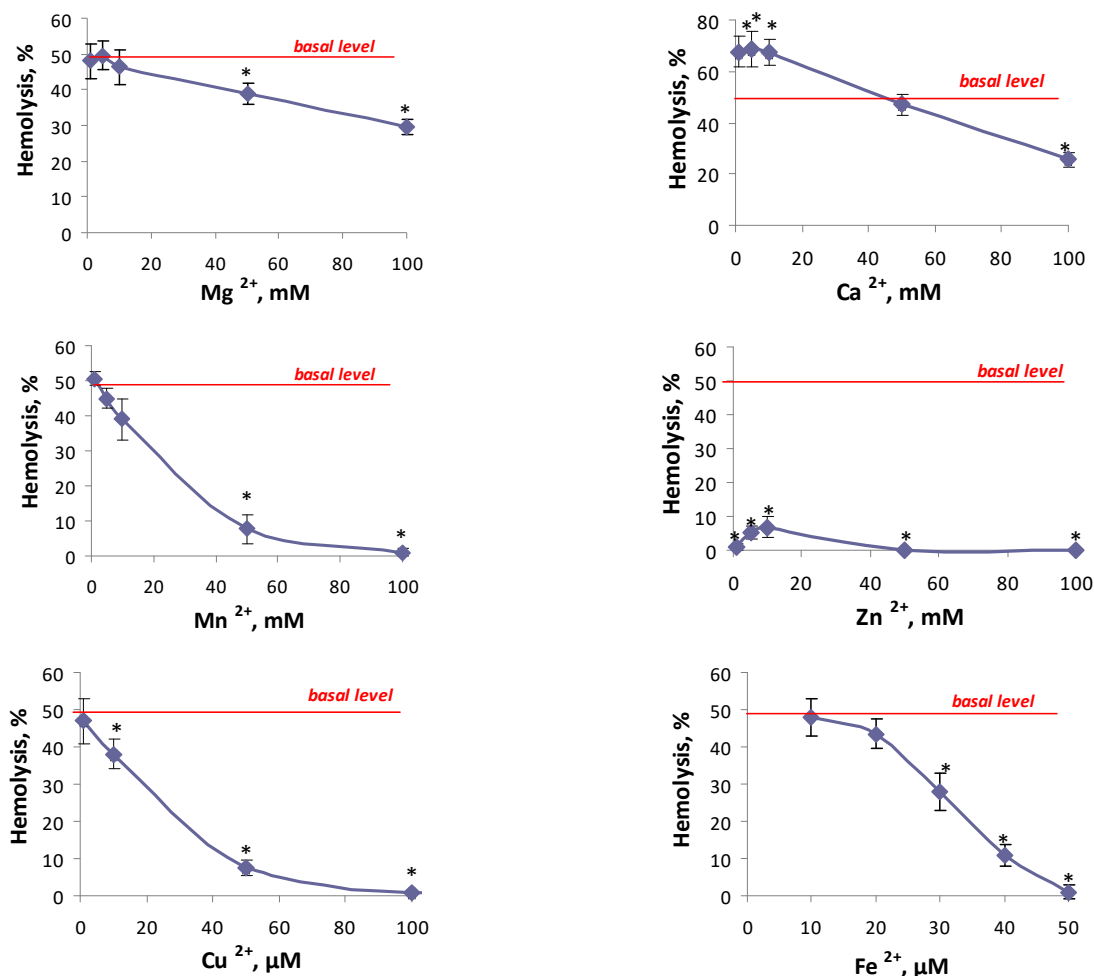


Fig. 2. Effect of six metal ions (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+}) on the hemolytic activity of *B. variegata* skin secretions

All the results are expressed as the mean $\pm$ SD ($n = 3$);

* $p \leq 0.05$ the difference is comparable to the basal level which is equal to the degree of erythrocyte lysis (%) caused by *B. variegata* skin secretion at the concentration of 0.5 $\mu\text{g/mL}$

The effects of osmotic protectors, antioxidants, EDTA and PMSF on hemolytic activity of *B. variegata* skin secretion are summarized in Table 2. The degree of erythrocyte lysis (50 ± 3 %) caused by *B. variegata* skin secretion at the concentration of 0.5 $\mu\text{g/mL}$ was taken as the reference value for this experiment (control). The percentage of inhibition was calculated having regard to the control (without agent) which was defined as "100 %".

Glucose and lactose had no significant effect on hemolytic activity of *B. variegata* skin secretion. The antioxidants ascorbic acid and cysteine, as well as EDTA, also showed no remarkable outcome. In contrast, a serine protease inhibitor, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), substantially inhibited hemolytic activity of frog's skin secretion (Table 2).

Table 2. Effect of different agents on the hemolytic activity of *B. variegata* skin secretion

Agent	Hemolysis (%)	Inhibition (%)
control (without agent)	50 ± 3	no effect
25mM D-glucose	49 ± 3	no effect
25mM D-lactose	58 ± 5	no effect
2mM ascorbic acid	51 ± 4	no effect
2mM cysteine	51 ± 2	no effect
2mM EDTA	50 ± 3	no effect
2mM PMSF	$3 \pm 2^*$	~ 95

* $p \leq 0.05$ the difference is comparable to the basal level which mean the degree of erythrocyte lysis (%) caused by *B. variegata* skin secretion at the concentration of 0.5 $\mu\text{g/mL}$

Based on our results, as the hemolytic activity of *B. variegata* secretions was inhibited by PMSF, we can suggest, that the mode of action of bioactive peptides in this secret was enzymatic. Our results are proved by other literature data. Thuswise, in the late 1980s and early 1990s, certain studies described the peptidases discovered in the cutaneous secretion of *Xenopus laevis* [13, 14]. The recent study showed, that the skin secretions of several amphibians contained a wide variety of proteins (molecular weight from 8 to 150 kDa), which exhibited proteolytic activity with selective effects on different substrates [15]. In addition, Jilek et al. found, that skin secretion of *B. variegata* contains the protein, which catalyzes the conversion of L-Ile to D-Ile at position 2 of a model peptide with the N-terminal sequence of bombinin H. It approves the fact, that amphibian skin secretions have various enzymes in their content [16]. However, further investigations are needed to better characterize the active peptides of this secretion and to clarify their biochemical functions.

Conclusion. In this study, we examined the effects of osmotic protectants, cations, and antioxidants on erythrocyte hemolysis stimulated by the skin secretions from the frog *B. variegata*. We observed that serine protease inhibitor – PMSF – completely inhibited the hemolytic activity of studied secretion. Consequently, an assumption was made, that this skin secretion induced erythrocytes lysis by catalytic way. This hypothesis should be explored in more depth in future studies.

References:

- Gomes A. Bioactive molecules from amphibian skin: Their biological activities with reference to therapeutic potentials for possible drug development / A. Gomes, B. Giri, A. Saha et al. // Indian Journal of Experimental Biology. – 2007. – Vol. 45. – P. 579-593.
- Clarke B. T. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications / B. T. Clarke // Biol Rev CambPhilos Soc. – 1997. – Vol. 72(3). – P. 365-379.
- Lu C. X., Nan K. J., Lei Y. Agents from amphibians with anticancer properties / C. X. Lu, K. J. Nan, Y. Lei // Anticancer Drugs. – 2008. – Vol. 19(10). – P. 931-939. doi: 10.1097/CAD.0b013e3283139100.
- Conlon J. M., Kolodziejek J., Nowotny N. Antimicrobial peptides from the skins of North American frogs / J. M. Conlon, J. Kolodziejek, N. Nowotny // https://doi.org/10.1016/j.bbame.2008.09.
- García-Sáez A. J., Buschhorn S. B., Keller H., Anderluh G., Simons K., Schulle P. Oligomerization and pore formation by equinatoxin II inhibit endocytosis and lead to plasma membrane reorganization / A. J. García-Sáez, S. B. Buschhorn, H. Keller, G. Anderluh, K. Simons, P. Schulle // J. Biol Chem. – 2011. – Vol. 19(43). – P. 37768-37777.
- Savva C. G., Fernandes da Costa S. P., Bokori-Brown M. [et al.]. Molecular architecture and functional analysis of NetB, a pore-forming toxin from *Clostridium perfringens* / C. G. Savva, S. P. Fernandes da Costa, M. Bokori-Brown et al. // J. Biol Chem. – 2013. – Vol. 19(5). – P. 3512-3522.
- Bradford M. M. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // Analytical Biochemistry. – 1976. – Vol. 72. – P. 248-254.
- Conlon J. M. Antimicrobial peptides from ranid frogs: Taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of new therapeutic agents / J. M. Conlon, J. Kolodziejek, N. Nowotny // Biochim. Biophys. Acta. – 2004. – Vol. 1696. – P. 1-14.
- You D. The first gene-encoded amphibian neurotoxin / D. You, J. Hong, M. Rong et al. // J. Biol. Chem. – 2009. – Vol. 284. – P. 22079-22086.
- Bevins C. L. Peptides from frog skin / C. L. Bevins, M. Zasloff // Annu. Rev. Biochem. – 1990. – Vol. 59. – P. 395-414.
- Daly J. W. Alkaloids from amphibian skin: A tabulation of over eight-hundred compounds / J. W. Daly, T. F. Spande, H. M. Garraffo // J. Nat. Prod. – 2005. – Vol. 68. – P. 1556-1575.
- Mills J. W. Morphology of the exocrine glands of the frog skin / J. W. Mills, B. E. Prum // Am. J. Anat. – 1984. – Vol. 171. – P. 91-106.
- Giovannini M. G. Biosynthesis and degradation of peptides derived from *Xenopus laevis* prohormones / M. G. Giovannini, L. Poulter, B. W. Gibson, D. H. Williams // Biochem J. – 1987. – Vol. 243. – P. 113-120.
- Darby N. J. Characterization of a proteolytic enzyme in the skin secretions of *Xenopus laevis* / N. J. Darby, D. G. Smyth // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1988. – Vol. 153. – P. 1193-1200.
- Nikolaieva I. Amphibian skin secretions: a potential source of proteolytic enzymes / I. Nikolaieva, Yu. Dudkina, D. Oliynyk et al. // Biotechnologia Acta. – 2018. – Vol. 11(5). – P. 42-48.
- Jilek A. Biosynthesis of a D-amino acid in peptide linkage by an enzyme from frog skin secretions / A. Jilek, Ch. Mollay, Ch. Tippelt et al. // PNAS. – 2005. – Vol. 102(12). – P. 4235-4239. -https://doi.org/10.1073/pnas.0500789102.

References (Scopus):

- Gomes A., Giri B., Saha A. [et al.]. Bioactive molecules from amphibian skin: Their biological activities with reference to therapeutic potentials for possible drug development. Indian Journal of Experimental Biology. 2007; 45:579-593.
- Clarke B. T. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. Biol Rev CambPhilos Soc. 1997; 72(3):365-379.
- Lu C. X., Nan K. J., Lei Y. Agents from amphibians with anticancer properties. Anticancer Drugs. 2008; 19(10):931-939. doi: 10.1097/CAD.0b013e3283139100.
- Conlon J. M., Kolodziejek J., Nowotny N. Antimicrobial peptides from the skins of North American frogs. https://doi.org/10.1016/j.bbame.2008.09.
- García-Sáez A. J., Buschhorn S. B., Keller H., Anderluh G., Simons K., Schulle P. Oligomerization and pore formation by equinatoxin II inhibit endocytosis and lead to plasma membrane reorganization. J Biol Chem. 2011;19(43):37768-37777.
- Savva C. G., Fernandes da Costa S. P., Bokori-Brown M. [et al.]. Molecular architecture and functional analysis of NetB, a pore-forming toxin from *Clostridium perfringens*. J. Biol Chem. 2013;19(5):3512-3522.
- Bradford M. M. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254; 1976.
- Conlon J. M., Kolodziejek J., Nowotny N. Antimicrobial peptides from ranid frogs: Taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of new therapeutic agents. Biochim. Biophys. Acta. 2004;1696:1-14.
- You D., Hong J., Rong M. [et al.]. The first gene-encoded amphibian neurotoxin. J. Biol. Chem. 2009;284:22079-22086.
- Bevins C. L., Zasloff M. Peptides from frog skin. Annu. Rev. Biochem. 1990;59:395-414.
- Daly J. W., Spande T. F., Garraffo H. M. Alkaloids from amphibian skin: A tabulation of over eight-hundred compounds. J. Nat. Prod. 2005;68:1556-1575.
- Mills J. W., Prum B. E. Morphology of the exocrine glands of the frog skin. Am. J. Anat. 1984;171:91-106.
- Giovannini M. G., Poulter L., Gibson B. W., Williams D. H. Biosynthesis and degradation of peptides derived from *Xenopus laevis* prohormones. Biochem J. 1987; 243:113-120.
- Darby N. J., Smyth D. G. Characterization of a proteolytic enzyme in the skin secretions of *Xenopus laevis*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1988; 153:1193-1200.
- Nikolaieva I., Dudkina Yu., Oliynyk D. [et al.]. Amphibian skin secretions: a potential source of proteolytic enzymes. Biotechnologia Acta. 2018; 11(5):42-48.
- Jilek A., Mollay Ch., Tippelt Ch. [et al.]. Biosynthesis of a D-amino acid in peptide linkage by an enzyme from frog skin secretions. PNAS. 2005; 102(12):4235-4239; https://doi.org/10.1073/pnas.0500789102.

Надійшла до редколегії 16.01.2019
Отримано виправлений варіант 17.02.2019
Підписано до друку 17.02.2019

Received in the editorial 16.01.2019
Received a revised version on 17.02.2019
Signed in the press on 17.02.2019

Є. Кир'яченко, студ.,
О. Осирко, студ.,
І. Удовиченко, асп.,
Т. Галенова, канд. біол. наук,
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ГЕМОЛІТИЧНА АКТИВНІСТЬ СЕКРЕТІВ ШКІРНИХ ЗАЛОЗ АМФІБІЙ, ПОШИРЕНИХ НА ТЕРИТОРІЇ УКРАЇНИ

Виділення шкірних залоз амфібій є потенційним джерелом різноманітних цінних біоактивних молекул. На сьогодні серед компонентів шкірних секретів різних видів роду *Amphibia* знайдено велику кількість речовин, які володіють різноманітними терапевтичними активностями. Показано, що вони володіють антибактеріальними, протиприродними, антипротозойними, антидіабетичними, анти-неопластичними, знеболюючими та снодійними властивостями. Ураховуючи це, отримати основну інформацію про властивості компонентів шкірних секретів деяких видів земноводних, які населяють територію України, є передовим завданням сучасної біохімії для подальшого дослідження найбільш перспективних із них. Аналіз гемолізу еритроцитів є поширеним методом перевірки цитотоксичності досліджуваних речовин. Ліофілізовані шкірні виділення, що складаються із різноманітних біоактивних речовин, були перевірені на токсичність. Метою цього дослідження було проаналізувати гемолітичну активність шкірних виділень *Bombina orientalis*, *Bombina variegata*, *Bufo viridis*, *Rana temporaria*, *Pelophryllax ridibundus* та *Pelobates fuscus* і отримати дані про можливий механізм їхньої токсикологічної дії на мембрани клітин крові. Секрети шести видів амфібій, зазначених вище, інкубували із суспензією еритроци-

тіє у різних концентраціях. Шкірні виділення *B. variegata*, які характеризувалися найвищою активністю ($HD_{50} = 0,5$ мкг/мл), були використані для подальших досліджень, де визначали вплив осмотичних протекторів, двовалентних катіонів, антиоксидантів, хелатуючого агента та інгібітора серинових протеаз на здатність досліджуваного секрету до лізису клітин. Усі досліджені катіони інгібували гемолітичну активність секрету *B. variegata* залежно від дози, тоді як інгібітор серинової протеази, фенілметилсульфонілфторид (PMSF), помітно знизив гемолітичну активність досліджуваного шкірного секрету. Можна припустити, що біоактивні пептиди секрету шкірних залоз *B. variegata* мають ферментативний механізм дії.

Ключові слова: біологічно активні молекули, амфібії, гемолітична активність, секрети шкірних залоз.

Е. Кирьяченко, студ.,
А. Оскірко, студ.,
И. Удовиченко, асп.,
Т. Галенова, канд. биол. наук,
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ГЕМОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СЕКРЕТОВ КОЖНЫХ ЖЕЛЕЗ АМФИБИЙ, РАСПРОСТРАНЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ УКРАИНЫ

Выделения кожных желез амфибий являются потенциальным источником разнообразных ценных биоактивных молекул. На сегодня среди компонентов кожных секретов различных видов рода *Ampibia* найдено большое количество веществ, обладающих различными терапевтическими активностями. Показано, что они обладают антибактериальными, противогрибковыми, антипротозойными, антидиабетическими, антинеопластическими, обезболивающими и снотворными свойствами. Учитывая это, получить основную информацию о свойствах компонентов кожных секретов некоторых видов земноводных, населяющих территорию Украины, является передовым заданием современной биохимии для дальнейшего исследования наиболее перспективных из них. Анализ гемолиза эритроцитов является распространенным методом проверки цитотоксичности исследуемых веществ. Лиофилизированные кожные выделения, состоящие из различных биоактивных веществ, были проверены на их токсичность. Целью этого исследования было проанализировать гемолитическую активность кожных выделений *Bombina bombina*, *Bombina variegata*, *Bufotes viridis*, *Rana temporaria*, *Pelophylax ridibundus* и *Pelobates fuscus* и получить данные о возможном механизме их токсикологического действия на мембраны клеток крови. Секреты шести видов амфибий, указанных выше, инкубировали с суспензией эритроцитов в различных концентрациях. Кожные выделения *B. variegata*, которые характеризовались высокой активностью ($HD_{50} = 0,5$ мкг/мл), были использованы для дальнейших исследований, где определяли влияние осмотических протекторов, двухвалентных катионов, антиоксидантов, хелатирующего агента и ингибитора серинових протеаз на способность исследуемого секрета к лизису клеток. Все исследованные катионы ингибировали гемолитическую активность секрета *B. variegata* в зависимости от дозы, тогда как ингибитор сериновых протеаз, фенілметилсульфонілфторид (PMSF), заметно снизил гемолитическую активность исследуемого кожного секрета. Можно предположить, что биоактивные пептиды секрета кожных желез *B. variegata* имеют ферментативный механизм действия.

Ключевые слова: биологически активные молекулы, амфибии, гемолитическая активность, секреты кожных желез.

УДК 577.122.8

DOI: https://doi.org/10.17721/1728_2748.2020.80.10-15

A. Stavniichuk, Ph.D. stud.,
O. Savchuk, Dr. Sc.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
Abdul Hye Khan, Ph.D.,
Wojciech K. Jankiewicz, stud.,
John D. Imig, Ph.D.,
Department of Pharmacology & Toxicology
The Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI, USA,
Daniel Merk, Ph.D.,
Institute of Pharmaceutical Chemistry,
Goethe-University of Frankfurt, Frankfurt am Main, Germany

THE EFFECT OF COMPOUND DM509 ON KIDNEY FIBROSIS IN THE CONDITIONS OF THE EXPERIMENTAL MODEL

Kidney fibrosis is a key event in the development of chronic kidney disease, leading to end-stage renal failure. Unfortunately, there are now few drugs capable of preventing fibrosis in the kidneys, which is accompanied by the progression of chronic kidney disease in the terminal stage of renal failure. The results show the effectiveness of the use of a new dual-acting agent DM509 in the prevention of renal fibrosis using a model of unilateral obstruction of the ureter in mice. DM509 is both a farnesoid X-receptor agonist and a soluble epoxide hydrolase inhibitor. In this study, there were 8-12 week old C57BL/6J males undergoing surgery, which led to the development of unilateral ureteral obstruction and a control group. Mice received DM509 (10 mg/kg/day) or DM509-free solution together with drinking water for 10 days the day before surgery. Samples of kidney and blood/tissues were collected at the end of the experiment. In the unilateral ureteral obstruction group, kidney dysfunction was detected, which was accompanied by increased urea nitrogen content in the blood compared to the control group (63 ± 7 vs. 34 ± 6 mg/d). The reduction of urea nitrogen in the blood by 36 % in mice with unilateral ureteral obstruction treated with DM509 is shown compared to mice with this pathology without treatment, which in turn proved the effectiveness of DM509 in preventing renal dysfunction. In mice with unilateral ureteral obstruction, which did not receive DM509, the development of kidney fibrosis with a high content of hydroxyproline in the kidneys and also increased collagen content in histological sections of the kidneys were detected. In the DM509 group, the renal and collagen hydroxyproline content were 34-66 % lower, indicating the effectiveness of this agent in the treatment of renal fibrosis. Thus, we have shown that the new DM509 is effective in preventing renal dysfunction and renal fibrosis using a murine model of unilateral ureteral obstruction.

Keywords: soluble epoxide hydrolase inhibitor, farnesoid x receptor agonist, kidney fibrosis.

Introduction. Renal fibrosis is considered as critical pathophysiological event in the development and progression of chronic kidney disease (CKD). Progressive CKD results in end-stage renal disease (ESRD), which is the common clinical end point for all progressive renal diseases [3]. The common CKD etiologies and the consequent ESRD include diabetes, hypertension, glomerulonephritis, acute kidney injury, and chronic pyelonephritis. ESRD is a major burden to the health care

system and a large percentage of the patients are inevitably placed on dialysis and ultimately require transplantation [3, 16]. The ESRD burden on health care is caused largely due to the lack of an effective anti-fibrotic agents that can target CKD.

Indeed, little success has been made over the past decade in developing agents or therapies that can prevent renal fibrosis to slow the progression of CKD to ESRD [23]. Currently, angiotensin-converting enzyme

inhibitors and angiotensin II receptor blockers are used to reduce proteinuria and slow CKD progression [6]. Nevertheless, these renin-angiotensin system drugs have incomplete efficacy in preventing renal fibrosis and CKD progression. Clinical trials targeting other mechanisms have failed, including the nuclear factor E2-related factor 2 inducer bardoxolone [4]. and the endothelin receptor blocker avosentan [17].

We recently developed a bifunctional molecule DM509, that concurrently acts as a farnesoid X receptor (FXR) agonist and soluble epoxide hydrolase inhibitor (sEH) and demonstrated its marked anti-fibrotic action in liver disease models [10]. FXR is a ligand activated transcription factor and is a member of the nuclear receptor superfamily that is highly expressed in liver and kidney [19, 22]. Several recent studies demonstrated anti-fibrotic action for FXR agonists in liver and kidney disease models [7, 16, 21]. A strong renal anti-fibrotic action is also known for sEH in several published studies [2, 12, 13, 14]. Considering the promising anti-fibrotic action in liver disease and potential to treat kidney fibrosis, we determined anti-fibrotic action for the novel bifunctional FXR agonist and sEH, DM509, in a mouse renal fibrosis model.

Materials and methods. This study was approved and conducted according to guidelines of the Institutional Animal Care and Use Committee of the Medical College of Wisconsin. The Biomedical Resource Center at the Medical College of Wisconsin housed animals with free access to water and food and a 12/12h light-dark cycle. Male C57Bl/6J mice (8-10 weeks old) were purchased from Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME. Mice were administered 2.0 % isoflurane to induce anesthesia prior to UUU surgery. UUU surgery was conducted by obstructing the left ureter proximal to the renal pelvis using a 6-0 silk tie [14, 19]. Mice with sham surgery went through the same procedure as the UUU mice except that the ureter was not ligated. An experimental protocol was designed to investigate if our novel molecule DM509 can prevent the development of renal fibrosis. Mice went through UUU surgery 24 hours after the start of DM509 treatment (10 mg/kg/d, p.o., n = 6) or vehicle (n = 6) and blood and kidney tissue were collected 10 days following UUU induction. A schematic of the experimental protocol is shown in Fig. 1. DM509 drinking solution was prepared with a mixture of DMSO (0.05 %) and cyclodextrin (0.5 %). The vehicle was combination of DMSO (0.05 %) and cyclodextrin (0.5 %) given to mice in drinking water. At the end of the experimental protocol, mice were euthanized for blood and kidney tissue collection. The kidney tissue was processed for biochemical, histology, and gene expression analysis. Serum was separated from the blood and used for biochemical analysis of blood urea nitrogen (BUN). Kidney hydroxyproline levels were measured using a commercially available kit (Sigma Aldrich, USA). BUN was measured using a kit from Arbor Assay, USA and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) was measured using kit from R&D Systems, Inc., USA. Renal mRNA expression of several fibrotic [fibronectin, α -smooth muscle actin (α -SMA)] and inflammatory (TNF- α , IL1 β , IL-6) were studied by Real Time-PCR (RT-PCR) analysis. RNeasy Mini Kit (QIAGEN, CA, USA) was used according to the manufacturer's protocol and messenger RNA (mRNA) was prepared from each sample homogenate. The mRNA samples were quantified spectrophotometrically and 1 μ g of total RNA was reverse-transcribed to cDNA using iScript™ Select cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Gene expression was quantified by iScript One-Step RT-PCR Kit with SYBR green using the MyiQ™ Single Color Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories,

Hercules, CA, USA). Dissociation curve analysis was accomplished with iQ5 Optical System Software, Version 2.1 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and each amplified sample analysed for homogeneity. Denaturation was done at 95 °C for 2 min followed by 40 cycles conducted at 95 °C for 10s and at 60 °C for 30s. All samples were run in triplicate and fold change in gene expression compared to controls determined by comparative threshold cycle (C_t) method. Target gene expression levels were determined by normalizing C_t values to two housekeeping genes. Statistical analyses were carried out using six samples from each experimental group and comparing to the control group. Renal tissues were fixed in 10 % formalin, sectioned a 4 μ m thickness, mounted on slides, and stained with Picrosirius Red (PSR) (Alfa Aesar, Tewksbury, MA) for histological examination at a 200x magnification using NIS Elements AR version 3.0 imaging software (Nikon instruments Inc., Melville, NY, USA). PSR stained kidney tissue sections was used to determine collagen-positive renal interstitial fibrosis levels. Histopathological changes were scored as published previously and scores presented as a percentage area-fraction relative to the total area analysed. Kidney interstitial fibrosis (PSR-collagen positive areas) scoring was performed in a blinded fashion by two observers. All data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. GraphPad Prism® Version 4.0 software was utilized to conduct a one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test to establish statistical significance between groups (Graph Pad Software Inc, La Jolla, CA, USA). Two-tailed unpaired Student's t-test was applied to determine statistical significance between groups. A $P < 0.05$ was deemed significant.

Results and discussion. In the present study we determined the ability of our novel dual acting molecule, DM509, to prevent kidney dysfunction in a mouse renal fibrosis model. We assessed renal dysfunction by measuring the BUN level. BUN is considered an important marker for kidney dysfunction. BUN measures urea in the blood and urea is the primary metabolite derived from dietary protein and tissue protein turnover. Urea is freely filtered at the glomerulus but not secreted, and it is reabsorbed by the renal tubules. In addition, as urine flow rates decrease, more urea is reabsorbed [1]. Therefore, BUN levels are inversely correlated with the decline of kidney function. The results of the current study demonstrate that there is kidney dysfunction with a 2-fold higher BUN level in the UUU mice compared to sham (63 ± 7 vs. 34 ± 6 mg/dL). Interestingly, DM509 prevented BUN level elevation and it was 36 % lower in the DM509 treated mice compared to the mice treated with vehicle (40 ± 8 mg/dL). These finding indicate that DM509 prevents kidney dysfunction in the UUU renal fibrosis model. It is important to note that sEH inhibitors and farnesoid receptor agonists are known to have beneficial effects on kidney function. The protective effects of sEH inhibitor have been reported in renal fibrosis [13, 14] hypertensive kidney injury and diabetic kidney injury models [5, 10]. Similar kidney protective effects are also reported for farnesoid receptor agonists in renal fibrosis [15], diabetic nephropathy [21] and renal ischemia reperfusion injury [7]. The present study demonstrates the novel finding that the dual acting molecule that simultaneously act as sEH inhibitor and farnesoid receptor agonist, DM509, prevents renal fibrosis progression in the UUU mouse model. Renal fibrosis is the clinical hallmark for CKD and considered the most important predictor of long-term CKD prognosis [16]. Renal fibrosis progression is the result of an excess accumulation of connective tissue, primarily collagen. In the present study, we have used quantitative method to

determine kidney collagen content by measuring tissue hydroxyproline levels. The spectrophotometric-based hydroxyproline assay is one of the few that allows for actual quantitation of collagen content. The assay is based on the fact that all collagens contain globular domains and share the common structural motif of triple helical segments. This triple helical structure is composed of three α -(polypeptide) chains and each chain consists of a repeating triplet amino acid sequence containing hydroxyproline. Hence, based on the absolute hydroxyproline quantitation, the collagen amount and concentration in tissues can be determined [8]. As such, in the present study, we measured kidney hydroxyproline content in the experimental groups. We found that the

UVO mice developed marked kidney fibrosis with elevated kidney hydroxyproline content (213 ± 11 vs. 49 ± 9 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein) and DM509 treatment prevented the elevation of hydroxyproline level by 34 % (140 ± 9 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein). The effect of DM509 treatment on kidney fibrosis was further assessed using a semi-quantitative histological method. Our data found that DM509 treatment prevents kidney fibrosis by reducing collagen positive kidney fibrotic area in UVO mice. The vehicle treated UVO mice had higher collagen positive area compared to sham (13 ± 2 % vs. 1.1 ± 0.1 %) and DM509 reduced the collagen positive area by 66 % (4.4 ± 0.7 %) (Fig. 1).

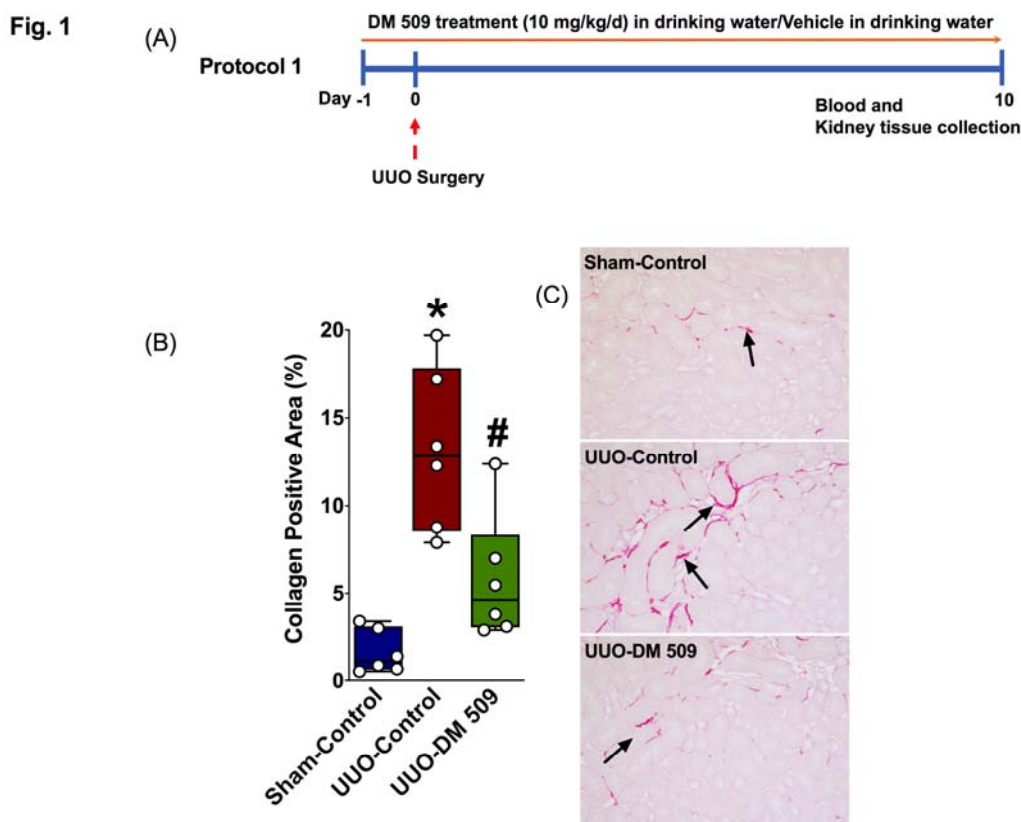


Fig. 1: A schematic describing the experimental protocol (A).

Semi-quantitative measurement of collagen positive fibrotic kidney area in different experimental groups (B).

A representative photomicrograph depicting collagen positive kidney fibrotic area (black arrows) in different experimental groups (C).

*P vs. Sham-Control; #P vs. UVO-Control, N = 5-7

Prevention of renal fibrosis has been demonstrated by sEH inhibitors in several experimental disease models including UVO renal fibrosis models [11, 13, 14]. Anti-fibrotic action for farnesoid x receptor agonists has also been reported in several disease models including UVO renal fibrosis model [15, 21]. In the present study we provide novel evidence that the dual acting molecule that acts as a sEH inhibitor and farnesoid x receptor agonist, DM509, has excellent ability to prevent renal fibrosis in UVO mice model.

In the present study, we assessed kidney fibrotic mediators and inflammation in UVO mice treated with DM509. Fibrotic marker genes express several critical proteins that form the extracellular matrix in the kidney. It

is important to note that kidney extracellular matrix formation is an important event in the kidney fibrotic process [16]. We found that the vehicle treated UVO mice had 2-3-fold higher kidney expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) and fibronectin compared to sham, and DM509 treatment reduced expression of these fibrotic genes in the UVO mice by 40-60 % (Fig. 2). We also found that UVO mice had higher kidney expression of several pro-fibrotic inflammatory markers (TNF- α , IL1 β , IL6) in the vehicle treated UVO mice compared to sham, and DM509 treatment prevented inflammatory gene expression in the UVO mice (Fig. 2).

Fig. 2

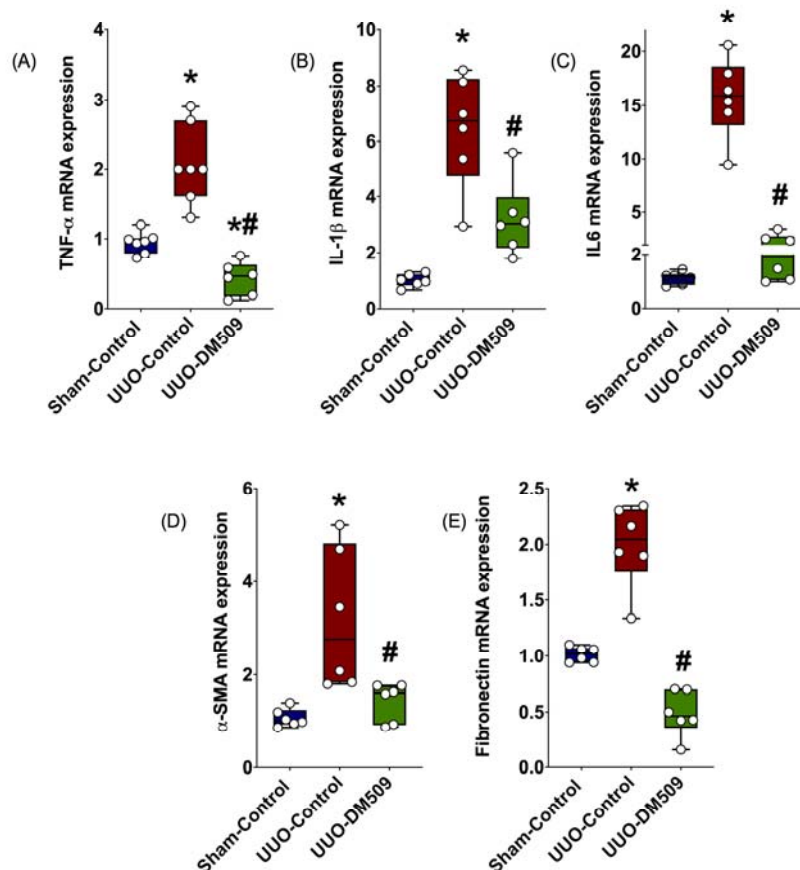


Fig. 2: Kidney mRNA expressions of inflammatory marker genes in different experimental groups (A-C).
Kidney mRNA expressions of α -smooth muscle actin (α -SMA) and fibronectin in different experimental groups.
*P vs. Sham-Control; #P vs. UUO-Control, N = 5-7

These findings are consistent with previous studies demonstrating sEH inhibitors [13, 14] and farnesoid x receptor agonists [7, 15, 21] prevent gene expression of fibrotic markers and pro-fibrotic genes in several kidney disease models.

Conclusion. In the present study, we present exciting data on a novel molecule that simultaneously acts as a sEH inhibitor and farnesoid x receptor agonist, DM509. We provide convincing evidence that this novel dual-acting molecule, DM509, can prevent renal fibrosis development in the UUO renal fibrosis model. Overall, DM509 has potential to be developed as a novel kidney anti-fibrotic agent to treat CKD and prevent progression to ESRD and dialysis.

References:

- Berl T. Disorders of water metabolism / T. Berl, R. W. Schrier. – Renal and electrolyte disorders. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2002. – 63 p.
- Chiang C. W. Genetic deletion of soluble epoxide hydrolase attenuates inflammation and fibrosis in experimental obstructive nephropathy / C. W. Chiang, H. T. Lee, D. C. Tarrag et al. // *Mediators Inflamm.* – 2015. – 693260.
- Collins A. J. The state of chronic kidney disease, ESRD, and morbidity and mortality in the first year of dialysis / A. J. Collins, R. N. Foley, D. T. Gilbertson [et al.] // *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* – 2009. – Vol. Suppl1, № 4. – P. 5-11.
- De Zeeuw D. Bardoxolone methyl in type 2 diabetes and stage 4 chronic kidney disease / D. De Zeeuw, T. Akizawa, P. Audhya [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2013. – Vol. 369, № 26. – P. 2492-2503.
- Elmarakby A. A. Role of haem oxygenase in the renoprotective effects of soluble epoxide hydrolase inhibition in diabetic spontaneously hypertensive rats / A. A. Elmarakby, J. Faulkner, C. Pye [et al.] // *B. Clin. Sci (Lond).* – 2013. – Vol. 125, № 7. – P. 349-59.
- Fried L. F. Combined angiotensin inhibition for the treatment of diabetic nephropathy / L. F. Fried, N. Emanuele, J. H. Zhang [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2013. – Vol. 369, № 20. – P. 1892-1903.
- Gai Z. Farnesoid X receptor activation protects the kidney from ischemia-reperfusion damage / Z. Gai, L. Chu, Z. Xu [et al.] // *Sci Rep.* – 2017. – Vol. 29, № 7(1):9815.
- Hewitson T. D. Qualitative and quantitative analysis of fibrosis in the kidney / T. D. Hewitson, E. R. Smith, C. S. Samuel // *Nephrology (Carlton).* – 2014. – Vol. 19, № 11. – P. 721-6.
- Hye Khan M. A. A dual farnesoid X receptor/soluble epoxide hydrolase modulator treats non-alcoholic steatohepatitis in mice / M. A. Hye Khan, J. Schmidt, A. Stavnichuk [et al.] // *Biochem Pharmacol.* – 2019. – Vol. 166. – P. 212-221.
- Imig J. D. Prospective for cytochrome P450 epoxygenase cardiovascular and renal therapeutics / J. D. Imig // *Pharmacol Ther.* – 2018. – № 192. – P. 1-19.
- Imig J. D. Targeting epoxides for organ damage in hypertension / J. D. Imig // *J. Cardiovasc Pharmacol.* – 2010. – Vol. 56, № 4. – P. 329-35.
- Imig J. D. Epoxides and soluble epoxide hydrolase in cardiovascular physiology / J. D. Imig // *Physiol Rev.* – 2012. – Vol. 92, № 1. – P. 101-30.
- Kim J. Inhibition of soluble epoxide hydrolase prevents renal interstitial fibrosis and inflammation / J. Kim, J. D. Imig, J. Yang [et al.] // *Am. J. Physiol Renal Physiol.* – 2014. – Vol. 307, № 8. – P. 971-80.
- Kim J. Pharmacological inhibition of soluble epoxide hydrolase prevents renal interstitial fibrogenesis in obstructive nephropathy / J. Kim, S. P. Yoon, M. L. Toews [et al.] // *Am. J. Physiol Renal Physiol.* – 2015. – Vol. 308, № 2. – P. 131-9.
- Li S. The farnesoid X receptor agonist EDP-305 reduces interstitial renal fibrosis in a mouse model of unilateral ureteral obstruction / S. Li, S. Ghoshal, M. Sojoodi [et al.] // *FASEB J.* – 2019. – Vol. 33, № 6. – P. 7103-7112.
- Liu Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics / Y. Liu // *Kidney Int.* – 2006. – Vol. 69, № 2. – P. 213-217.
- Mann J. F. Avosentan for overt diabetic nephropathy / J. F. Mann, D. Green, K. Jamerson [et al.] // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2010. – Vol. 21, № 3. – P. 527-535.
- Sharma A. Novel Omega-3 Fatty Acid Epoxygenase Metabolite Reduces Kidney Fibrosis / A. Sharma, M. A. Hye Khan, S. P. Levick [et al.] // *Int J. Mol. Sci.* – 2016. – Vol. 17, № 5:751.

19. Suh J. M. The expression profiles of nuclear receptors in the developing and adult kidney / J. M. Suh, C. T. Yu, K. Tang [et al.] // *Mol. Endocrinol.* – 2006. – Vol. 20, № 12. – P. 3412-3420.
20. Verbeke L. FXR agonist obeticholic acid reduces hepatic inflammation and fibrosis in a rat model of toxic cirrhosis / L. Verbeke, I. Mannaerts, R. Schierwagen [et al.] // *Sci Rep.* – 2016. – № 6:33453.
21. Wang X. X. Diabetic nephropathy is accelerated by farnesoid X receptor deficiency and inhibited by farnesoid X receptor activation in a type 1 diabetes model / X. X. Wang, T. Jiang, Y. Shen [et al.] // *Diabetes.* – 2010. – Vol. 59, № 11. – P. 2916-27.
22. Watanabe M. Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c / M. Watanabe, S. M. Houten, L. Wang [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2004. – Vol. 113, № 10. – P. 1408-1418.
23. Zhong J. A perspective on chronic kidney disease progression / J. Zhong, H. C. Yang, A. B. Fogo // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* – 2017. – Vol. 312, № 3. – P. 375-384.

References (Scopus):

1. Berl T, Schrier R. W. Disorders of water metabolism. 6th ed. Schrier RW, editor. Renal and electrolyte disorders. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2002. P. 1-63.
2. Chiang C. W, Lee H. T, Tarnag D. C, Kuo K. L, Cheng L. C, Lee T. S. Genetic deletion of soluble epoxide hydrolase attenuates inflammation and fibrosis in experimental obstructive nephropathy. *Mediators Inflamm.* 2015;693260.
3. Collins A. J, Foley R. N, Gilbertson D. T. et al. The state of chronic kidney disease, ESRD, and morbidity and mortality in the first year of dialysis. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2009;4(Suppl1):S5-S11.
4. De Zeeuw D, Akizawa T, Audhya P. et al. Bardoxolone methyl in type 2 diabetes and stage 4 chronic kidney disease. *N. Engl. J. Med.* 2013;369(26):2492-2503.
5. Elmarakby A. A, Faulkner J, Pye C, Rouch K, Alhashim A, Madipati K. R., Baban B. Role of haem oxygenase in the renoprotective effects of soluble epoxide hydrolase inhibition in diabetic spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci (Lond).* 2013;125(7):349-59.
6. Fried L. F, Emanuele N, Zhang J. H. et al. Combined angiotensin inhibition for the treatment of diabetic nephropathy. *N. Engl. J. Med.* 2013;369(20):1892-1903.
7. Gai Z., Chu L., Xu Z., Song X., Sun D., Kullak-Ublick G. A. Farnesoid X receptor activation protects the kidney from ischemia-reperfusion damage. *Sci Rep.* 2017;29;7(1):9815.
8. Hewitson T. D., Smith E. R., Samuel C. S. Qualitative and quantitative analysis of fibrosis in the kidney. *Nephrology (Carlton).* 2014;19(11):721-6.
9. Hye Khan M. A, Schmidt J., Stavniichuk A., Imig J. D., Merk D. A dual farnesoid X receptor/soluble epoxide hydrolase modulator treats non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Biochem Pharmacol.* 2019;166:212-221.

10. Imig J. D. Prospective for cytochrome P450 epoxide hydrolase cardiovascular and renal therapeutics. *Pharmacol Ther.* 2018;192:1-19.
11. Imig J. D. Targeting epoxides for organ damage in hypertension. *J. Cardiovasc Pharmacol.* 2010;56(4):329-35.
12. Imig J. D. Epoxides and soluble epoxide hydrolase in cardiovascular physiology. *Physiol Rev.* 2012;92(1):101-30.
13. Kim J., Imig J. D., Yang J. et al. Inhibition of soluble epoxide hydrolase prevents renal interstitial fibrosis and inflammation. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2014;307(8):F971-80.
14. Kim J., Yoon S. P., Toews M. L. et al. Pharmacological inhibition of soluble epoxide hydrolase prevents renal interstitial fibrogenesis in obstructive nephropathy. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2015;308(2):F131-9.
15. Li S., Ghoshal S., Sojoodi M., Arora G., Masia R., Erstad D. J., Ferriera D. S., Li Y., Wang G., Lanuti M., Caravan P., Or Y. S., Jiang L. J., Tanabe K. K., Fuchs B. C. The farnesoid X receptor agonist EDP-305 reduces interstitial renal fibrosis in a mouse model of unilateral ureteral obstruction. *FASEB J.* 2019;33(6):7103-7112.
16. Liu Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int.* 2006;69(2):213-217.
17. Mann J. F., Green D., Jamerson K. et al. Avasentan for overt diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2010;21(3):527-535.
18. Sharma A., Hye Khan M. A, Levick S. P., Lee K. S, Hammock B. D., Imig J. D. Novel Omega-3 Fatty Acid Epoxide Hydrolase Reduces Kidney Fibrosis. *Int J. Mol. Sci.* 2016;17(5): pii: E751.
19. Suh J. M., Yu C. T., Tang K. et al. (2006). The expression profiles of nuclear receptors in the developing and adult kidney. *Mol Endocrinol.* 2006;20(12):3412-3420.
20. Verbeke L., Mannaerts I., Schierwagen R. et al. FXR agonist obeticholic acid reduces hepatic inflammation and fibrosis in a rat model of toxic cirrhosis. *Sci Rep.* 2016;6:33453.
21. Wang X. X., Jiang T., Shen Y., Caldas Y., Miyazaki-Anzai S., Santamaria H. et al. Diabetic nephropathy is accelerated by farnesoid X receptor deficiency and inhibited by farnesoid X receptor activation in a type 1 diabetes model. *Diabetes.* 2010;59(11):2916-27.
22. Watanabe M., Houten S. M., Wang L. et al. Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J Clin Invest.* 2004;113(10):1408-1418.
23. Zhong J., Yang H. C., Fogo A. B. A perspective on chronic kidney disease progression. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2017;312(3):F375-F384.

Надійшла до редколегії 16.01.2019

Отримано виправлений варіант 17.02.2019

Підписано до друку 17.02.2019

Received in the editorial 16.01.2019

Received a revised version on 17.02.2019

Signed in the press on 17.02.2019

А. Ставнійчук, асп.,
О. Савчук, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
Абдул Хе Хан, д-р біол. наук,
В. К. Янкевич, асп.,
Дж. Д. Іміг, д-р біол. наук
кафедра фармакології і токсикології,
Медичний коледж штату Вісконсін, Мілуокі, Вісконсін, США,
Д. Мерк, д-р біол. наук
Інститут фармацевтичної хімії,
Франкфуртський університет ім. Гете, Франкфурт-на-Майні, Німеччина

ВПЛИВ СПОЛУКИ DM509 НА ФІБРОЗ НИРОК В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ МОДЕЛІ

Фіброз нирок є ключовою подією в розвитку хронічного захворювання нирок, що призводить до термінальної стадії ниркової недостатності. На жаль, зараз мало лікарських засобів, здатних запобігати фіброзу в нирках, що супроводжується прогресією хронічного захворювання нирок у термінальній стадії ниркової недостатності. Отримані результати з використанням моделі односторонньої обструкції сечоводу в мишей показують ефективність застосування нового агента подвійної дії DM509 для запобігання нирковому фіброзу. DM509 є одночасно агоністом фарнезоїдного X-рецептора та розчинного інгібітора епоксидгідролази. У цьому дослідженні було взято 8-12-тижневих самців C57BL/6J, яких піддали хірургічному втручанню, що призводило до розвитку односторонньої обструкції сечоводу, та контрольну групу. Миші протягом 10 днів отримували DM509 (10 мг/кг/доба) або розчин, що не містить DM509, разом із питною водою за день до операції. Зразки тканин нирок і крові були зібрані в кінці експерименту. У групі з односторонньою обструкцією сечоводу була виявлена дисфункція нирок, що супроводжувалася підвищенням вмісту азоту сечовини в крові порівняно з контрольною групою (63 ± 7 vs. 34 ± 6 мг/дл). Показано зниження вмісту азоту сечовини в крові на 36 % у мишей з односторонньою обструкцією сечоводу, які отримували DM509, порівняно з мишами з даною патологією без лікування, що, у свою чергу, доводило ефективність DM509 для запобігання нирковій дисфункції. У мишей з односторонньою обструкцією сечоводу, що не отримали DM509, було виявлено розвиток фіброзу нирок з підвищенням вмісту гідроксипроліну в нирках і підвищений вміст колагену в гістологічних зрізах нирок. У групі, що отримала DM509, вміст гідроксипроліну в нирках і колагену були на 34-66 % нижче, що вказує на ефективність цього агента в лікуванні ниркового фіброзу. Таким чином, ми показали, що новий DM509 ефективний для запобігання дисфункції нирок і нирковому фіброзу з використанням мишиної моделі з односторонньою обструкцією сечоводу.

Ключові слова: розчинний інгібітор епоксидгідролази, агоніст фарнезоїдних X-рецепторів, фіброз нирок.

А. Ставнийчук, асп.,
А. Савчук, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
Абдул Хє Хан, д-р біол. наук,
В. К. Янкевич, асп.,
Дж. Д. Имиг, д-р біол. наук
кафедра фармакології і токсикології,
Медицинський коледж штата Висконсин, Милуоки, Висконсин, США,
Д. Мерк, д-р біол. наук
Институт фармацевтической химии,
Франкфуртский университет им. Гёте, Франкфурт-на-Майне, Германия

ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЯ DM509 НА ФИБРОЗ ПОЧЕК В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ

Фиброз почек является ключевым событием в развитии хронического заболевания почек, что приводит к терминальной стадии почечной недостаточности. К сожалению, сейчас мало лекарственных средств, способных предотвращать фиброз в почках, сопровождающийся прогрессией хронического заболевания почек в терминальной стадии почечной недостаточности. Полученные результаты с использованием модели односторонней обструкции мочеточника у мышей показывают эффективность нового агента двойного действия DM509 для предотвращения почечного фиброза. DM509 является одновременно агонистом фарнезоидного X-рецептора и растворимого ингибитора эпиксидгидролазы. В этом исследовании были взяты 8-12-недельные самцы C57BL/6J, которые подверглись хирургическому вмешательству, что приводило к развитию односторонней обструкции мочеточника, и контрольная группа. Мыши в течение 10 дней получали DM509 (10 мг/кг/сутки) или раствор, не содержащий DM509, вместе с питьевой водой за день до операции. Образцы тканей почек и крови были собраны в конце эксперимента. В группе с односторонней обструкцией мочеточника была обнаружена дисфункция почек, сопровождающаяся повышенным содержанием азота мочевины в крови по сравнению с контрольной группой (63 ± 7 vs. 34 ± 6 мг/с). Показано снижение содержания азота мочевины в крови на 36 % у мышей с односторонней обструкцией мочеточника, которые получали DM509, по сравнению с мышами с данной патологией без лечения, что, в свою очередь, доказывало эффективность DM509 в предотвращении почечной дисфункции. У мышей с односторонней обструкцией мочеточника, не получивших DM509, было обнаружено развитие фиброза почек с повышенным содержанием гидроксипролина в почках и повышенное содержание коллагена в гистологических срезах почек. В группе, получившей DM509, содержание гидроксипролина в почках и коллагена было на 34-66 % ниже, что указывает на эффективность этого агента в лечении почечного фиброза. Таким образом, мы показали, что новый DM509 эффективен для предотвращения дисфункции почек и почечного фиброза с использованием мышинной модели с односторонней обструкцией мочеточника.

Ключевые слова: растворимый ингибитор эпиксидгидролазы, агонист фарнезоидных x-рецепторов, фиброз почек.

УДК: 616.62-006.6-073

DOI: https://doi.org/10.17721/1728_2748.2020.80.15-19

В. Дмитрик, асп.,
О. Савчук, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
П. Яковлев, канд. мед. наук
Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Київ, Україна

ПОКАЗНИКИ ДЕЯКИХ КОМПОНЕНТІВ СИСТЕМИ АКТИВАЦІЇ ПЛАЗМІНОГЕНУ ПРИ РАКУ СЕЧОВОГО МІХУРА

Рак сечового міхура (PCM) продовжує бути захворюванням з високим показником смертності. Рак сечового міхура є шостим для чоловіків та сімнадцятим для жінок за частотою злоякісним утворенням у всьому світі. Інвазія та метастазування злоякісних пухлин зумовлені послідовністю процесів, серед яких – втрата клітинно-клітинної та/або клітинно-матричної адгезії, протеоліз та індукція ангіогенезу. Різні системи протеаз задіяні в цих процесах, особливо в процесі інвазії та розвитку метастазів. Однією з таких систем протеаз є система активації плазміногену (АП) або фібринолізу. Зміни в балансі системи активації плазміногену досліджені при багатьох типах злоякісних новоутворень і можуть не тільки свідчити про функціонування цієї системи, але й мати прогностичне значення. При злоякісних новоутвореннях компоненти цієї системи беруть участь у рості, інвазії та метастазуванні пухлин, впливаючи на процеси клітинної міграції та ангіогенезу. Основним і вже добре дослідженим компонентом системи активації плазміногену є серинова протеїназа – активатор плазміногену урокіназного типу (urokinase-type PA), скорочено uPA. На відміну від uPA, активатор плазміногену тканинного типу (tPA) характеризується високою афінністю до фібрину і бере участь у тромболізі. У тканинах пухлин синтезуються обидва типи активаторів плазміногену: tPA та uPA. Найбільше значення серед інгібіторів фібринолізу має інгібітор активатора плазміногену першого типу (PAI-1), залучений до патогенезу багатьох серцево-судинних захворювань, а також до злоякісних онкологічних новоутворень. Метою даного дослідження було виявити зміни вмісту активатора плазміногену тканинного типу tPA та PAI-1 у плазмі крові хворих на PCM при різних стадіях захворювання. У дослідженні брали участь 40 чоловіків, у яких був верифікований діагноз – PCM. Вміст tPA та PAI-1 у передопераційній плазмі крові визначали імуноферментним методом у модифікації ELISA. У ході дослідження було встановлено зміни вмісту tPA та PAI-1 у плазмі крові на різних стадіях, що може характеризувати ріст та інвазію пухлин і поповнити існуючі відомості щодо захворювання.

Ключові слова: рак сечового міхура, tPA, PAI-1, система активації плазміногену.

Вступ. Рак сечового міхура (PCM) є шостим для чоловіків та сімнадцятим для жінок за частотою злоякісним утворенням у всьому світі [21]. Серед злоякісних новоутворень сечостатевої системи він є найчастішим після раку простати. Патологічна гістологія свідчить про те, що більше 90 % PCM є карциномою перехідного епітелію. Більш того, частота виникнення PCM у 3-4 рази вища в чоловіків, аніж у жінок [11, 21].

Інвазія та метастазування злоякісних пухлин зумовлені послідовністю процесів, серед яких – втрата клітинно-клітинної та/або клітинно-матричної адгезії, про-

теоліз та індукція ангіогенезу [3, 8]. Різні системи протеаз задіяні в цих процесах, особливо в процесі інвазії та розвитку метастазів. Однією з таких систем протеаз є система активації плазміногену (АП) або фібринолізу. АП контролює не тільки вміст фібрину в судинах, але бере участь у багатьох фізіологічних і патологічних процесах. При злоякісних новоутвореннях компоненти цієї системи беруть участь у рості, інвазії та метастазуванні пухлин, впливаючи на процеси клітинної міграції та ангіогенезу. Зміни в балансі системи активації плазміногену досліджені при багатьох типах злоякісних но-

воутворень і можуть не тільки свідчити про функціонування цієї системи, але й мати прогностичне значення. Експресія компонентів системи активації плазміногену модулюється цитокінами та факторами росту, баланс останніх порушений при онкологічних новоутвореннях. Уперше залежність між системою фібринолізу та злоскісними новоутвореннями була припущена дослідником Трюссо [20]. Роль системи активації плазміногену привернула увагу дослідників не тільки з погляду патогенезу ускладнених кровотеч при злоскісних новоутвореннях, але й з погляду прогресування пухлин [13].

Основним та вже добре дослідженим компонентом системи активації плазміногену є серинова протеїназа – активатор плазміногену урокіназного типу (urokinase-type PA), скорочено uPA. На відміну від tPA, активатор плазміногену тканинного типу (tPA) характеризується високою афінністю до фібрину і бере участь у тромболізі. У тканинах пухлин синтезуються обидва типи активаторів плазміногену: tPA та uPA. Найбільше значення серед інгібіторів фібринолізу має PAI-1, залучений до патогенезу багатьох серцево-судинних захворювань, а також до злоскісних онкологічних новоутворень. Активність системи активації плазміногену може бути нейтралізована двома основними специфічними інгібіторами: PAI-1 та PAI-2 [3, 17]. Дослідження при різних онкологічних захворюваннях вказують на підвищений вміст компонентів системи активації плазміногену [6, 9, 12, 16, 18].

Метою даного дослідження було виявити зміни вмісту tPA та PAI-1 у плазмі крові хворих на РСМ на різних стадіях захворювання.

Матеріали і методи. У дослідженні брали участь 40 пацієнтів (чоловіки) віком 52–76 років, які очікували на хірургічне втручання для лікування РСМ. Групу контролю становили 10 здорових донорів того ж віку. Пацієнти та донори були проінформовані про участь у дослідженні та підписали відповідний договір. Усі пацієнти піддавалися стандартній передопераційній перевірці, яка включала загальний аналіз крові, сечі, біохімічний аналіз крові, імунограму, комп'ютерну томографію з контрастуванням для дослідження розмірів пухлини та метастазування. Для характеризування стадії використовували TNM класифікацію AJCC, 8 видання. Дослі-

дження узгоджене з етичним комітетом ННЦ Інституту біології та медицини (Київ, Україна). Передопераційні зразки крові були зібрані вранці перед операцією. Кров у пацієнтів відбирали натщесерце. Цільну кров з антикоагулянтом центрифугували при 3000 об/хв при 4 °С, заморожували та зберігали при -20 °С.

Вміст tPA та PAI-1 визначали імуноферментним методом у модифікації ELISA [10]. У плашки для імуноферментного аналізу наносили попередньо розведену в 10 разів плазму та залишали на ніч при температурі 4 °С. Після промивки на плашки наносили 5 %-ве знежирене сухе молоко та інкубували протягом 1 год при температурі 37 °С, після чого знову промивали. Після інкубації протягом 1 год при 37 °С з відповідними первинними антитілами проти відповідних антигенів (tPA та PAI-1) плашки промивали та інкубували протягом 1 год при 37 °С з відповідними вторинними антитілами, конюгованими з пероксидазою хрому. Після чергової промивки були додані субстрати до пероксидази хрому. Реакцію зупиняли додаванням 2,5 Н H₂SO₄. Показники оптичної щільності отримували за допомогою відповідного рідера для мікроплашок (μQuant™, BioTek Instruments, Inc) при довжині хвилі 492 нм. Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою методів варіаційної статистики з використанням комп'ютерної програми Excel.

Результати та обговорення. Деградація білків позаклітинного матриксу та базальної мембрани є необхідними умовами для інвазії та метастазування злоскісних новоутворень. Однією із систем, що бере участь у пошкодженні позаклітинного матриксу, є система активації плазміногену. PA каталізується сериновими протеїназами. Основним інгібітором системи активації плазміногену є PAI-1. Дослідження PAI-1 переважно сфокусовані на участі в тромбоутворенні, але останнім часом дослідники привертають більше уваги до участі PAI-1 при різних патологічних станах, таких як серцево-судинні захворювання, ожиріння, метаболічний синдром, і при різних типах злоскісних новоутворень [6, 12, 15].

Нами було досліджено статистично достовірні зміни вмісту PAI-1 у плазмі крові пацієнтів, хворих на РСМ, залежно від стадії захворювання порівняно з показниками в крові здорових донорів (рис. 1).

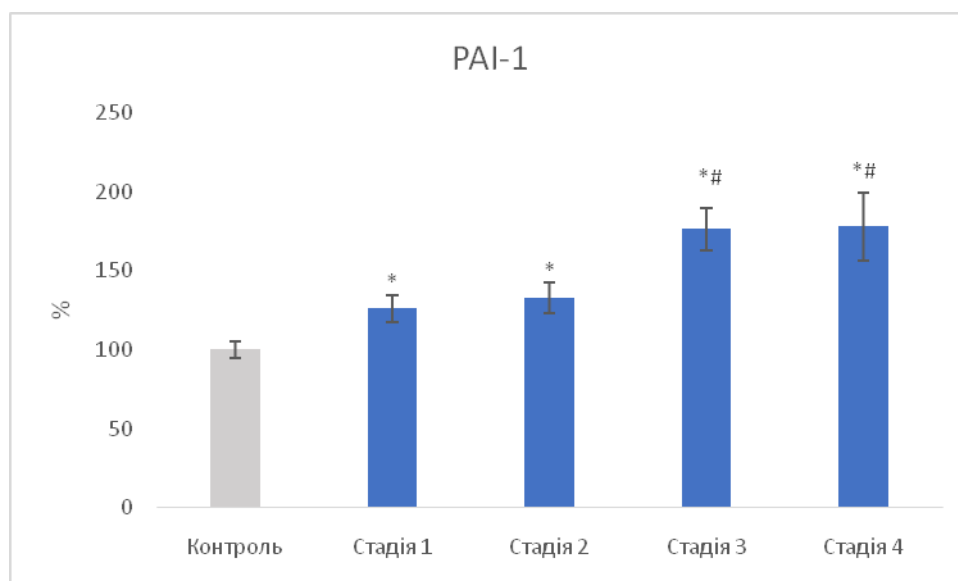


Рис. 1. Вміст PAI-1(%) в передопераційній плазмі крові пацієнтів, хворих на РСМ, залежно від стадії захворювання. М ± m, n = 10; * – p < 0,05 достовірно відносно значень контролю. # – p < 0,05 відносно стадії 1 РСМ

Незважаючи на протиракові властивості при декількох типах онкологічних захворювань, наприклад при раку підшлункової залози, порушення вмісту PAI-1 корелює з поганим подальшим прогнозом при таких злоякісних новоутвореннях, як рак молочної залози, рак шлунку та рак яєчників [6, 9, 12, 16, 18]. Більш того, нові дослідження вказують на ключове значення PAI-1 у процесах клітинної міграції, інвазії та в процесі ангиогенезу, що може частково вказувати на участь PAI-1 у прогресуванні злоякісних новоутворень при деяких типах онкологічних новоутворень [7, 12, 14]. У регуляції PAI-1 беруть участь різноманітні сигнальні молекули, переважно фактори росту, цитокіни, гормони та деякі фактори, які впливають на середовище, наприклад гіпоксія [7, 12].

Ми дослідили зміни вмісту (%) PAI-1 у передопераційній плазмі крові пацієнтів, хворих на РСМ, на різних

стадіях. Для пацієнтів зі стадією 1 вміст PAI-1 був вищим у 1,26 раза порівняно з показниками крові здорових донорів. У пацієнтів з 2, 3 та 4 стадією вміст PAI-1 був вищим у 1,33, 1,76 та 1,78 раза, відповідно, порівняно з показниками у плазмі крові здорових донорів.

На відміну від багатьох інших організмів (бактерій, грибів та деяких ссавців), для людини характерні всього 2 активатори РА: активатор плазміногену тканинного типу – tPA [1, 4]. tPA – це глікопротеїн (70-kDa), який за фізіологічних умов синтезується ендотеліальними клітинами для підтримання прохідності судин на відповідь до формування фібринового згустку в судинах. Вміст tPA в плазмі крові є невисоким, але може збільшуватися при різних патологічних станах [13]. Іншим активатором РА є активатор плазміногену урокіназного типу – uPA (рис. 2).

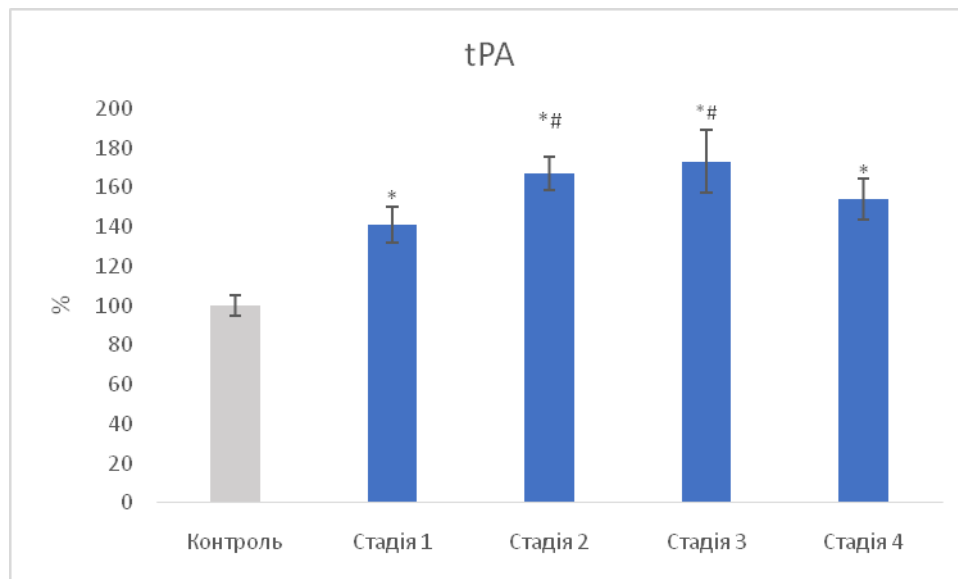


Рис. 2. Вміст tPA (%) у передопераційній плазмі крові пацієнтів, хворих на РСМ, залежно від стадії захворювання. $M \pm m$, $n = 10$; * – $p < 0,05$ достовірно відносно значень контролю. # – $p < 0,05$ відносно стадії 1 РСМ

Ми дослідили вміст (%) tPA в передопераційній плазмі крові пацієнтів, хворих на РСМ, при різних стадіях захворювання. Дані представлені на рис. 2: вміст tPA у плазмі крові пацієнтів зі стадією 1 РСМ мав значення в 1,41 раза вище, аніж значення в плазмі крові здорових донорів, у пацієнтів зі стадією 2 вміст tPA був вищим у 1,67, стадією 3 і 4 – у 1,73 та 1,54, відповідно, порівняно з показниками в плазмі крові здорових донорів.

Отже, нами було досліджено вміст tPA та PAI-1 у плазмі крові хворих на РСМ різних стадій. Дослідження вказує на зміну вмісту компонентів системи активації плазміногену при РСМ залежно від стадії. Отримані дані при РСМ узгоджуються з даними інших авторів при інших онкологічних дослідженнях і можуть доповнити існуючі дані в характеристиці захворювання.

Список використаних джерел:

1. Bachmann F. Tissue plasminogen activator: chemical and physiological aspects / F. Bachmann, I. Kruithof. // *Semin Thromb Hemost.* – 1984. – №10. – С. 6–17.
2. Bajou K. Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization / K. Bajou, A. Noel, R. D. Gerard et al. // *NatMed.* – 1998. – Vol. 4. – P. 923–928.
3. Becker M. Urine-based markers of angiogenesis in bladder cancer / Becker M, Tilki D, Szarvas T та ін. // *Urologe A.* – 2009. – №48. – С. 609–614.
4. Blasi F. Human plasminogen activators. Genes and proteins structure / Blasi F, Sebastio G, Riccio A. // *Horiz Biochem Biophys.* – 1986. – №8. – С. 377–414.
5. Collen D. Tissue-type plasminogen activator: a historical perspective and personal account. / Collen D, Lijnen HR. // *J Thromb Haemost.* – 2004. – №2. – С. 541–546.

6. Deltas C. Historical analysis of PAI-1 from its discovery to its potential role in cell motility and disease / C. Deltas, D. Loskutoff. // 2005. – №93. – С. 631–640.
7. Geis C. HIF-2alpha-dependent PAI-1 induction contributes to angiogenesis in hepatocellular carcinoma / [C. Geis, R. Döring, R. Popp та ін.]. // *Exp. Cell. Res.* – 2015. – №331. – С. 46–57.
8. Gontero P. Metastasis markers in bladder cancer: a review of the literature and clinical considerations. / Gontero P, Banisadr S, Freja B, Brausi M. // *Eur Urol.* – 2004. – №46. – С. 296–311.
9. Herszényi L. The role of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in gastric cancer / [L. Herszényi, M. Plebani, R. Cardin та ін.]. // *Acta Physiol. Hung.* – 1995. – №83. – С. 213–221.
10. Ischuk T. Plasma levels of MMPs and TIMP-1 in urinary bladder cancer patients / T.V. Ischuk, D. Glavachek, O.M. Savchuk et al. // *Biomedical Research and Therapy*, 2018. – №5. – С. 1931–1940.
11. Jemal A. Global cancer statistics / [A. Jemal, F. Bray, M. Center та ін.]. // *CA: a cancer journal for clinicians.* – 2011. – №61. – С. 69–90.
12. Li S. Plasminogen activator inhibitor-1 in cancer research / [S. Li, X. Wei, J. He та ін.]. // *Biomed Pharmacother.* – 2018. – №105. – С. 83–94.
13. McMahon B. The plasminogen activator system and cancer / B. McMahon, H. Kwaan. // *Pathophysiol Haemost Thromb.* – 2008. – №36. – С. 184–194.
14. Mio H. PAI-1, a target gene of miR-143, regulates invasion and metastasis by upregulating MMP-13 expression of human osteosarcoma / [H. Mio, O. Mitsuhiro, K. Yusuke та ін.]. // *Cancer Med.* – 2016. – №5. – С. 892–902.
15. Palmier D. Plasminogen activator inhibitor-1 and -3 increase cell adhesion and motility of MDA-MB-435 B breast cancer cells / D. Palmieri, J. W. Lee, R. L. Juliano, F. C. Church // *J Biol Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P. 40950–40957.
16. Palmirotta R. Prognostic value of pre-surgical plasma PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) levels in breast cancer / [R. Palmirotta, P. Ferroni, A. Savonarola та ін.]. // *Thromb. Res.* – 2009. – №124. – С. 403.
17. Rijken D. Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors: biochemical aspects / D. Rijken. // *Baillieres Clin Haematol.* – 1995. – №8. – С. 291–312.

18. Satsuki M. Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 is a potential therapeutic strategy in ovarian cancer / [M. Satsuki, K. Kazuyuki, T. Masafumi та ін.]. // *Cancer Biol. Ther.* – 2015. – №16. – С. 253–260.
19. Stahl A. Melanoma cell migration on vitronectin: regulation by components of the plasminogen activation system / A. Stahl, B. M. Mueller // *Int J Cancer.* – 1997. – Vol. 71. – P. 116–122.
20. Trousseau A. Phlegmasia alba dolens / Trousseau. // *Clinique médicale.* – 1865. – №4. – С. 645–712.
21. Zhu C. A review on the accuracy of bladder cancer detection methods / C. Zhu, H. Ting, K. Ng, T. Ong. // *J Cancer.* – 2019. – №10. – С. 4038–4044.

Reference (Scopus):

1. Bachmann F, Kruithof IE: Tissue plasminogen activator: chemical and physiological aspects. *Semin Thromb Hemost* 1984; 10: 6–17.
2. Bajou K. Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization / K. Bajou, A. Noel, R. D. Gerard et al. // *Nat Med.* – 1998. – Vol. 4. – P. 923–928.
3. Becker M, Tilki D, Szarvas T, Rubben H, Ergun S. Urine-based markers of angiogenesis in bladder cancer. *Urologe A.* 2009; 48:609–614.
4. Blasi F, Riccio A, Sebastio G: Human plasminogen activators. Genes and proteins structure. *Horiz Biochem Biophys* 1986; 8: 377–414.
5. Collen D, Lijnen HR: Tissue-type plasminogen activator: a historical perspective and personal account. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 541–546.
6. Dellas C, D.J. Loskutoff, Historical analysis of PAI-1 from its discovery to its potential role in cell motility and disease, *Thromb. Haemost.* 93 (2005) 631–640.
7. Geis T., C. Döring, R. Popp, N. Grossmann, I. Fleming, M.L. Hansmann, N. Dehne, et al. HIF-2alpha-dependent PAI-1 induction contributes to angiogenesis in hepatocellular carcinoma, *Exp. Cell. Res.* 331 (2015) 46–57.
8. Gontero P, Banisadr S, Freja B, Brausi M. Metastasis markers in bladder cancer: a review of the literature and clinical considerations. *Eur Urol.* 2004; 46:296–311.
9. Herszényi L., M. Plebani, R. Cardin, P. Carraro, P.M. De, G. Roveroni, R. Naccarato, F. Farinati, The role of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in gastric cancer, *Acta Physiol. Hung.* 83 (1995) 213–221.
10. Ishchuk T. Plasma levels of MMPs and TIMP-1 in urinary bladder cancer patients / T.V. Ishchuk, D. Glavachek, O.M. Savchuk et al. // *Bio-medical Research and Therapy.* 2018. – №5. – P. 1931–1940.

11. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians.* 2011;61:69–90.
12. Li S, Wei X, He J, Tian X, Yuan S, Sun L. Plasminogen activator inhibitor-1 in cancer research. *Biomed Pharmacother.* 2018; 105:83–94.
13. McMahon B, Kwaan HC. The plasminogen activator system and cancer. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2008;36(3-4):184–194.
14. Mio H., O. Mitsuhiro, K. Yusuke, S. Yui, Y. Yusuke, K. Nobuyoshi, T. Fumitaka, F. Tomohiro, K. Akira, I. Hisao, PAI-1, a target gene of miR-143, regulates invasion and metastasis by upregulating MMP-13 expression of human osteosarcoma, *Cancer Med.* 5 (2016) 892–902.
15. Palmieri D. Plasminogen activator inhibitor-1 and -3 increase cell adhesion and motility of MDA-MB-435 B breast cancer cells / D. Palmieri, J. W. Lee, R. L. Juliano, F. C. Church // *J Biol Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P. 40950–40957.
16. Palmirotta R., P. Ferroni, A. Savonarola, F. Martini, F. Ciatti, A. Laudisi, V. Sini, G.D. Monte, F. Guadagni, M. Roselli, Prognostic value of pre-surgical plasma PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) levels in breast cancer, *Thromb. Res.* 124 (2009) 403.
17. Rijken DC. Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors: biochemical aspects. *Baillieres Clin Haematol.* 1995;8:291–312.
18. Satsuki M., K. Kazuyuki, T. Masafumi, I. Atsuhiko, D. Takashi, U. Toshinori, I. Masumi, S. Shogo, N. Satoru, M. Toshio, Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 is a potential therapeutic strategy in ovarian cancer, *Cancer Biol. Ther.* 16 (2015) 253–260.
19. Stahl A. Melanoma cell migration on vitronectin: regulation by components of the plasminogen activation system / A. Stahl, B. M. Mueller // *Int J Cancer.* – 1997. – Vol. 71. – P. 116–122.
20. Trousseau A. Phlegmasia alba dolens // *Clinique médicale.* – 1865. – №4. – P. 645–712.
21. Zhu CZ, Ting HN, Ng KH, Ong TA. A review on the accuracy of bladder cancer detection methods. *J Cancer.* 2019;10(17):4038–4044.

Надійшло до редколегії 16.01.2019
Отримано виправлений варіант 17.02.2019
Підписано до друку 17.02.2019

Received in the editorial 16.01.2019
Received a revised version on 17.02.2019
Signed in the press on 17.02.2019

В. Дмитрик, асп.,
А. Савчук, д-р біол. наук,
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
П. Яковлев, канд. мед. наук
Національний медичний університет імені А. А. Богомольця, Київ, Україна

ПОКАЗАТЕЛИ НЕКОТОРЫХ КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМЫ АКТИВАЦИИ ПЛАЗМИНОГЕНА ПРИ РАКЕ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

Рак мочевого пузыря (РМП) продолжает быть заболеванием с высоким показателем смертности. Рак мочевого пузыря является шестым для мужчин и семнадцатым для женщин по частоте злокачественным образованием во всем мире. Инвазия и метастазирование злокачественных опухолей обусловлены последовательностью процессов, среди которых – потеря клеточно-клеточной и/или клеточно-матриксной адгезии, протеолиз и индукция ангиогенеза. Различные системы протеаз задействованы в этих процессах, особенно в процессе инвазии и развития метастазов. Одной из таких систем протеаз является система активации плазминогена или фибринолиза. Изменения в балансе системы активации плазминогена исследованы при многих типах злокачественных новообразований и могут свидетельствовать не только о функционировании этой системы, но и иметь прогностическое значение. При злокачественных новообразованиях компоненты этой системы принимают участие в росте, инвазии и метастазировании опухолей, влияя на процессы клеточной миграции и ангиогенеза. Основным и уже хорошо исследованным компонентом системы активации плазминогена является сериновая протеиназа – активатор плазминогена урокиназного типа (urokinase-type PA), сокращенно uPA. В отличие от uPA, активатор плазминогена тканевого типа (tPA) характеризуется высокой аффинностью к фибрину и участвует в тромболитике. В тканях опухолей синтезируются оба типа активаторов плазминогена: tPA и uPA. Наибольшее значение среди ингибиторов фибринолиза имеет ингибитор активатора плазминогена первого типа (PAI-1), задействованный в патогенезе многих сердечно-сосудистых заболеваний, а также злокачественных онкологических новообразований. Целью данного исследования было выявить изменения содержания активатора плазминогена тканевого типа tPA и PAI-1 в плазме крови больных РМП при различных стадиях заболевания. В исследовании принимали участие 40 мужчин, у которых был верифицирован диагноз РМП. Содержание tPA и PAI-1 в предоперационной плазме крови определяли иммуноферментным методом в модификации ELISA. В ходе исследования были установлены изменения содержания tPA и PAI-1 в плазме крови на различных стадиях, что может характеризовать рост и инвазию опухоли и пополнить существующие сведения о заболевании.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, tPA, PAI-1, система активации плазминогена.

V. Dmytryk, Ph.D. stud.,
O. Savchuk, Dr. Sc.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
P. Yakovlev, Ph.D.
O. Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

CHANGES IN THE CONTENT OF SOME COMPONENTS OF THE PLASMINOGEN ACTIVATION SYSTEM IN THE PLASMA OF BLADDER CANCER PATIENTS

Bladder cancer (BC) continues to be a disease with a high mortality rate. Bladder cancer is the sixth for men and seventeenth for women in the incidence of malignancy worldwide. The invasion and metastasis of malignant tumors are caused by a sequence of processes, including loss of cell-cell and / or cell-matrix adhesion, proteolysis, and induction of angiogenesis. Different protease systems are involved in these processes, especially during the invasion and development of metastases. One such protease system is a plasminogen activation system or fibrinolysis system. Changes in the balance of plasminogen activation systems have been investigated in many types of malignancies, and these changes may not only indicate the functioning of this system but may also have prognostic significance. In malignancies, the components of this system are involved in the growth, invasion, and metastasis of tumors, affecting cell migration and angiogenesis. The main, but a well-studied component of the plasminogen activation system is serine proteinase – urokinase-type plasminogen activator (uPA). In contrast to uPA, tissue-type plasminogen activator (tPA) is characterized by a high affinity for fibrin and is involved in thrombolysis. Both types of plasminogen activators are synthesized in

tumor tissues: tPA and uPA. The largest player among the inhibitors of fibrinolysis is the plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1), involved in the pathogenesis of many cardiovascular diseases, as well as in cancer. The purpose of this study was to detect changes in the content of plasminogen activator tissue type tPA and PAI-1 in the blood plasma of patients with BC at different stages of the disease. The study involved 40 men who were verified with a diagnosis of BC. The content of tPA and PAI-1 in preoperative blood plasma was determined by enzyme immunoassay in ELISA modification. In our study, changes in the tPA and PAI-1 content of the blood plasma at different stages were identified, which can characterize tumor growth and invasion and can supplement existing disease information.

Keywords: bladder cancer, tPA, PAI-1, plasminogenactivation system.

УДК 616.8-003.98; 57.571.27

DOI: https://doi.org/10.17721/1728_2748.2020.80.19-25

Ж. Олійник, асп.,
Н. Сенчило, канд. біол. наук,
Т. Довбинчук, канд. біол. наук,
С. Степаненко, студ.
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
М. Гузик, канд. біол. наук
Інститут біохімії ім. О. В. Паладіна НАН України, Київ, Україна

РЕАКТИВНИЙ АСТРОГЛІОЗ У ЩУРІВ ІЗ ЛПС-ІНДУКОВАНОЮ ХВОРОБОЮ ПАРКІНСОНА

Розвиток астрогліозу тривалий час пов'язували із процесами захисту нейронів та реконструкції тканин мозку після його травматичного ураження або перенесеного інсульту. Однак на сьогоднішній день отримані численні докази того, що за певних умов реактивні астроцити можуть посилювати нейрозапалення і брати участь у процесах нейродегенерації. Хвороба Паркінсона (ХП) – одне з найбільш поширених нейродегенеративних захворювань, що становить важливу медико-соціальну проблему. Прогресивний перебіг захворювання потребує безперервної терапії, на пізніх стадіях викликає інвалідизацію пацієнта, що спричиняє необхідність постійного догляду й обумовлює значні економічні втрати. Патолофізіологічні основи ХП залишаються до кінця не з'ясованими, що унеможливило ранню діагностику хвороби, прогнозування її перебігу і розробку патогенетичних методів лікування. Провідним патогенетичним чинником ХП на сьогоднішній день вважається нейрозапалення поліетіологічного генезу, у розвитку якого залучені клітини мікро- та астроглії. При цьому функціональний стан астроглії в умовах розвитку нейропатології залишається найменш вивченим. Метою роботи було дослідження функціонального стану астроглії головного мозку щурів за умов розвитку ХП, індукованої бактеріальним ліпополісахаридом (ЛПС-ХП). Установлено, що розвиток ЛПС-ХП у щурів супроводжується реактивним астрогліозом із надекспресією гліального фібрилярного кислого протеїну (GFAP) та продуктів його дегградації астроцитами гіпокампальної ділянки головного мозку. Надекспресія GFAP асоційована зі збільшенням рівня основного протеїну мієліну (MBP) у гомогенатах мозку та зниженням рівня нейрональної NO-синтази.

Ключові слова: хвороба Паркінсона, астрогліоз, фібрилярний кислий протеїн, основний протеїн мієліну, нейрональна NO-синтаза.

Вступ. Хвороба Паркінсона (ХП) – прогресуюче мультисистемне захворювання, що залучає дофамінергічну, норадренергічну, серотонінергічну та холінергічну системи, із широким спектром як рухових, так і нерухових (вегетативних, сенсорних, нервово-психічних) проявів [22]. Нині кількість хворих на ХП у світі налічує близько 6 млн осіб. За прогнозами експертів ВООЗ до 2030 року очікується зростання кількості хворих до 9 млн осіб, а до 2050 року – збільшення кількості хворих у чотири рази [2]. Соціальна значущість ХП визначається неухильним прогресуванням хвороби і неминучою інвалідизацією хворих [11].

У зв'язку з таким станом справ привертається увага до необхідності своєчасної діагностики захворювання та ефективного лікування пацієнтів із ХП. При цьому патогномічних симптомів ХП немає. Діагноз встановлюється за сукупністю клінічних проявів, а проведення лікування є виключно симптоматичним [34]. Механізми нейрональної дегенерації в умовах ХП залишаються нез'ясованими, що унеможливило створення патогенетичних лікувальних засобів і розробку патогенетичних методів терапії цієї хвороби. Ключовим аспектом патолофізіології ХП є нейрозапалення, у яке залучена активація астроцитів [15]. Було показано, що позаклітинний α -синуклеїн у високих концентраціях, характерних для ХП, індукує TLR4-залежну запальну відповідь у первинних культурах астроцитів [21].

Астроцити є найбільш численною популяцією гліальних клітин у центральній нервовій системі (ЦНС). Вони становлять близько 60 % нейроглії та є одними із ключових елементів у фізіології нервової системи. Дослідження останніх двох десятиліть переконливо наводять докази щодо значної функціональної гетерогенності астроцитів, локалізованих у різних ділянках мозку

[25]. Виділяють плазматичні астроцити – клітини з короткими, але товстими відростками, які містяться в сірій речовині головного мозку, і волокнисті (фіброзні) астроцити – клітини з тонкими довгими відростками, що містяться в білій речовині ЦНС. Волокнисті астроцити розташовуються між тілом нейрона і кровоносною судиною, а плазматичні – між нервовими волокнами [5, 9]. Функції астроцитів полягають у секреції трофічних факторів, забезпеченні енергетичної підтримки нейронів, регуляції іонного та водного обмінів, підтримці гематоенцефалічного бар'єру та участі у синаптогенезі, регуляції функціональної активності інших клітин центральної нервової системи тощо [3, 29, 30].

З'ясування факту функціональної гетерогенності астроцитів дозволяє по-новому поглянути на патогенез захворювань нервової системи. В умовах нейродегенеративних процесів відбуваються реактивні зміни в астрогліальній популяції, які є частиною гліозу – одного з ключових компонентів патогенезу нейродегенеративних захворювань, у тому числі й ХП [6]. Астрогліоз розглядається як тригерний чинник ХП і активно вивчається з використанням численних експериментальних моделей цієї патології [29]. Однак, незважаючи на визнання факту асоціації астрогліозу з розвитком даної патології, його роль у патогенезі захворювання залишається остаточно нез'ясованою. Використовуючи дані, отримані на тваринних моделях ХП, частина дослідників вважають, що активовані астроцити є джерелом медіаторів запалення й у такий спосіб беруть участь у загибелі дофамінергічних нейронів [6, 26, 30]. Інші вважають, що активовані астрогліальні клітини виконують нейропротекторну функцію, забезпечуючи локалізацію запалення, ініційованого запальною активацією мікроглії [26]. При цьому звертається увага на те, що характер акти-

вації астроцитів при нейрозапаленні залежить від типу обраного індуктора хвороби і може відрізнятися залежно від використовуваної моделі хвороби [10].

Особливий інтерес у дослідженнях α -синуклеїнопатій викликають ЛПС-індуковані моделі ХП, оскільки дозволяють найбільш адекватно оцінити запальну компоненту в розвитку захворювання. Ці моделі використовуються у дослідженнях, що стосуються етіології та патогенезу ХП, а також пошуку патогенетичних терапевтичних підходів [13].

Метою даної роботи було дослідження функціонального стану астроглії головного мозку щурів за умов розвитку хвороби Паркінсона, індукованої бактеріальним ліпополісахаридом (ЛПС-ХП).

Матеріали і методи досліджень. Дослідження проводили на щурах-самцях лінії Вістар (220-250 г) розведення віварію ДУ "Інститут екології і токсикології ім. Л. І. Медведя НАМНУ". Після рандомізації тварин за вагою вони були поділені на три групи по 10 тварин у кожній: інтактні, хібнооперовані (ХО) та тварини із ЛПС-ХП. Геміпаркінсонізм моделювали шляхом стереотаксичних мікроін'єкцій 10 мкг ЛПС (Sigma, США), розчиненого у 2 мкл стерильного 0,9 % NaCl (ЗАТ "Інфузія", Україна) [18]. Хібнооперованим тваринам вводили 2 мкл стерильного 0,9 % NaCl. Автопсію тварин проводили на 28 добу після моделювання ХП. Розвиток ХП визначали за результатами поведінкових тестів та імуногістохімічного дослідження ступеня руйнування дофамінергічних нейронів substantia nigra за рівнем тирозинової гідроксилази [37]. Фіксацію тканин мозку у щурів для імуногістохімічних досліджень виконували методом транскардіальної перфузії-фіксації (whole body perfusion) під легким ефірним наркозом. Для цього використовували транскардіальну перфузію гепаринізованим фізіологічним розчином (8 од гепарину/мл 0,9 % розчину NaCl, pH 7,2) об'ємом близько 50-70 мл. Далі проводили перфузію 4 % розчином параформальдегіду у фізіологічному розчині (120-150 мл/щура вагою 200 г). Після перфузії видаляли мозок та фіксували його у 10 % нейтральному формаліні (на фосфатному буфері, PBS, pH 7,2). Фіксовані фронтальні тканини зневоднювали і заключали у парапласт (Leica Surgipath Paraplast Regular). Дегідратацію здійснювали послідовно за допомогою етанолу (від 70 до 100 % розчину етанолу), діоксану, ксилолу, ксилол/парапласту (1 : 1; 37 °C), парапласту (56 °C). Парафінові зрізи головного мозку товщиною 6 мкм виготовляли на мікротомі Thermo Microm HM 360 [8].

Для детекції маркеру астрогліозу – гліального фібрилярного кислого протеїну (GFAP) – зразки промивали 4 рази PBS та інкубували 60 хв за кімнатної температури з додаванням FITC-кон'югованих специфічних антитіл (Abscam, Великобританія). Додатково зрізи фарбували флуоресцентним барвником Hoechst-33342 (Sigma) для візуалізації ядра клітин. Оцінку імуофлюоресценції проводили мікроскопіюванням з використанням мікроскопа Carl Zeiss LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Німеччина), після чого дані обробляли з використанням програмного забезпечення ImageJ.

Визначення вмісту протеїнів (GFAP, основного протеїну мієліну (MBP, myelin basic protein) та нейрональної NO-синтази, nNOS) у зразках проводили методом Вестерн блот аналізу [23]. Блотинг протеїнів із поліакриламідного гелю (ПААГ) на нітроцелюлозну мембрану (Amersham Bioscience) проводили в апараті Mini Trans-Blot Cell (BIO-RAD, Швеція) у буфері для перенесення, що мстив: 25 ммоль/л Трис-HCl, pH 8,3, 20 % метанол, 192 ммоль/л гліцин, 0,1 % ДСН (додецилсульфат натрію). По закінченні мембрани промивали дистильованою водою та фарбували 1 % розчином барвника Ронсеау S, приготованого на 3 % ТХО (три-

хлороцтовій кислоті) 5-10 хв. Вільні центри зв'язування на мембрані блокували впродовж 1 год 5 % розчином сухого знежиреного молока (Genesee Scientific Inc., США) у PBS із додаванням 0,1 % Твін 20. Мембрани інкубували по чергові із цільовими первинними антитілами (Abscam, Великобританія), а потім – вторинними антитілами у буфері для блокування протягом ночі при 4 °C із наступним промиванням PBS. Як вторинні антитіла (АТ) використовували антивидові АТ, кон'юговані з пероксидазою хрому (Abscam, Великобританія). Візуалізацію активності пероксидази проводили кольоровою реакцією, використовуючи 3-діамінобензидинтетрахлорид (ДАБ) (Dako Cytomation, Данія). Денситометричний аналіз робили програмним забезпеченням TotalLab TL120 (Nonlinear Inc, США), де вміст протеїнів, нормований за рівнем тубуліну, представляли в умовних одиницях (ум. од.). Концентрацію білка у зразках визначали із використанням комерційного набору Modified Lowry Protein Assay Kit (Thermo Scientific, США) згідно з інструкцією виробника [24].

Статистична обробка даних проведена відповідно до вимог ДФУ [1]. Для статистичної обробки даних використано програму Statistica v. 10. Результати денситометричного аналізу блотограм представлені у вигляді середнього значення (M) та середнього квадратичного відхилення ($\pm$ SD). Статистична обробка даних виконана з використанням непараметричного U-критерію Манна – Уїтні. Відмінності між групами вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Введення ЛПС супроводжувалося розвитком геміпаркінсонізму, який реєстрували за прогресивним зростанням швидкості ротаційних рухів тварин в апоморфіновому тесті, що відображає зростаюче ушкодження нейронів чорної субстанції. Шляхом аналізу гістологічних мікропрепаратів фронтальних зрізів головного мозку виявлено дегенерацію нейронів чорної субстанції у дослідних тварин, яку оцінювали за допомогою імуногістохімічного забарвлення антитілами до тирозинової гідроксилази (дані не представлені). За результатами імуногістохімічного аналізу та денситометричного аналізу блотограм у зразках мозку щурів групи ХП встановлено збільшення вмісту GFAP [12]. GFAP є головним імуноцитохімічним маркером астроцитарної глії [14]. Вміст GFAP використовується як специфічний і чутливий молекулярний маркер функціонального стану центральної нервової системи [19]. Кількісне визначення GFAP входить до переліку обов'язкових тестів на нейротоксичність при проведенні доклінічних випробувань лікарських препаратів.

Порівняно з хібнооперованими та інтактними тваринами вміст недеградованого GFAP збільшився у 2 рази при ЛПС-індукованому геміпаркінсонізмі в експериментальних тварин (рис. 1). Вміст низькомолекулярних деградованих поліпептидів GFAP у тварин групи ХП був більшим в 11 разів, ніж у групі ХО щурів, і у 2,2 раза вищим за показник інтактних тварин. Слід зазначити, що рівень деградованих форм GFAP у ХО тварин був значно нижчим, ніж у інтактних щурів. З літератури відомо, що деградація GFAP відбувається в умовах оксидативного стресу і підвищеного рівня реактивних форм кисню, завдяки чому розглядається як ознака запалення і нейродегенеративних процесів, асоційованих із реактивним астрогліозом [4]. Отримані нами результати підтверджують ці літературні дані. Знижений порівняно з інтактними тваринами рівень деградованих форм GFAP у ХО тварин може бути наслідком активації репаративних процесів, викликаних хірургічним втручанням, і пов'язаного з цим посилення процесів скавенджингу (scavenging). Однак підтвердження висловленого припущення потребує додаткових досліджень.

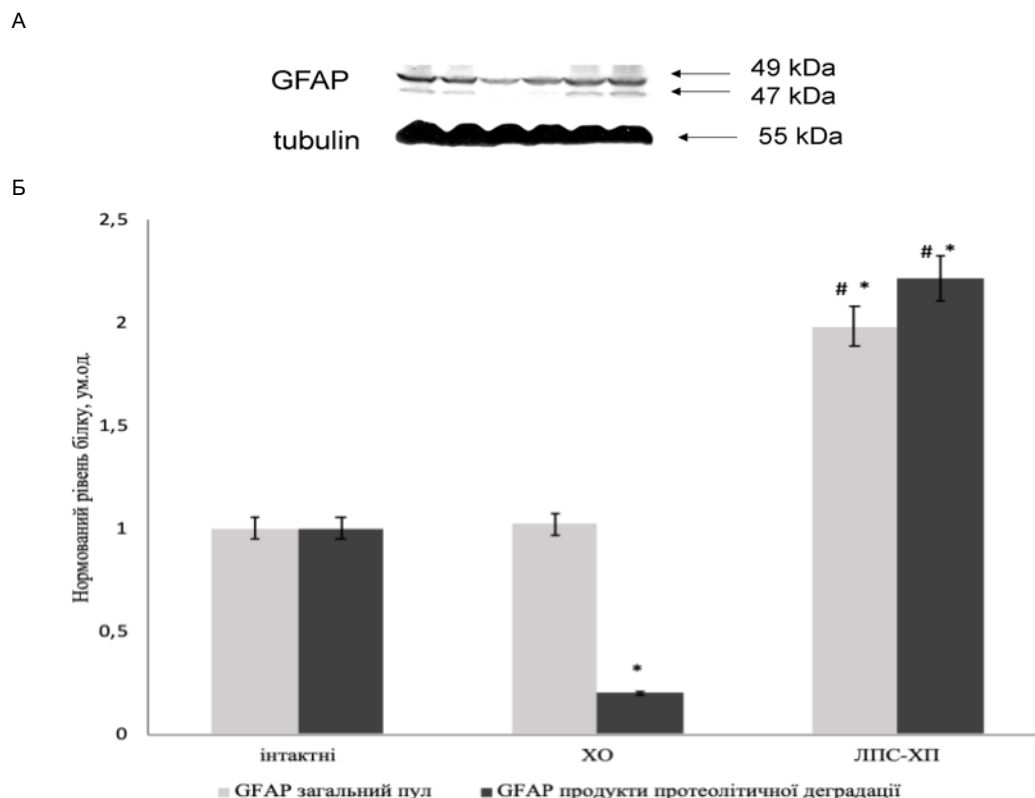


Рис. 1. Вміст GFAP та продуктів його протеолітичної деградації в гомогенатах головного мозку щурів із ЛПС-ХП. А – репрезентативні блотограми; Б – результати денситометрії блотограм ($M \pm SD$), $n = 10$ у кожній групі тварин

Примітки: * – $p \leq 0,05$ порівняно з інтактними тваринами; # – $p \leq 0,05$ порівняно із ХО тваринами.

У цілому слід зазначити, що істотне зростання кількості астрогліального маркера запалення та низькомолекулярних поліпептидів GFAP свідчить про перебіг реактивного астроцитозу внаслідок розвитку запальних процесів, індукованих введенням ЛПС. Астрогліоз є характерною патологічною ознакою ХП, важливим підтвердженням розвитку нейрозапальних процесів та адекватності створеної експериментальної моделі [28].

Імуногістохімічний аналіз зрізів головного мозку щурів із ЛПС-ХП виявив переважну локалізацію реактивних астроцитів у гіпокампі (рис. 2), у той час як в інших ділянках мозку істотних змін виявлено не було. Отримані дані вказують на те, що саме астроцити гіпокампальної ділянки залучені у розвиток реактивного астрогліозу, асоційованого з розвитком ЛПС-індукованої ХП. З огляду на те, що гіпокамп є важливим органом лімбічної системи і залучений у консолідацію пам'яті [7], можна зробити припущення, що астрогліоз у гіпокампі є важливим компонентом патофізіології когнітивних розладів за умов розвитку ЛПС-ХП.

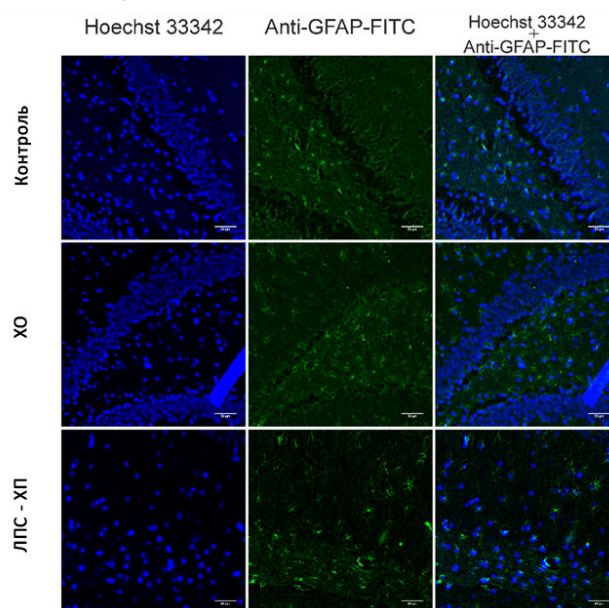


Рис. 2. Імуногістохімічний аналіз зрізів головного мозку щурів із ЛПС-ХП (гіпокампальна ділянка), $n = 10$ у кожній групі тварин. Контроль – інтактні тварини; ХО – хібнооперовані тварини; З – ЛПС-ХП – ЛПС-індукований геміпаркінсонізм. Зрізи оброблені антитілами проти GFAP додатковим фарбуванням ядер Hoechst-33342, конфокальна мікроскопія (шкала масштабу – 50 мкм)

Для оцінювання стану мієлінізації нервових волокон за експериментальних умов розвитку ЛПС-ХП у щурів методом Вестерн-блот аналізу проведено дослідження MBP. MBP відіграє важливу роль в організації, зборці та підтримці структурної цілісності мієліну. Властивості MBP дозволяють пов'язати порушення його метаболізму з розвитком процесу демієлінізації. Визначення кількісного вмісту MBP та його поліпептидного складу у тканині головного мозку використовується для оцінювання ступеня демієлінізації нейронів [36]. Розвиток альфа-синуклеїнопатії супроводжується руйнуванням MBP і процесами демієлінізації [16].

MBP мозку щурів представлений двома функціонально важливими формами, які відрізняються за фізико-хімічними властивостями: високомолекулярними поліпептидами у діапазоні молекулярних мас 95-110 кДа, які є складовими мембран шванівських клітин, і мономерною формою 17 кДа, яка має переважно цитозольну локалізацію. Імунохімічна детекція MBP показала збільшення рівня високомолекулярних поліпептидів у 1,8 раза у тварин із ЛПС-ХП порівняно з інтактними тваринами і в 1,5 раза – порівняно із ХО щурами (рис. 3).

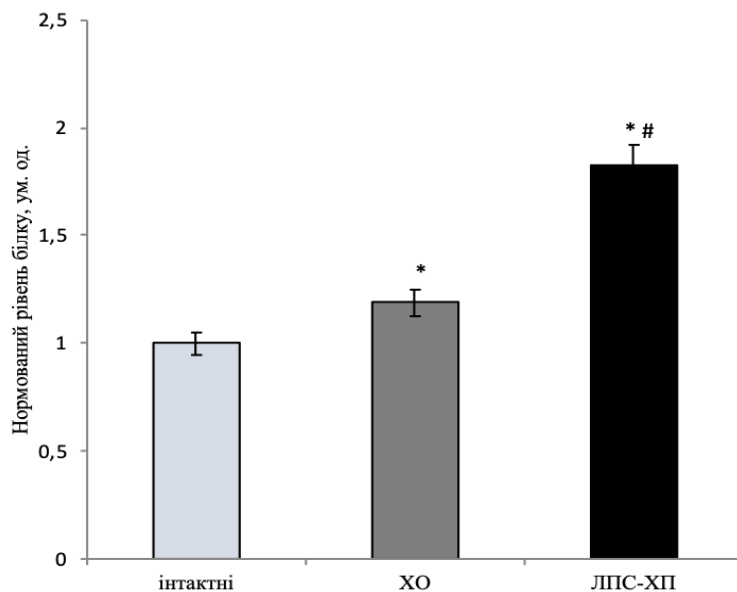


Рис. 3. Результати денситометрії блотограм вмісту MBP у зразках гомогенатів головного мозку щурів із ЛПС-ХП ($M \pm SD$), $n = 10$ у кожній групі тварин.

Примітки: * – $p \leq 0,05$ порівняно з інтактними тваринами; # – $p \leq 0,05$ порівняно з хібнооперованими тваринами

Демієлінізація властива пізнім стадіям розвитку ХП. Також доведена здатність MBP викликати проліферацію астроцитів [32]. З огляду на це збільшення вмісту MBP можна розглядати як один із тригерних чинників реактивного астрогліозу в умовах нейрозапалення, викликаного введенням ендотоксину.

NO-синтаза та продукований у результаті її активації NO мають важливе значення у фізіології головного мозку і патофізіології нейродегенеративних процесів. З одного боку, нітрозативний стрес, разом з оксидативним

стресом, є потужними чинниками руйнування дофамінергічних нейронів чорної субстанції. Поліморфізм цього ферменту пов'язують із генетично детермінованою схильністю до розвитку синуклеїнопатій, у т. ч. ХП [38]. З іншого боку, нещодавно виявлена протективна роль NO в умовах розвитку нейрозапалення та його нейротрансмітерна функція, що відіграє важливу роль у когнітивних процесах [6]. Розвиток астрогліозу у тварин із ЛПС-ХП супроводжувався зниженням показника вмісту нейрональної nNOS у 1,2 раза порівняно з інтактними тваринами (рис. 4).

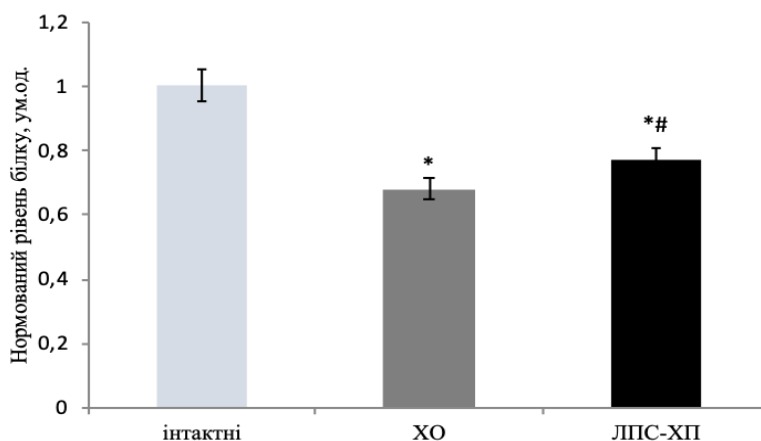


Рис. 4. Результати денситометрії блотограм за показником nNOS у гомогенатах головного мозку щурів із ЛПС-ХП ($M \pm SD$), $n = 10$

Примітки: * – $p \leq 0,05$ порівняно з інтактними тваринами; # – $p \leq 0,05$ порівняно з хібнооперованими тваринами

Багато дослідників наголошують на тому, що в нервовій тканині продукований у результаті активації нейрональної NO-синтази NO виконує, перш за все, функції нейромедіатора і відіграє важливу роль у контролі осциляторної активності нейронів та контролі тону судин [39]. З огляду на це зниження вмісту nNOS може бути причиною й ознакою порушення нервової діяльності, властивого розвитку ХП.

Висновок. Розвиток ЛПС-ХП супроводжується реактивним астрогліозом з надекспресією GFAP та продуктів його деградації у головному мозку, найбільш виразним у ділянці гіпокампу. Це явище підтверджує характерну патологічну ознаку перебігу ХП і вказує на виключну роль гіпокампальних реактивних астроцитів у патофізіології ЛПС-ХП. Виразний процес демієлінізації у тварин із ЛПС-ХП корелює зі збільшенням рівня GFAP і засвідчує участь мієліну в астрогліозі.

Список використаних джерел:

1. Статистичний аналіз біологічних випробувань і кількісних визначень // Державна Фармакопея України : у 3 т. / Державне підприємство "Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів". – 2-ге вид. – Харків : Державне підприємство "Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів". – 2015. – Т. 1. – Розд. 5.3. – С. 840-910.
2. Таппахов А. А. Современные представления об этиологии и патогенезе болезни Паркинсона (обзор) / А. А. Таппахов, Т. Я. Николаева // Вестник Северо-Восточного университета им. М. К. Аммосова. Серия "Медицинские науки". – 2016. – № 2 [03]. – С. 19-27.
3. Andres M. M. Modified western blot technique in fast detection of hemeoxygenase (ho-1/ho-2) in various tissues and organs of experimental animals / M. M. Andres, J. J. Luszczki // Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska. Sectio D: Medicina. – 2004. – Vol. 59, № 2. – P. 298-302.
4. Altered glial fibrillary acidic protein content and its degradation in the hippocampus, cortex and cerebellum of rats exposed to constant light: reversal by melatonin / G. Baydas, R. J. Reiter, V. S. Nedzvetskii et al. // J. Pineal Res. – 2002. – Vol. 33, № 3. – P. 134-139.
5. Ballistic labeling and dynamic imaging of astrocytes in organotypic hippocampal slice cultures / A. M. Benediktsson, S. J. Schachtele, S. H. Green, M. E. Dailey // J. Neurosci. Methods. – 2005. – № 141. – P. 41-53. doi: 10.1016/j.jneumeth.2004.05.013.
6. Booth H. D. E. The Role of Astrocyte Dysfunction in Parkinson's Disease Pathogenesis / H. D. E. Booth, W. D. Hirst, R. Wade-Martins // Trends Neuroscience. – 2017. – Vol. 40, № 6. – P. 358-370. doi: 10.1016/j.tins.2017.04.001.
7. Broadbent N. J. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus / N. J. Broadbent, L. R. Squire, R. E. Clark // PNAS. – 2004. – Vol. 101, № 40 – P. 14515-14520.
8. Buesa R. J. Complete elimination of xylene in practice of a histology laboratory / R. J. Buesa, M. V. Peshkov // Arkh Patol. – 2001. – Vol. 1, № 73. – P. 54-60.
9. Bushong E. A. Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development / E. A. Bushong, M. E. Martone, M. H. Ellisman // Int. J. Dev. Neurosci. – 2004. – № 22. – P. 73-86. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2003.12.008.
10. Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli / P. A. Carpentier, W. S. Begolka, J. K. Olson et al. // Glia. – 2005. – Vol. 49. – P. 360-374.
11. DeMaagd G. Parkinson's Disease and Its Management: Part 1: Disease Entity, Risk Factors, Pathophysiology, Clinical Presentation, and Diagnosis / G. DeMaagd, A. Philip. – 2015. – Vol. 40, № 8. – P. 504-32.
12. Eng L. F. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000) / L. F. Eng, R. S. Ghimikar, Y. L. Lee // Neurochem Res. – 2000. – Vol. 25, № 9-10. – P. 1439-51.
13. Acute Neuroinflammatory Response in the Substantia Nigra Pars Compacta of Rats after a Local Injection of Lipopolysaccharide / Y. M. Flores-Martinez, M. A. Fernandez-Parrilla, J. Ayala-Davila et al. // J. Immunol Res. – 2018. – 2018:1838921. doi: 10.1155/2018/1838921.
14. Review: Astrocytes in Alzheimer's disease and other age-associated dementias: a supporting player with a central role / C. J. Garwood, L. E. Ratcliffe, J. E. Simpson et al. // Neuropathol Appl Neurobiol. – 2017. – Vol. 43, № 4. – P. 281-298.
15. Gelders G. Linking Neuroinflammation and Neurodegeneration in Parkinson's Disease / G. Gelders, V. Baekelandt, A. Perren der van // J. Immunol Res. – 2018 – P. 47842-68.
16. Higher Levels of Myelin Phospholipids in Brains of Neuronal α -Synuclein Transgenic Mice Precede Myelin Loss / J. Grigoletto, R. Pukaš, A. Gamliel et al. // Acta Neuropathol Commun. – 2017 – Vol. 5, № 1. – P. 37.
17. Halliday G. M. Glia: initiators and progressors of pathology in Parkinson's disease / G. M. Halliday, C. H. Stevens // Movement Disorders. – 2011. – Vol. 26, № 1. – P. 6-17.
18. Hoban D. B. Further characterisation of the LPS model of Parkinson's disease: a comparison of intra-nigral and intra-striatal lipopolysaccharide administration on motor function, microgliosis and nigrostriatal neurodegeneration in the rat / D. B. Hoban // Brain Behav Immun. – 2013. – Vol. 27, № 1. – P. 91-100.
19. Hol E. M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system / E. M. Hol, M. Pekny // Curr Opin Cell Biol. – 2015. – № 32. – P. 121-30.
20. An Update on the Role of Nitric Oxide in the Neurodegenerative Processes of Parkinson's Disease / F. J. Jiménez-Jiménez, H. Alonso-Navarro, M. Trinidad Herrero et al. // Curr Med Chem. – 2016. – Vol. 23, № 24. – P. 2666-2679.
21. Koprich J. B. Animal models of alpha-synucleinopathy for Parkinson disease drug development / J. B. Koprich, L. V. Kalia, J. M. Brotchie // Nat Rev Neurosci. – 2017. – № 18. – P. 515-529.
22. Kordower J. H. Disease duration and the integrity of the nigrostriatal system in Parkinson's disease / J. H. Kordower // Brain. – 2013. – № 136. – P. 2419-2431.
23. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // Nature. – 1970. – Vol. 227, № 5259. – P. 680-685.
24. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent / O. H. Lowry et al. // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193. – P. 267-75.
25. Matias I. Astrocyte Heterogeneity: Impact to Brain Aging and Disease / I. Matias, J. Morgado, F. Carvalho Alcantara Gomes // Front Aging Neurosci. – 2019. – № 11 – P. 59.
26. Striatal astrocytes engulf dopaminergic debris in Parkinson's disease: A study in an animal model / I. Morales, A. Sanchez, C. Rodriguez-Sabate, M. Rodriguez // PLoS One. – 2017. – Vol. 12, № 10. e0185989. doi: 10.1371/journal.pone.0185989.
27. Paxinos G. The rat brain in stereotaxic coordinates / G. Paxinos, C. Watson // Sydney : Academic Press, 1982.
28. Rappold P. M. Astrocytes and therapeutics for Parkinson's disease / P. M. Rappold, K. Tieu // Neurotherapeutics. – 2010. – Vol. 7, № 4. – P. 413-423.
29. Rappold P. M. Astrocytes and therapeutics for Parkinson's disease / P. M. Rappold, K. Tieu // Neurotherapeutics. – 2010. – Vol. 7, № 4. – P. 413-423.
30. Heterogeneity of astrocytes: from development to injury-single cell gene expression / V. Rusnakova, P. Honsa, D. Dzamba et al. // PLoS ONE. – 2013. – 8:e69734. DOI:10.1371/journal.pone.0069734.PMID:23940528.
31. Sofroniew M. V. Astrocytes: biology and pathology / M. V. Sofroniew, H. V. Vinters // Acta Neuropathol. – 2010. – № 119. – P. 7-35. DOI: 10.1007/s00401-009-0619-8. PMID:20012068.
32. Myelin basic protein (MBP) and MBP peptides are mitogens for cultured astrocytes / S. A. South, G. E. Deibler, S. F. Tzeng et al. // Glia. – 2000. – Vol. 29, № 1. – P. 81-90.
33. Indicators of glial activation and brain oxidative stress after intraventricular infusion of endotoxin / K. Sugaya, S. Chou, S. J. Xu, M. McKinney // Brain Research Molecular Brain Research. – 1998. – Vol. 58, № 1-2. – P. 1-9.
34. Effectiveness of multidisciplinary care for Parkinson's disease: a randomized, controlled trial / M. A. Marck der van, B. R. Bloem, G. F. Borm et al. // Mov. Disord. – 2013. – № 28 – P. 605-611.
35. Verkhaty A. Physiology of astroglia / A. Verkhaty, M. Nedergaard // Physiol. Rev. – 2018. – Vol. 98, № 1. – P. 239-389.
36. Loss of myelin basic protein function triggers myelin breakdown in models of demyelinating diseases / M. T. Weil, W. Möbius, A. Winkler et al. // Cell Rep. – 2016. – Vol. 16, № 2. – P. 314-322.
37. Delayed increase of tyrosine hydroxylase expression in rat nigrostriatal system after traumatic brain injury / H. Q. Yan, X. Ma, X. Chen et al. // Brain Res. – 2007. – Vol. 1134, № 1. – P. 171-179.
38. Zhang L. Role of nitric oxide in Parkinson's disease / L. Zhang, V. L. Dawson, T. M. Dawson // Pharmacology & Therapeutics. – 2006. – Vol. 109, № 1-2. – P. 33-41.
39. Zhou L. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications / L. Zhou, D. Y. Zhu // Nitric Oxide. – 2009. – Vol. 20, № 4. – P. 223-30.

Reference (Scopus)

1. Statistichnij analiz biologichnih viprobuvan i kilkisnih viznachen. Derzhavna Farmakopeya Ukraini: v 3-h t. Derzhavne pidpriyemstvo "Ukrayinskij naukovej farmakopejnij centr yakosti likarskih zasobiv". – 2-e vid. – Harkiv: Derzhavne pidpriyemstvo "Ukrayinskij naukovej farmakopejnij centr yakosti likarskih zasobiv". 2015;1(5/3): 840-910.
2. Tappahov A. A., Nikolaeva T. Ya. Sovremennye predstavleniya ob etiologii i patogeneze bolezni Parkinsona (obzor). Vestnik Severo-Vostochnogo universiteta im. M. K. Amosova. Seriya "Medicinskie nauki". 2016; 2 (03):19-27.
3. Andres M. M., Luszczki J. J. Modified western blot technique in fast detection of hemeoxygenase (ho-1/ho-2) in various tissues and organs of

experimental animals. Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska. Sectio D: Medicina. 2004; 59 (2): 298–302.

4. Baydas G., Alterer, Reiter R. J., Nedzvetskii V. S., Nerush P. A., Kirichenko S. V. Glial fibrillary acidic protein content and its degradation in the hippocampus, cortex and cerebellum of rats exposed to constant light: reversal by melatonin. J. Pineal Res. 2002; 33(3):134–139.

5. Benediktsson A. M., Schachtele S. J., Green S. H., Dailey M. E. Ballistic labeling and dynamic imaging of astrocytes in organotypic hippocampal slice cultures. J. Neurosci. Methods. 2005; 141:41–53. doi: 10.1016/j.jneumeth.2004.05.013.

6. Booth H. D. E., Hirst W. D., Wade-Martins R. The Role of Astrocyte Dysfunction in Parkinson's Disease Pathogenesis. Trends Neuroscience. 2017; 40(6): 358–370. doi:10.1016/j.tins.2017.04.001.

7. Broadbent N. J., Squire L. R., Clark R. E. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. PNAS. 2004; 101(40):14515–14520.

8. Buesa R. J., Peshkov M. V. Complete elimination of xylene in practice of a histology laboratory. Arkh Patol. 2001; 1(73):54–60.

9. Bushong E. A., Martone M. E. and Ellisman M. H. Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development. Int. J. Dev. Neurosci. 2004;(22):73–86. doi: 10.1016/j.jdevneu.2003.12.008.

10. Carpentier P. A., Begolka W. S., Olson J. K., Elhofy A., Karpus W. J., Miller S. D. Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli. Glia. 2005; 49:360–374.

11. DeMaagd G., Philip A. Parkinson's Disease and Its Management: Part 1: Disease Entity, Risk Factors, Pathophysiology, Clinical Presentation, and Diagnosis P T. 2015; 40(8): 504–32.

12. Eng L. F., Ghimikar R. S., Lee Y. L. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969–2000). Neurochem Res. 2000; 25 (9–10):1439–51.

13. Flores-Martinez Y. M., Fernandez-Parrilla M. A., Ayala-Davila J., Reyes-Corona D., Blanco-Alvarez V. M., Soto-Rojas L. O., Luna-Herrera C., Gonzalez-Barrios J. A., Leon-Chavez B. A., Gutierrez-Castillo M. E., Martinez-Davila I. A., Martinez-Fong D. Acute Neuroinflammatory Response in the Substantia Nigra Pars Compacta of Rats after a Local Injection of Lipopolysaccharide. J Immunol Res. 2018:1838921. doi: 10.1155/2018/1838921].

14. Garwood C. J., Ratcliffe L. E., Simpson J. E., Heath P. R., Ince P. G., Wharton S. B. Review: Astrocytes in Alzheimer's disease and other age-associated dementias: a supporting player with a central role. Neuropathol Appl Neurobiol. 2017;43(4):281–298.

15. Gelders G., Baekelandt V., Van der Perren A. Linking Neuroinflammation and Neurodegeneration in Parkinson's Disease. J Immunol Res. 2018:47842 – 68.

16. Grigoletto J., Pukaš R., Gamliel A., Davidi D., Katz-Brull R., Richter-Landsberg C., Sharon R. Higher Levels of Myelin Phospholipids in Brains of Neuronal α -Synuclein Transgenic Mice Precede Myelin Loss. Acta Neuropathol Commun. 2017; 5(1): 37.

17. Halliday G. M., Stevens C. H. Glia: initiators and progressors of pathology in Parkinson's disease. Movement Disorders. 2011;26(1): 6–17.

18. Hoban D. B. Further characterisation of the LPS model of Parkinson's disease: a comparison of intra-nigral and intra-striatal lipopolysaccharide administration on motor function, microgliosis and nigrostriatal neurodegeneration in the rat. Brain Behav Immun. 2013;27 (1): 91–100.

19. Hol E. M., Pekny M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. Curr Opin Cell Biol. 2015; 32:121–30.

20. Jiménez-Jiménez F. J., Alonso-Navarro H., Trinidad Herrero M., García-Martín E., Agúndez J. A. G. An Update on the Role of Nitric Oxide in the Neurodegenerative Processes of Parkinson's Disease. Curr Med Chem. 2016; 23(24): 2666–2679.

21. Koprich J. B., Kalia L. V., Brotchie J. M. Animal models of α -synucleinopathy for Parkinson disease drug development. Nat Rev Neurosci. 2017; 18: 515–529.

22. Kordower J. H. Disease duration and the integrity of the nigrostriatal system in Parkinson's disease. Brain. 2013; 136: 2419–2431.

23. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. Nature. 1970; 227(5259): 680–685.

24. Lowry O. H. et al. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 1951; 193: 267–75.

25. Matias I., Morgado J., Carvalho Alcantara Gomes F. Astrocyte Heterogeneity: Impact to Brain Aging and Disease. Front Aging Neurosci. 2019;11:59.

26. Morales I., Sanchez A., Rodriguez-Sabate C., Rodriguez M. Striatal astrocytes engulf dopaminergic debris in Parkinson's disease: A study in an animal model. PLoS One. 2017; 12, (10):0185989. doi: 10.1371/journal.pone.0185989.

27. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Sydney: Academic Press. 1982: 1480.

28. Rappold P. M., Tieu K. Astrocytes and therapeutics for Parkinson's disease. Neurotherapeutics. 2010; 7(4): 413–423.

29. Rappold P. M., Tieu K. Astrocytes and therapeutics for Parkinson's disease. Neurotherapeutics. 2010; 7(4): 413–423.

30. Rusnakova V., Honsa P., Dzamba D. et al. Heterogeneity of astrocytes: from development to injury-single cell gene expression. PLoS ONE. 2013;8:e69734. doi:10.1371/journal.pone.0069734.PMID:23940528.

31. Sofroniew M. V., Vinters H. V. Astrocytes: biology and pathology. Acta Neuropathol. 2010;119:7–35. doi: 10.1007/s00401-009-0619-8. PMID: 20012068.

32. South S. A., Deibler G. E., Tzeng S. F., Badache A., Kirchner M. G., Muja N., De Vries G. H. Myelin basic protein (MBP) and MBP peptides are mitogens for cultured astrocytes. Glia. 2000; 29(1): 81–90.

33. Sugaya K., Chou S., Xu S. J., McKinney M. Indicators of glial activation and brain oxidative stress after intraventricular infusion of endotoxin. Brain Research Molecular Brain Research 1998; 58(1-2): 1–9.

34. Van der Marck M. A., Bloem B. R., Borm G. F. et al. Effectiveness of multidisciplinary care for Parkinson's disease: a randomized, controlled trial. Mov. Disord. 2013;28:605–611.

35. Verkhaty A., Nedergaard M. Physiology of astroglia. Physiol. Rev. 2018; 98(1):239–389.

36. Weil M. T., Möbius W., Winkler A., Ruhwedel T., Wrzós C. et al. Loss of myelin basic protein function triggers myelin breakdown in models of demyelinating diseases. Cell Rep. 2016; 16 (2): 314–322.

37. Yan H. Q., Ma X., Chen X., Shao Y., Li L., Dixon C. E. Delayed increase of tyrosine hydroxylase expression in rat nigrostriatal system after traumatic brain injury. Brain Res. 2007; 1134(1):171–179.

38. Zhang L., Dawson V. L., Dawson T. M. Role of nitric oxide in Parkinson's disease. Pharmacology & Therapeutics. 2006;109(1-2): 33–41.

39. Zhou L., Zhu D. Y. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. Nitric Oxide. 2009; 20(4): 223 – 300.

Надійшла до редколегії 17.01.2019
Отримано виправлений варіант 17.02.2019
Підписано до друку 17.02.2019

Received in the editorial 17.01.2019
Received a revised version on 17.02.2019
Signed in the press on 17.02.2019

Ж. Олійник, асп.,
Н. Сенчило, канд. биол. наук,
Т. Довбинчук, канд. биол. наук,
С. Степаненко, студ.
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
М. Гузик, канд. биол. наук
Інститут біохімії ім. А. В. Палладина НАН України, Київ, Україна

РЕАКТИВНЫЙ АСТРОГЛИОЗ У КРЫС С ЛПС-ИНДУЦИРОВАННОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА

Развитие астроглиоза длительное время связывали с процессами защиты нейронов и реконструкции тканей мозга после его травматического поражения или перенесенного инсульта. Однако на сегодняшний день получены многочисленные доказательства того, что при определенных условиях реактивные астроциты могут усиливать нейровоспаление и участвовать в процессах нейродегенерации. Болезнь Паркинсона (БП) – одно из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний, которое представляет собой важную медико-социальную проблему. Прогрессивное течение заболевания требует непрерывной терапии, на поздних стадиях вызывает инвалидизацию пациента, а также необходимость постоянного ухода и обуславливает значительные экономические потери. Патфизиологические основы ХП остаются до конца не выясненными, что делает невозможным раннюю диагностику болезни, прогнозирование ее течения и разработку патогенетических методов лечения. Основным патогенетическим фактором ХП на сегодняшний день считается нейровоспаление полиэтиологического генеза, в развитие которого вовлечены клетки микро- и астроглии. При этом функциональное состояние астроглии в условиях развития нейропатологии остается наименее изученным. Целью работы было исследование функционального состояния астроглии головного мозга крыс в условиях развития ХП, индуцированной бактериальным липополисахаридом (ЛПС-ХП). Установлено, что развитие ЛПС-ХП у крыс сопровождается реактивным астроглиозом

с надэкспрессией глиального фибриллярного кислого протеина (GFAP) и продуктов его деградации астроцитами гипокампального участка головного мозга. Надэкспрессия GFAP ассоциирована с увеличением уровня основного протеина миелина (MBP) в гомогенатах мозга и снижением уровня нейрональной NO-синтазы.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, астроглиоз, фибриллярный кислый протеин, основной протеин миелина, нейрональная NO-синтаза.

Zh. Oliynyk, Ph.D.,

N. Senchylo, Ph.D.,

T. Dovbynchuk, Ph.D.,

S. Stepanenko, stud.

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,

M. Guzik, Ph.D.

Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine (NASU)

REACTIVE ASTROGLIOSIS IN RATS WITH LPS-INDUCED PARKINSON'S DISEASES

The astrogliosis was considered as a beneficial process to protect neurons and repair the tissue after CNS insult for a long time. However, numerous study indicate that under some specific conditions, reactive astrocytes can exacerbate neuroinflammation and tissue damage. Parkinson's disease (PD) is one of the most common neurodegenerative diseases that is a major medical and social problem. The progressive course of the disease requires continuous therapy, in the later stages it causes a disability of the patient, which entails the need for constant care and causes significant economic losses. The pathophysiological bases of CP remain unclear, making it impossible to diagnose the disease early, predict its course, and develop pathogenetic treatments. Neuroinflammation of polyetiological genesis, whose development involves micro- and astroglial cells, is considered to be a leading pathogenetic factor of CP. However, the functional state of astroglia in the conditions of development of this neuropathology remains the least studied. The aim of the study was to investigate the functional state of astroglia in rats with PD induced by bacterial lipopolysaccharide (LPS-PD). It has been established that the development of LPS-PD in rats is accompanied by reactive astrogliosis with overexpression of glial fibrillar acidic protein (GFAP) and products of its degradation by astrocytes of the hippocampal region of the brain. Overexpression of GFAP is associated with an increase in the level of myelin basic protein (MBP) in brain homogenates and a decrease in the level of neuronal NO synthase.

Keywords: Parkinson's disease, astrogliosis, glial fibrillary acidic protein, myelin basic protein, neuronal NO synthase.

УДК 577.352+57.085.23

DOI: https://doi.org/10.17721/1728_2748.2020.80.25-30

К. Чернишенко, студ.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,

О. Колесник, канд. біол. наук,

М. Веселовський, д-р біол. наук

Інститут фізіології імені О. О. Богомольця НАН України, Київ, Україна

ЗАКОНОМІРНОСТІ СПОНТАННОГО КВАНТОВОГО ВИВІЛЬНЕННЯ ГЛУТАМАТУ В СИНАПСАХ НЕЙРОНІВ ПЕРВИННОЇ КУЛЬТУРИ ГІПОКАМПА ПРИ ДОВГОТРИВАЛІЙ ДЕПРЕСІЇ СИНАПТИЧНОЇ ПЕРЕДАЧІ

Представлені результати електрофізіологічних досліджень, присвячених аналізу особливостей квантового вивільнення глутамату в синапсах нейронів гіпокампа при довготривалій депресії синаптичної передачі.

Для проведення досліджень використовували первинну культуру гіпокампа щура. За допомогою методики "петч-клемп" у режимі фіксації потенціалу було визначено частоти й амплітуди збуджуваних спонтанних постсинаптичних струмів (спСС), проаналізовано їхні розподіли та розраховано основні квантові параметри в контролі й за умов довготривалої депресії синаптичної нейропередачі.

Довготривала депресія синаптичної передачі досягалася тетанічною стимуляцією аксона пресинаптичної клітини протягом 5 хв із частотою стимуляції 5 Гц. Спонтанний струм при депресії ресструвався через 20-30 хв після тетанічної стимуляції.

Показано, що при довготривалій депресії синаптичної передачі зменшуються показники амплітудних розподілів спСС, зареєстрованих у нейронах гіпокампа. Виявлено, що в контролі зазвичай вивільнюються дві везикули нейромедіатора одночасно, а під час довготривалої депресії синаптичної передачі – одна, тобто зменшується кількість спонтанно вивільнених везикул. До того ж зменшилися показники середньої величини кванта та квантового вмісту. Це вказує на вплив пресинаптичних механізмів у експресії довготривалої депресії синаптичної нейропередачі між нейронами гіпокампа в культурі. За умов довготривалої депресії достовірно не було виявлено змін у частоті спСС.

Аналіз квантових показників при довготривалій депресії глутаматергічної синаптичної передачі між нейронами є важливим для формування більш повних уявлень про механізми, які відіграють фундаментальну роль у нормальному функціонуванні ЦНС і розвитку нейрональних мереж.

Ключові слова: нейрони гіпокампа, синаптична передача, глутамат, квантовий аналіз, довготривала депресія.

Вступ. Синаптична пластичність вважається основним механізмом, що забезпечує процеси пам'яті та навчання, це властивість, яка або збільшує, або зменшує синаптичну силу у відповідь на попередню стимуляцію [1, 2]. Ця властивість виявляється в кожному з глутаматергічних синапсів трисинаптичного шляху гіпокампа і є переважно двонаправленою: якщо в результаті подразнення відбувається зниження синаптичної сили відносно

контрольного значення, то вона називається довготривалою депресією (ДТД) синаптичної нейропередачі. Навпаки, якщо відбувається збільшення синаптичної сили, то це довготривала потенціація (ДТП), яка є функціональною протилежністю ДТД. Крім того, функціональна синаптична пластичність може бути не тільки довготривалою, а й короткотривалою. Короткотривала пластичність може тривати від мілісекунд до декількох

хвилин, а довготривала – від кількох годин до днів і більше. Ці зміни впливають на функціональність синапсів і виникають залежно від інтенсивності та тривалості збудження синапсів у гіпокампі. Таким чином, регуляція синаптичної сили є необхідною властивістю для забезпечення таких процесів, як пам'ять і навчання [3, 4].

Одним із головних збуджуючих медіаторів є глутамат [2]. За допомогою виділення глутамату в гіпокампі передаються основні інформаційні потоки. Підвищення вивільнення глутамату виникає при ішемічному каскаді й асоційоване з інсультом, а також спостерігається при таких захворюваннях, як бічний аміотрофічний склероз, латризм, аутизм, деякі форми розумової відсталості, хвороба Альцгеймера [3]. Натомість зниження вивільнення глутамату спостерігається при класичній фенілкетонурії, що призводить до порушення експресії глутаматних рецепторів [4].

Відповідно до квантової моделі глутамат із пресинаптичної терміналі вивільнюється дискретними порціями – квантами [5]. У хімічних синапсах порція нейромедіатора асоціюється з кількістю медіаторів, які містяться в одній везикулі. Для опису ймовірності вивільнення нейромедіаторів застосовують просту біноміальну статистику. Експресія ДТД може залучати як постсинаптичні, так і пресинаптичні механізми. До постсинаптичних відносять зміни в терміналі постсинаптичного нейрона, а до пресинаптичних – зміни в пресинаптичній терміналі аксона [2].

Нові знання про механізми, що лежать в основі квантового вивільнення глутамату в нейронах гіпокампа, мають фундаментальне значення і можуть зробити внесок у розуміння основних феноменів навчання і пам'яті.

Матеріали та методи. Для отримання культури використовувались новонароджені щури лінії Вістар. Тварин декапітували, головний мозок вміщували в мінімальне середовище Ігла ("Sigma", США) з додаванням 20 ммоль/л буфера HEPES, 25 од/мл натрієвої солі бензилпеніциліну та 25 мкг/мл стрептоміцину сульфату.

Гіпокамп відокремлювали за допомогою скальпеля та нарізали на поперечні смужки 1–2 мм завтовшки. Ферментативну обробку здійснювали 0,05 %-м розчином трипсину (тип II, "Sigma", США) при кімнатній температурі (23–25 °C) протягом 7 хв. Потім тканину промивали два рази розчином для культивування, до складу якого входили: мінімальне середовище Ігла, кінська сироватка – 10 %, інсулін – 6 мкг/мл, бікарбонатний буфер NaHCO_3 2,3 мкг/мл, натрієва сіль бензилпеніциліну – 25 од/мл і сульфат стрептоміцину – 25 мкг/мл.

Суспензію клітин отримували за допомогою механічної дисоціації набором пастерівських піпеток із діаметрами кінчиків, які послідовно зменшувались. Клітини висаджували в чашку Петрі, яка була попередньо оброблена полі-L-орнітином. У скляне кільце діаметром 6 мм, яке обмежувало площу посадки, додавали 200 мкл суспензії. Чашки Петрі із суспензією

поміщували в інкубатор ("Jouan", Франція) з контрольованим вмістом двоокису вуглецю (5 % CO_2) в повітряно-газовій суміші з температурним режимом (37 °C) і постійним пасивним зволоженням. На третю добу культивування для пригнічення проліферації гліальних клітин у середовище додавали цитозин- β -D-арабінофуранозид (5 мкмоль/л).

Режим обробки культури за допомогою останнього підбирали таким чином, щоб пригнітити проліферацію гліальних клітин на такій стадії, коли кількість астроцитів була достатньою для утворення гліального моношару. Повторну повну заміну розчину для культивування проводили через 24 год.

З використанням методу patch-clamp у конфігурації "ціла клітина" реєстрували спонтанні постсинаптичні струми (сПСС) у нейронах гіпокампа.

Експериментальний фізіологічний розчин містив (ммоль/л): NaCl – 140; KCl – 3; CaCl_2 – 2; MgCl_2 – 2; глюкоза – 10; HEPES – 20; pH 7,4 (доведено NaOH). Внутрішньоклітинний розчин у patch-піпетках містив (ммоль/л): калію глюконату – 155; EGTA – 0,2; MgCl_2 – 2; HEPES – 20, K_2ATP – 2,5; pH 7,4 (доведено KOH).

Кінетичні параметри постсинаптичних струмів визначалися за допомогою програмного пакету Clampfit 9.0 (Axon Instruments, США). Подальша обробка і представлення результатів, включаючи статистичний аналіз, проводились за допомогою електронних таблиць Microsoft Excel та аналітичного пакету Microcal Origin.

Величини в тексті представлені у вигляді "середнє значення" $\pm$ "стандартна похибка середнього (S.E.M.)", після чого в дужках наведено розмір вибірки, за якою проводилось усереднення.

Результати та їх обговорення. Спонтанні глутаматергічні постсинаптичні струми (сПСС) у контролі відводили від нейронів гіпокампа при підтримуваному потенціалі -70 мВ. Експерименти проводили при 20–22 °C. При реєстрації глутаматергічних сПСС гальмівну передачу блокували додаванням у позаклітинний розчин специфічного блокатора ГАМК рецепторів: бікукуліну метіодиду 10 мкмоль/л (рис. 1, А, Б).

У багатьох структурах ЦНС вивільнення нейромедіаторів у міжнейронних синапсах може підпорядковуватися біноміальній статистиці [6–8]. Для спонтанних глутаматергічних постсинаптичних струмів (сПСС), зареєстрованих у шести різних нейронах гіпокампа, були побудовані розподіли амплітуд, у яких спостерігалися одна-дві добре візуально ідентифікованих моди; розподіли задовільно апроксимувалися сумою кривих Гаусса (рис. 1, В, Г). Амплітуда постсинаптичної відповіді в даному випадку відображує суму квантових викидів медіатору в усіх зонах вивільнення в синапсі. Середня величина поодинокі квантової події, пов'язаної з викидом глутамату у контролі, становить 35 ± 5 пА, при довготривалій депресії синаптичної передачі – 25 ± 4 пА.

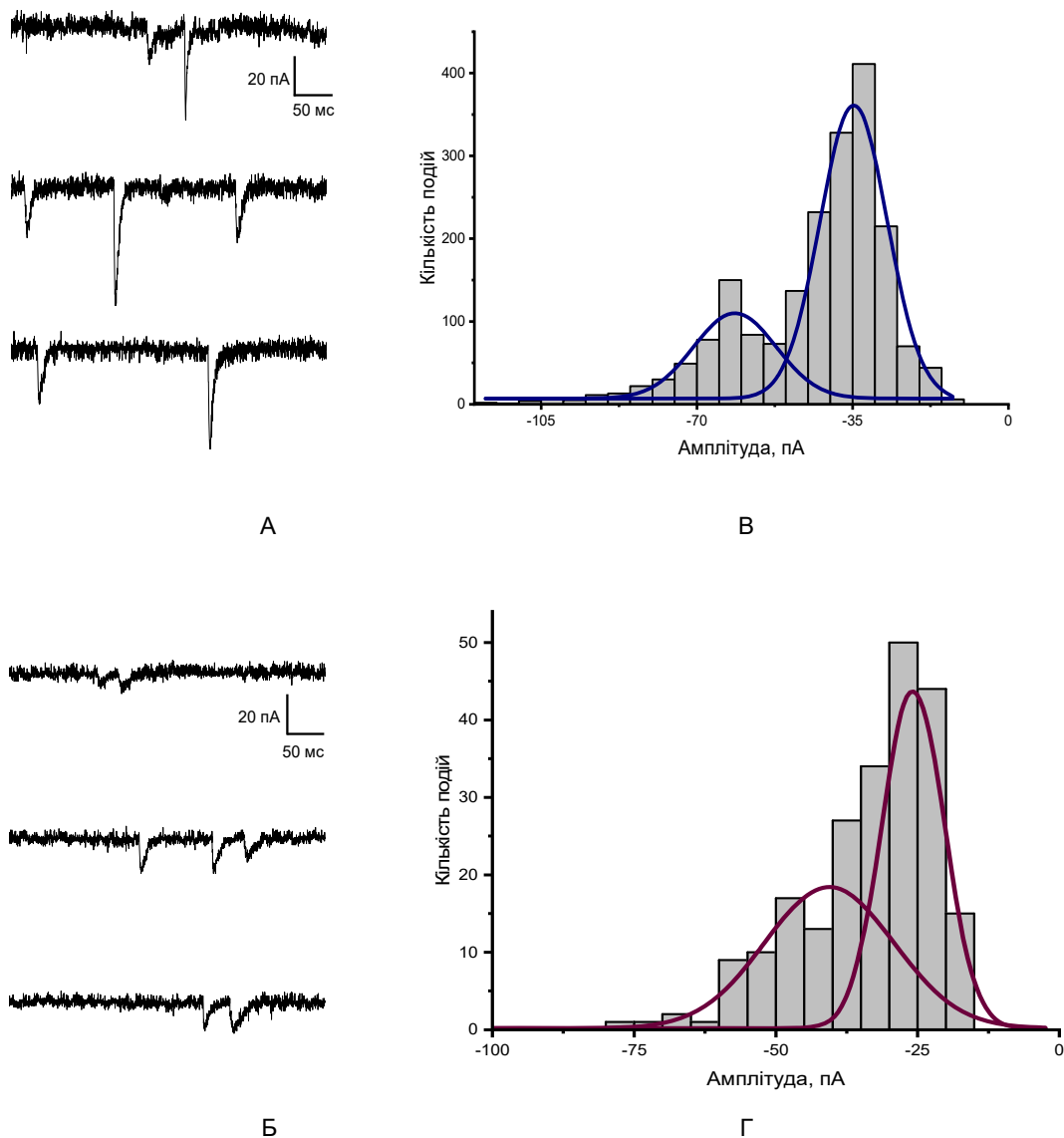


Рис. 1. Приклад реєстрації спонтанних глутаматергічних постсинаптичних струмів (сПСС) у нейронах гіпокампа й амплітудний розподіл глутаматергічних сПСС:

А – сПСС у контролі; Б – сПСС при довготривалій депресії синаптичної передачі; В – амплітудний розподіл сПСС у контролі; Г – амплітудний розподіл сПСС при довготривалій депресії синаптичної передачі (лінія показує апроксимацію кривими Гаусса розподілу амплітуд спонтанних постсинаптичних струмів)

Полімодальність амплітудних розподілів сПСС, очевидно, відображує квантове вивільнення в декількох синапсах із кількома зонами вивільнення, що характеризує такий викид як багатоквантовий [9–11]. Суперпозиція усереднених полімодальних амплітудних розподілів сПСС підтверджує по шести клітинах відстань між окремими модами розподілів амплітуд. Перший пік інтерпретується як величина ефекту вивільнення одного кванта нейромедіатора (рис. 2, А). Таким чином, найважливішим параметром викликані синаптичної події є ймовірність вивільнення квантів нейро-

медіатора. Вважається, що процес його вивільнення в окремих синапсах, якщо врахувати варіацію кількості квантів, вивільнених у відповідь на пресинаптичний ПД, задовольняє статистичний закон Пуассона [5]. Також було побудовано розподіли частот глутаматергічних сПСС, нормованих на максимальне значення (рис. 2, Б), і розраховано показники розподілів частот сПСС, зареєстрованих у нейронах гіпокампа під час контролю та при довготривалій депресії синаптичної нейротрансмісії (табл. 1).

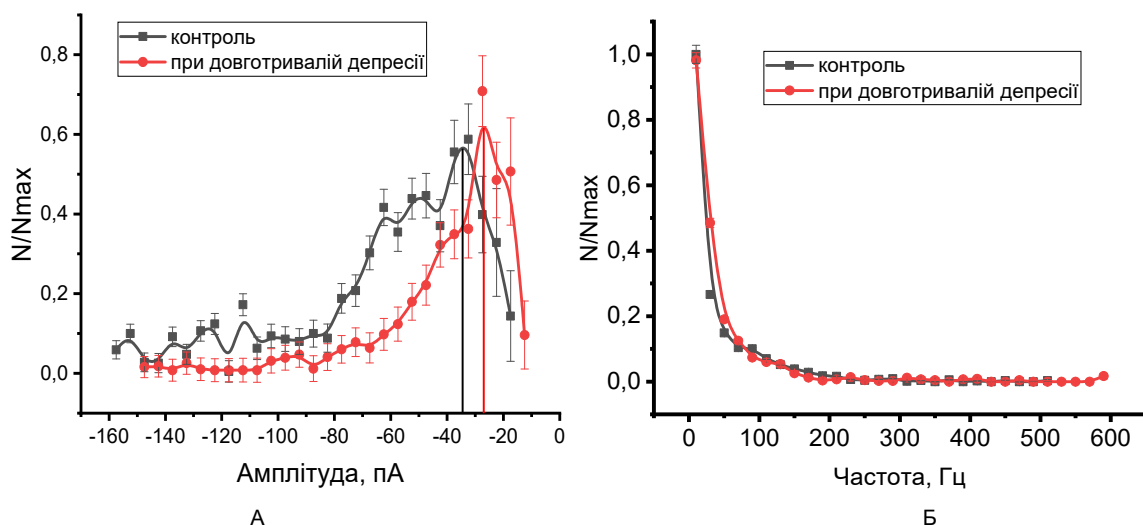


Рис. 2. А – суперпозиція усереднених полімодальних амплітудних розподілів сПСС у контролі та при довготривалій депресії (кількість (N) подій, нормованих на максимальні значення; N/N_{max}). Вертикальні лінії вказують на середні значення мод амплітудних гістограм. Б – усереднені розподіли частот сПСС, нормовані на максимальне значення (N/N_{max})

Таблиця 1. Показники розподілів частот глутаматергічних спонтанних постсинаптичних струмів (Гц), зареєстрованих у нейронах гіпокампа ($M \pm m$, $n = 6$)

Показники	Контроль	При довготривалій депресії
Середнє значення, Гц	29 ± 9	30 ± 6
Мода, Гц	21 ± 8	17 ± 6
Медіана, Гц	14 ± 5	14 ± 3

Достовірно немає різниці порівняно зі значеннями в контролі за t-критерієм Стьюдента ($p > 0,95$)

За умов довготривалої депресії достовірно не було виявлено змін у частоті сПСС.

Були розраховані показники амплітудних розподілів спонтанних постсинаптичних струмів, зареєстрованих у нейронах гіпокампа для контролю та при довготривалій депресії: середнє значення амплітуди, медіана, мода (рис. 3, А) і квантовий вміст (рис. 3, Б, табл. 2). Значен-

ня середнього квантового вмісту розраховували як відношення середньої амплітуди ПСС ($I_{сер}$) до середньої величини постсинаптичної відповіді, еквівалентної викиду поодинокого кванта медіатора (q). Розрахований критерій χ^2 -квадрат підтвердив статистично достовірну різницю між даними.

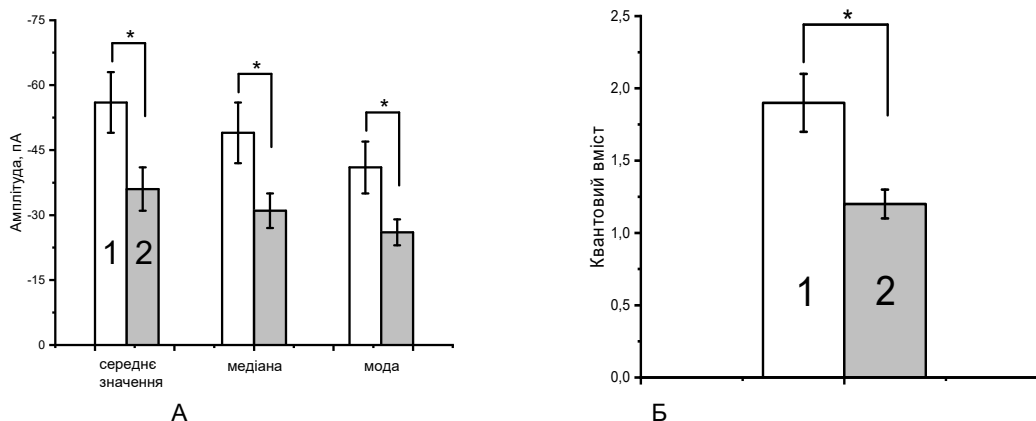


Рис. 3. А – показники амплітудних розподілів сПСС, зареєстрованих у нейронах гіпокампа; Б – квантовий вміст: 1 – контроль; 2 – за умов довготривалої депресії (* $P < 0,05$)

Таблиця 2. Показники амплітудних розподілів сПСС, зареєстрованих у нейронах гіпокампа ($M \pm m$, $n = 6$)

Показники	Контроль	При довготривалій депресії	Різниця, %
Середнє значення, пА	-56 ± 7	$-36 \pm 5^*$	30 ± 6
Медіана, пА	-49 ± 7	$-31 \pm 4^*$	29 ± 8
Мода, пА	-41 ± 6	$-26 \pm 3^*$	30 ± 9
Квантовий вміст ($m = \frac{I_{сер}}{q}$)	$1,9 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,1^*$	27 ± 8

*статистично достовірна різниця порівняно зі значеннями у контролі за t-критерієм Стьюдента ($P \leq 0,05$)

Зменшення амплітуди сПСС обумовлено зменшенням квантового вмісту. Результати свідчать, що тетанічна стимуляція 5 Гц протягом 5 хв призводить до зниження ефективності багатовезикулярного викиду глутамату в нейронних мережах гіпокампа.

Оцінюючи параметри квантового вмісту сПСС, який у контролі становив $1,9 \pm 0,2$, а при довготривалій депресії синаптичної передачі – $1,2 \pm 0,1$, та амплітудний розподіл сПСС, можна вважати, що в контролі зазвичай вивільнюються дві везикули нейромедіатора одночасно, а під час довготривалої депресії синаптичної передачі – одна, тобто ймовірність викиду стає меншою. Це вказує на вплив пресинаптичних механізмів у експресії довготривалої депресії синаптичної нейропередачі між нейронами гіпокампа в культурі.

Висновки. Охарактеризована квантова природа вивільнення нейромедіатора глутамату в синапсах нейронів гіпокампа. За допомогою методики "петч-клемп" у режимі фіксації потенціалу були зареєстровані збуджуючі спонтанні постсинаптичні струми, визначено числові характеристики розподілів частот і амплітуд глутаматергічних збуджуючих спонтанних струмів та розраховані їхні квантові параметри.

Показано, що середня величина кванта, що характеризує вивільнення глутамату в культивованих нейронах гіпокампа, за контрольних умов становить 35 ± 5 пА, а при довготривалій депресії – 25 ± 4 пА ($n = 6$).

За допомогою біноміальної статистики виявлено зменшення квантового вмісту, який у контролі становив $1,9 \pm 0,2$, а під час довготривалої депресії – $1,2 \pm 0,1$ ($n = 6$).

Показано, що після тетанічної стимуляції при довготривалій депресії зменшились показники амплітудних розподілів сПСС, зареєстрованих у нейронах гіпокампа: середнє значення – на 30 ± 6 %, медіана – на 29 ± 8 %, мода – на 30 ± 9 %.

За умов довготривалої депресії достовірно не було виявлено змін у частоті сПСС.

Отже, зменшення таких квантових параметрів вивільнення глутамату, як величина кванта, квантовий вміст, і показників амплітудних розподілів сПСС указують на те, що до експресії довготривалої депресії синаптичної нейропередачі між нейронами гіпокампа в культурі залучені пресинаптичні механізми.

Список використаних джерел:

1. Eriksson P. Neurogenesis in the adult human hippocampus / P. Eriksson, E. Perfilieva // NatMed. – 1998. – Vol. 4. – P. 1313-1317.
2. Meldrum B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: Review of physiology and pathology / B. S. Meldrum // J. Nutr. – 2000. – Vol. 130. – P. 1007-1015.

3. Wang R. Role of glutamate and NMDA receptors in Alzheimer's disease / R. Wang, P. Hemachandra Reddy // J. Alzheimers Dis. – 2017. – Vol. 57. – P. 1041-1048.

4. McEntee W. J. Glutamate: Its role in learning, memory and the aging brain / W. J. McEntee, T. H. Crook // Psychopharmacology. – 1993. – Vol. 111. – P. 391-401.

5. Castillo J. Quantal components of the end-plate potential / J. Castillo, B. Katz // J. Physiol. – 1954. – Vol. 124. – P. 560-573.

6. Kullmann D. M. LTP of AMPA and NMDA receptor-mediated signals: evidence for presynaptic expression and extrasynaptic glutamate spill-over / D. M. Kullmann, G. Erdemli, F. Asztly // Neuron. – 1996. – Vol. 17. – P. 461-474.

7. Voronin L. L. On the quantal analysis of hippocampal long-term potentiation and related phenomena of synaptic plasticity / L. L. Voronin // Neuroscience. – 1993. – Vol. 56. – P. 275-304.

8. Glushakova O. Long-term changes in glutamate ergic synaptic transmission in phenylketonuria / O. Glushakova, M. Varshney // Brain. – 2005. – Vol. 128. – P. 300-307.

9. Abraham W. C. Metaplasticity: the plasticity of synaptic plasticity / W. C. Abraham, M. F. Bear // Trends Neurosci. – 1996. – Vol. 19. – P. 126-130.

10. Ogasawara H. Systems biology perspectives on cerebellar long-term depression / H. Ogasawara, T. Doi, M. Kawato // Neurosignals. – 2008. – Vol. 16. – P. 300-317.

11. Bellone C. Mechanisms of synaptic depression triggered by metabotropic glutamate receptors / C. Bellone, C. Lüscher, M. Mameli // Cell Mol Life Sci. – 2008. – Vol. 65. – P. 2913-2923.

Reference (Scopus):

1. Eriksson P. S., Perfilieva E., Björk-Eriksson T., Alborn A. M., Nordborg C., Peterson D. A., Gage F. H. Neurogenesis in the adult human hippocampus. NatMed. 1998;4(11):1313-7.
2. Meldrum B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. J. Nutr. 2000;130(4S Suppl):1007-15.
3. Wang R., Hemachandra Reddy P. Role of glutamate and NMDA receptors in Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 2017; 57(4): 1041–1048.
4. McEntee W. J., Crook T. H. Glutamate: its role in learning, memory, and the aging brain. Psychopharmacology (Berl). 1993;111(4):391-401.
5. Castillo J., Katz B. Quantal components of the end-plate potential. J Physiol. 1954 Jun 28; 124(3): 560–573.
6. Kullmann D. M., Erdemli G., Asztely F. LTP of AMPA and NMDA receptor-mediated signals: evidence for presynaptic expression and extrasynaptic glutamate spill-over. Neuron. 1996;17(3):461-74.
7. Voronin L. L. On the quantal analysis of hippocampal long-term potentiation and related phenomena of synaptic plasticity. Neuroscience. 1993;56(2):275-304.
8. Glushakov A. V., Glushakova O., Varshney M., Bajpai L. K., Summers C., Laipis P. J., Embury J. E., Baker S. P., Otero D. H., Dennis D. M., Seubert C. N., Martynyuk A. E. Long-term changes in glutamatergic synaptic transmission in phenylketonuria. Brain. 2005;128(Pt 2):300-7.
9. Abraham W. C., Bear M. F. Metaplasticity: the plasticity of synaptic plasticity. Trends Neurosci. 1996;19(4):126-30.
10. Ogasawara H., Doi T., Kawato M. Systems biology perspectives on cerebellar long-term depression. Neurosignals. 2008;16(4):300-17.
11. Bellone C., Lüscher C., Mameli M. Mechanisms of synaptic depression triggered by metabotropic glutamate receptors. Cell Mol Life Sci. 2008;65(18):2913-23.

Надійшла до редколегії 17.01.2019

Отримано виправлений варіант 17.02.2019

Підписано до друку 17.02.2019

Received in the editorial 17.01.2019

Received a revised version on 17.02.2019

Signed in the press on 17.02.2019

К. Чернишенко, студ.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,

О. Колесник, канд. биол. наук,

Н. Веселовский, д-р биол. наук

Институт физиологии имени О. О. Богомольца НАН Украины, Киев, Украина

ЗАКОНОМЕРНОСТИ СПОНТАННОГО КВАНТОВОГО ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ГЛУТАМАТА В СИНАПСАХ НЕЙРОНОВ ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЫ ГИПОКАМПА ПРИ ДЛИТЕЛЬНОЙ ДЕПРЕССИИ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ

Представлены результаты электрофизиологических исследований, посвященных анализу особенностей квантового высвобождения глутамата в синапсах нейронов гиппокампа при длительной депрессии синаптической передачи.

Для проведения исследований использовали первичную культуру гиппокампа крыс. С помощью методики "петч-клемп" в режиме фиксации потенциала были определены частоты и амплитуды возбуждающих спонтанных постсинаптических токов (сПСТ), проанализированы их распределения и рассчитаны основные квантовые параметры.

Долговременная депрессия синаптической передачи достигалась путём тетанической стимуляции аксона пресинаптической клетки в течение 5 мин с частотой стимуляции 5 Гц. Спонтанный ток при депрессии регистрировался через 20-30 мин после тетанической стимуляции.

Показано, что при длительной депрессии синаптической передачи уменьшились показатели амплитудных распределений сПСТ, зарегистрированных в нейронах гиппокампа. Было обнаружено, что в контроле обычно выделяются две везикулы нейромедіатора одновременно, а при длительной депрессии синаптической передачи – одна, то есть вероятность высвобождения становится

меньше. К тому же уменьшились показатели средней величины кванта и квантового содержания. Это указывает на влияние пресинаптических механизмов в экспрессии длительной депрессии синаптической нейротрансдачи между нейронами гиппокампа в культуре. В условиях длительной депрессии достоверно не было выявлено изменений в частоте сПСТ.

Анализ квантовых показателей при длительной депрессии глутаматергической синаптической передачи между нейронами важен для формирования более полных представлений о механизмах, которые играют фундаментальную роль в нормальном функционировании ЦНС, и развития нейронных сетей.

Ключевые слова: нейроны гиппокампа, синаптическая передача, глутамат, квантовый анализ, длительная депрессия.

K. Chernyshenko, stud.

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,

O. Kolesnyk, Ph.D.,

N. Veselovskiy, Dr. Sc.

Bogomoletz Institute of Physiology of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

THE ANALYSIS OF QUANTAL CHARACTERISTICS OF SPONTANEOUS EVOKED EXCITATORY POST SYNAPTIC POTENTIAL SIN LONG-TERM DEPRESSION OF GLUTAMATERGIC NEUROTRANSMISSION BETWEEN CULTURED HIPPOCAMPAL NEURONS

The results of electrophysiological studies of the quantal release features of glutamate in hippocampal neurons' synapses in long-term depression of synaptic transmission are presented.

To research the topic, we used the primary culture of the rat hippocampus. Using the patch-clamp technique, the frequencies and amplitudes of excitatory spontaneous postsynaptic currents (EPSCs) were determined, their distributions were analyzed and the basic quantal parameters were calculated.

Long-term depression of synaptic transmission was achieved by tetanic stimulation of the axon of the presynaptic cell for 5 minutes with a stimulation frequency of 5 Hz. Spontaneous current in depression was recorded 20-30 min after tetanic stimulation.

It has been shown that the amplitude of the EPSCs registered in hippocampal neurons decreased in the long-term depression of synaptic transmission. It has been found that two neurotransmitter vesicles are usually released in the control at the same time and one during the long-term depression of synaptic transmission. It means that the probability of release decreased. In addition, the average quantal amplitude and quantum content decreased. It indicates the effect of presynaptic mechanisms in the expression of long-term depression of synaptic neurotransmission between hippocampal neurons in culture. In the conditions of long-term depression, no significant changes were found in the frequency of EPSCs.

The analysis of quantum parameters in long-term depression of glutamatergic synaptic transmission between neurons is important for the formation of more complete ideas about the mechanisms that play a fundamental role in the normal functioning of the CNS and the development of neural networks.

Keywords: hippocampal neurons, synaptic transmission, glutamate, quantum analysis, long-term depression.

УДК 612.82/83; 612.821

DOI: https://doi.org/10.17721/1728_2748.2020.80.30-34

Т. Куценко, канд. біол. наук, доц.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ВПЛИВ КОГНІТИВНОГО НАВАНТАЖЕННЯ НА ПРОЯВ ЕМОЦІЙНОГО ЕФЕКТУ СТРУПА

Емоційний ефект Струпа (ЕЕС) є результатом більшої затримки при називанні кольору, яким написані емоційні слова, ніж кольору, яким написані нейтральні слова, за рахунок переключення уваги на емоційно значущу інформацію. ЕЕС переважно застосовується в обстеженнях психопатологій, але перспективним є його використання і для розв'язання прикладних психофізіологічних завдань, від професійного відбору і нейромаркетингу до детектування брехні та виявлення загроз із боку емоційно нестабільних індивідів. Оскільки ЕЕС чутливий до умов тестування, то досліджувались різні модифікації емоційного тесту Струпа (ЕТС). У межах субтестів наводились нейтральні та емоційні (з негативним забарвленням) слова. Включення в субтести дистракторів (гальмівних слів, назв рослин і тварин, на які не потрібно реагувати натисканням клавіш) ускладнює виконання завдання, що виявляється у значному подовженні часу реакції. У випадку виконання завдання зі значним когнітивним навантаженням ліва рука реагує на емоційні стимули довше, ніж права. Отримані результати можуть указувати на формування особливої системи оброблення емоційної інформації у правій півкулі, тоді як ліва півкуля зосереджена на виконанні когнітивного завдання. Імовірно, що у випадку посилення когнітивного контролю підсистеми оброблення емоційної та когнітивної інформації працюють відносно автономно, міжпівкульна взаємодія посилюється, а функціональна асиметрія зменшується. Зі зменшенням когнітивного тиску зростає функціональна асиметрія, імовірно, зменшується міжпівкульна взаємодія, а ЕЕС не виявляється. Отримані величини латентних періодів реакції на емоційно значущі та нейтральні подразники можуть бути використані для розробки шкал і критеріїв оцінювання емоційних реакцій людини за потреби їх виявлення.

Ключові слова: емоційний ефект Струпа, латентні періоди реакції, міжпівкульна асиметрія, метаконтроль.

Вступ. Мозок людини постійно відстежує значущу інформацію, яка априорі є емоційною, і обов'язково переключає ресурси уваги у випадку її надходження. Емоційний ефект Струпа (ЕЕС) є результатом більшої затримки при називанні кольору, яким написані емоційні слова, ніж кольору, яким написані нейтральні слова. ЕЕС переважно застосовується і гарно виявляється в обстеженнях низки психопатологій, таких як тривожність, obsesивно-компульсивні розлади, посттравматичний синдром, депресія, соціальна фобія. У дослідженнях здорових людей цей ефект часто менш виражений. Принаймні частина популярності емоційного тесту Струпа пояснюється його об'єктивною природою, тим, що він не заснований на самозвіті та не є нав'язливим (тобто не втручається у внутрішній світ обстежуваного). Крім того, емоційні слова можуть бути підібрані так, щоб відповідати конкретній патології або поточній проблемі обстежуваного [4]. Попри величезну кількість досліджень нейронних механізмів оброблення емоційної інформації, унаслідок складності і залучення широких нейромереж до її обробки, питання про те, якими системами мозку здійснюється контроль за потоками емоційної інформації, усе ще далеке від розв'язання. Відомо, що до виникнення ЕЕС залучені передня система уваги та емоційно-генні структури мозку [6, 9, 8]. Імовірно, що за механізмами виникнення ЕЕС близький

дою, тим, що він не заснований на самозвіті та не є нав'язливим (тобто не втручається у внутрішній світ обстежуваного). Крім того, емоційні слова можуть бути підібрані так, щоб відповідати конкретній патології або поточній проблемі обстежуваного [4]. Попри величезну кількість досліджень нейронних механізмів оброблення емоційної інформації, унаслідок складності і залучення широких нейромереж до її обробки, питання про те, якими системами мозку здійснюється контроль за потоками емоційної інформації, усе ще далеке від розв'язання. Відомо, що до виникнення ЕЕС залучені передня система уваги та емоційно-генні структури мозку [6, 9, 8]. Імовірно, що за механізмами виникнення ЕЕС близький

до орієнтувального рефлексу [3]. Можна припустити, що при цьому велику роль має відігравати також міжпівкульна функціональна асиметрія та взаємодія. Дослідження механізмів емоційних процесів становить не лише суто теоретичний, але і практичний інтерес. Установлення і застосування параметрів реакції на певні подразники, у першу чергу латентних періодів (ЛП) реакції, може мати практичне значення для цілої низки сфер діяльності людини, від професійного відбору і нейромаркетингу до детектування брехні та виявлення загроз із боку емоційно нестабільних індивідів. При всій, здавалось би, простоті ЕТС виникає багато труднощів, пов'язаних із вибором параметрів і режимів тестування, що накладає відбиток на отримання релевантного результату (власне ЕЕС) [4]. Тестування ЕЕС дуже чутливе до різних деталей: орально чи мануально надаються відповіді, блоками чи змішано подаються нейтральні та емоційні слова, довжина самих слів, семантичні поля, із яких вони підібрані тощо. Для практичного застосування важливо мати відносно прості, зручні в застосуванні та недорогі методики вимірювання емоційних реакцій. У більшості досліджень, які вимірюють ЛП реакції на ті чи інші стимули, використовується домінуюча рука, і це цілком вірно, оскільки реакції саме цієї руки перебувають під точнішим метаконтролем (порівняно з недомінуючою рукою) з боку центрального процесора, на роль якого найбільше претендує фронто-парієтальна система лівої півкулі. Але коли потрібно виявити емоційні реакції, які свідомо чи підсвідомо пригнічуються, саме реакції недомінуючої руки, яка слабше свідомо контролюється, можуть дати цінну інформацію про обробку емоційних подразників. Збільшення когнітивного навантаження відволікає ресурси уваги, сприяючи прояву підсвідомих реакцій [10]. Новизна представленого в роботі дослідження полягає у порівнянні режимів тестування ЕЕС із різним рівнем когнітивного навантаження, а також оцінюванні функціональної асиметрії мозку при виконанні ЕТС за порівняннями ЛП реакції на подразники для обох рук.

Об'єкт та методи досліджень. В обстеженні застосований емоційний тест Струпа (ЕТС), який був розроблений на кафедрі фізіології людини і тварин ННЦ "Інститут біології та медицини" КНУ імені Тараса Шевченка [1]. У тесті подаються як слова, що мають емоційне навантаження (негативно емоційно забарвлені слова, наприклад "кров", "аборт", "зрада" тощо), так і загальноновживані, які, за припущенням, не емоційні для переважної більшості людей. Усі слова підібрано так, щоб їхня довжина дорівнювала п'яти літерам і вони вживались у побутовому спілкуванні зі схожою частотою. Обстежуваному подавалася серія із 240 слів, по 120 для кожної руки, які експонувались у псевдовипадковому порядку. У першій модифікації емоційно-значущі, емоційно-нейтральні слова та назви рослин і тварин (гальмівний подразник, дистрактор) подавались по центру екрана. На екран монітору комп'ютера виводилася інструкція: "Якщо слово, яке з'явиться на екрані, зеленого кольору – натиснути клавішу "Q" (ліва рука), якщо червоного – натиснути "P" (права рука), якщо назва рослини або тварини – на клавіші не натискати".

Введення гальмівних подразників (дистракторів) спонукає свідомо читати слова, які подаються, і це посилює когнітивне навантаження. Використання гальмівного подразника разом із необхідністю співвідносити кольори, якими написані слова, з реакціями правої та лівої руки, значно захоплює увагу обстежуваного і відволікає від емоційного значення слів. Аналізувались ЛП реакцій кожної руки на емоційно значущі та нейтральні слова. Відповіді обстежуваних обома руками створюють для обох півкуль однакові можливості реагування і дозволяють оцінити прояв міжпівкульної асиметрії при виконанні ЕТС. Друга модифікація тестів аналогічна, але ознакою, яку потрібно диференціювати, є сторона пред'явлення слова – ліворуч чи праворуч. Слова написані білим кольором на чорному тлі екрана. Від обстежуваного вимагається натискати клавішу Q (лівою), P (правою рукою) або зовсім не натискати при пред'явленні на екрані слова ліворуч або праворуч, відповідно. В обох модифікаціях кожна помилка супроводжується неголосним коротким звуковим сигналом. Ряд слів сформований випадково і є фіксованим для всіх варіантів тесту. У даному обстеженні взяли участь 63 студенти віком від 18 до 23 років, 39 жінок та 24 чоловіки. Тести були пройдені в такому порядку: критерій – колір, з гальмівним подразником (дистрактором); критерій – сторона, з гальмівним подразником; критерій – колір, без гальмівного подразника; критерій – сторона, без гальмівного подразника. Тестові завдання подавались українською або російською мовою, за бажанням обстежуваного.

Статистичний аналіз результатів проводився за допомогою пакету STATISTICA 6.0 (Statsoft, USA, 2001). Усі величини ефектів, partial eta squared (η^2), були розраховані з використанням ANOVA. ЛП реакцій аналізувались $2 \times 2 \times 2 \times 2$ повторними вимірюваннями ANOVA з факторами Стать (жінки проти чоловіків), Дистрактор ("з дистрактором" проти "без дистрактора"), Завдання (колір проти сторони), Подразник (емоційний проти нейтрального), Рука (права проти лівої). Критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез приймався рівнем $p = 0,05$.

Результати та їх обговорення. ЛП реакції виявились довшими у тестах із дистрактором (929 мс) порівняно з тестами без дистрактора (473 мс), $(1, 62) = 777,70$, $p = 0,0000$, $\eta^2 = 0,926$; при реагуванні на колір (779 мс) порівняно зі стороною (623 мс), $F(1, 62) = 242,98$, $p = 0,0000$, $\eta^2 = 0,796$; лівою рукою (708 мс) порівняно із правою (693 мс) $F(1, 62) = 22,109$, $p = 0,00001$, $\eta^2 = 0,263$. Вплив статі не досяг рівня статистичної значущості.

Виявлено ефект взаємодії між типом завдання (колір/сторона) і типом подразника (нейтральний/емоційний): $F(1, 62) = 7,7602$, $p = 0,00708$, $\eta^2 = 0,111$, який показує, що відмінності ЛП реакцій на емоційні та нейтральні стимули (емоційний ефект Струпа) особливо виражені при обробленні складнішої інформації – диференціюванні кольору порівняно з визначенням сторони, з якої знаходиться подразник (рис. 1).

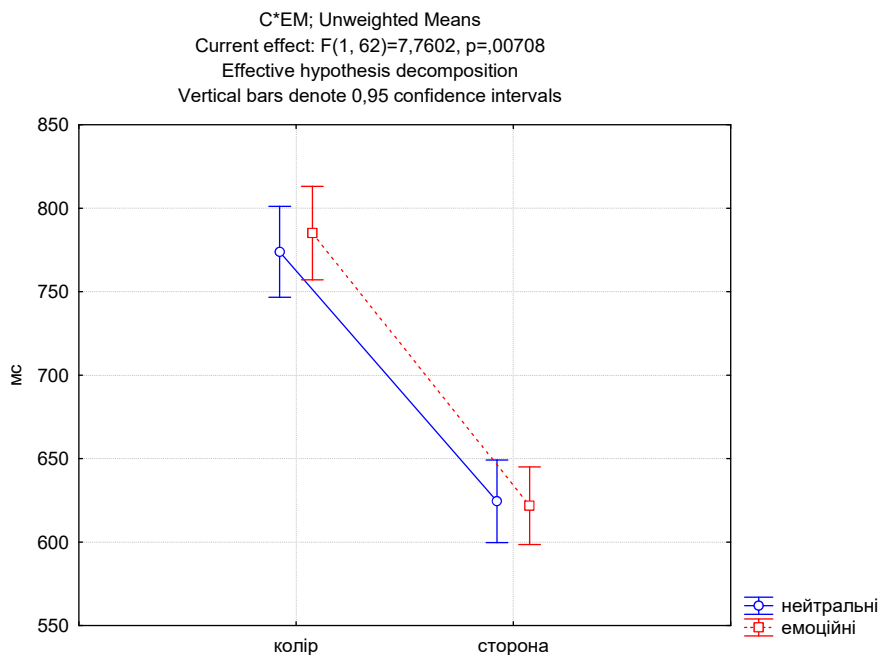


Рис. 1. Аналіз ANOVA латентних періодів реакції на нейтральні та емоційні слова у тестах із необхідністю диференціювати колір подразника або сторону пред'явлення подразника (n = 63)

Коротший ЛП реакції на сторону пред'явлення подразника пояснюється ефектом Поффенберга. Згідно з анатомічною моделлю Поффенберга (1912), коли використовується рука з тієї самої сторони, що і латералізований стимул, виявлення стимулу і моторна відповідь об'єднуються в одній і тій самій півкулі (неперехрещений шлях). На противагу, коли використовується рука, протилежна до сторони пред'явлення стимулу, виявлення сигналу і відповідь на нього мають бути об'єднані

між півкулями через мозолисте тіло (перехрещений шлях). Цей довший шлях має повільніший час реакції, що і було виявлено Поффенбергом та багатьма іншими дослідниками [5, 7]. У нашому випадку використовувався неперехрещений, легший шлях.

Виявлено також ефект взаємодії між типом завдання (колір/сторона) та рукою (ліва/права): $F(1, 62) = 4,0755, p = 0,04784, \eta^2 = 0,062$, який показує, що ліва рука довше реагує на обидва типи подразників (рис. 2).

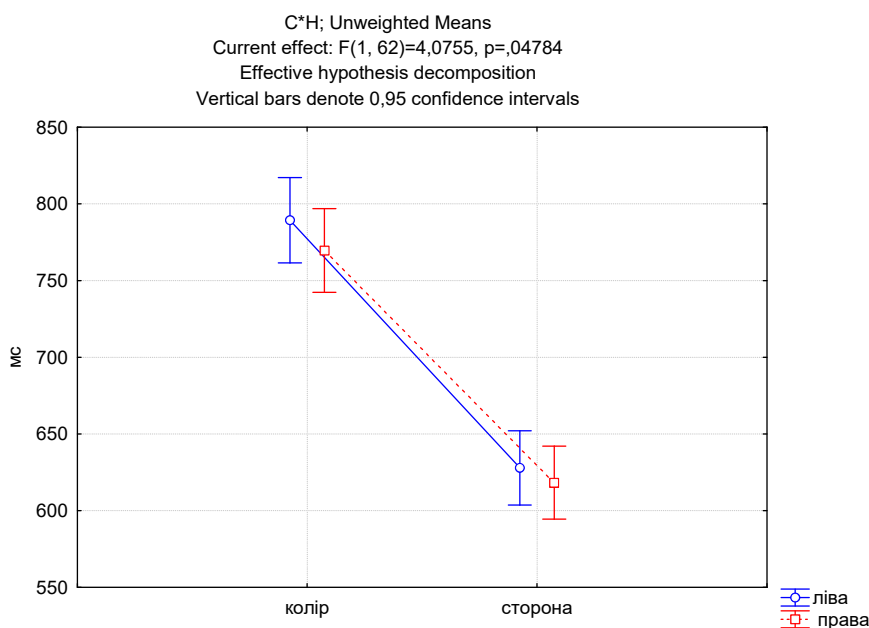


Рис. 2. Аналіз ANOVA латентних періодів реакції лівою і правою рукою у тестах із необхідністю диференціювати колір подразника або сторону пред'явлення подразника (n = 63)

Отримані результати можуть указувати на формування системи оброблення емоційної інформації у правій півкулі, тоді як ліва залучена до оброблення когнітивної інформації (виділення дистрактора, категоризація кольору стимула). Усе більше досліджень свідчать на користь асиметричного перенесення інформації між двома півкулями [2, 7].

Отримано ефект взаємодії між типом тесту (з дистрактором / без дистрактора), типом завдання

(копір/сторона) і типом подразника (нейтральний/емоційний) $F(1, 62) = 5,2704$, $p = 0,02509$, $\eta^2 = 0,078$, за яким відмінності у ЛП реакціях на емоційні та нейтральні стимули (емоційний ефект Струпа) особливо виражені при виконанні найскладнішого завдання із використанням гальмівного подразника та необхідністю диференціації кольору подразника (рис. 3).

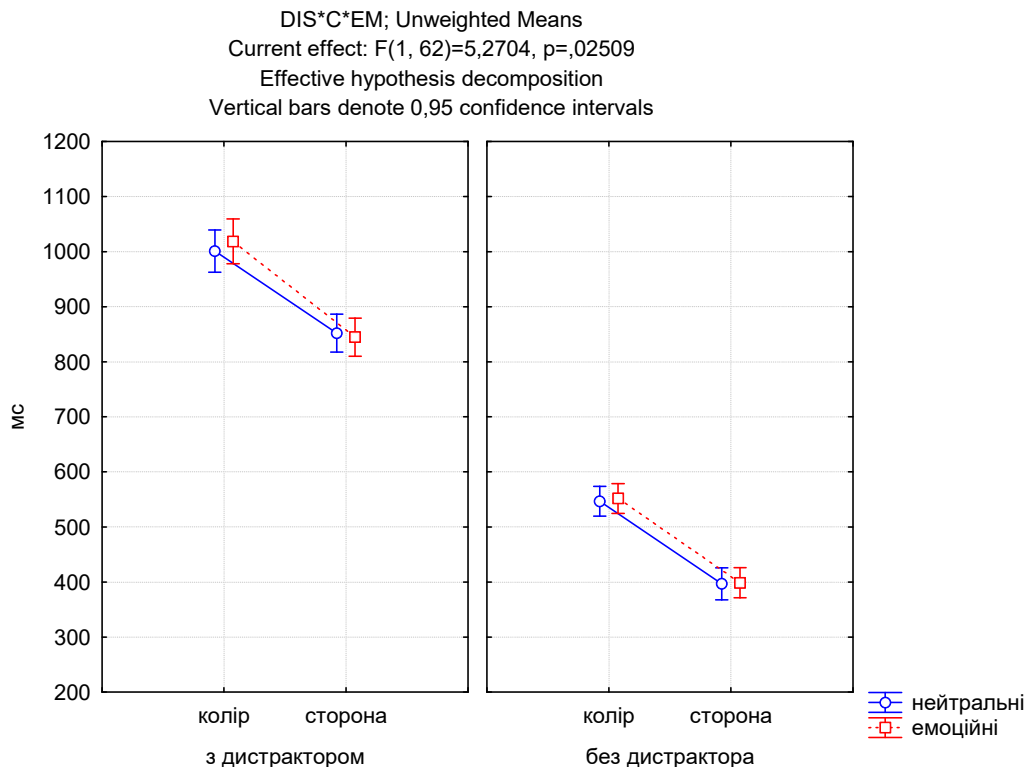


Рис. 3. Аналіз ANOVA латентних періодів реакції на нейтральні та емоційні слова у тестах із використанням або без використання дистрактора (гальмівного подразника) і необхідністю диференціювати колір подразника або сторону пред'явлення подразника ($n = 63$)

Мозок відстежує емоційну інформацію, що виявляється у загальному сповільненні оброблення стимулів при включенні в них емоційних слів.

Висновки. Емоційні слова обробляються довше, ніж нейтральні, що найкраще виявляється при виконанні важкого завдання – з дистрактором і необхідністю диференціювати колір. У випадку виконання завдання зі значним когнітивним навантаженням ліва рука реагує на емоційні стимули довше, ніж права. Отримані результати можуть указувати на формування особливої системи оброблення емоційної інформації у правій півкулі, тоді як ліва півкуля зосереджена на виконанні когнітивного завдання. Імовірно, що у випадку посилення когнітивного контролю підсистеми оброблення емоційної та когнітивної інформації працюють відносно автономно, міжпівкульна взаємодія посилюється, а асиметрія зменшується. Зі зменшенням когнітивного тиску зростає функціональна асиметрія, імовірно, зменшується функціональна взаємодія, а емоційний ефект Струпа не виявляється.

Список використаних джерел:

1. Костенко С. С. Тест для оцінки явища інтерференції під час обробки нерелевантних емоційно значущих стимулів / С. С. Костенко, В. І. Кравченко, М. Ю. Макачук // Науковий вісник Волинського універ-

ситету імені Лесі Українки. Серія "Біологічні науки". – 2008. – Вип. 3. – С. 70-73.

2. Куценко Т. В. Міжпівкульне перенесення інформації при виконанні складного тесту Струпа із залученням просторової ознаки у правшів і лівшів / Т. В. Куценко // Вісник Черкаського університету. Серія "Біологічні науки". – 2017. – № 1. – С. 37-47.

3. Algom D. A rational look at the emotional Stroop phenomenon: A generic slowdown, not a Stroop effect / D. Algom, E. Chajut, S. Lev // Journal of Experimental Psychology: General. – 2004. – 133(3). – P. 323-338.

4. The emotional Stroop task: assessing cognitive performance under exposure to emotional content / M. S. Ben-Haim, P. Williams, Z. Howard et al. // J. Vis. Exp. – 2016. – 112. – e53720.

5. Boyson A. The effect of age on interhemispheric transfer time: an event related potential study / A. Boyson // The Plymouth Student Scientist. – 2013. – 6(2). – P. 78-97.

6. Paying attention to emotion: An fMRI investigation of cognitive and emotional Stroop tasks / R. J. Compton, M. T. Banich, A. Mohanty et al. // Cognitive, affective, and behavioural neuroscience. – 2003. – 3(2). – P. 81-96.

7. Erbil N. Connectivity measures in the Poffenberger paradigm indicate hemispheric asymmetries / N. Erbil, S. Yagcioglu // Functional Neurology. – 2016. – 31(4). – P. 249-256.

8. Geukes S. Stroop effects from newly learned color words: effects of memory consolidation and episodic context / S. Geukes, M. G. Gaskell, P. Zwitserlood // Frontiers in Psychology. – 2015. – Vol. 6, № 278. – P. 1-16.

9. MacLeod C. M. Half a century of research on the Stroop effect: an integrative review / C. M. MacLeod // Psychological Bulletin. – 1991. – Vol. 101, № 2. – P. 163-203.

10. Rosenfeld J. Peter (Editor) Detecting concealed information and deception: recent developments / J. Peter Rosenfeld (Editor) // Academic Press; 1 edition. – 2018. – 396 p.

References (Scopus):

1. Kostenko S. S., Kravchenko V. I., Makarchuk M. Yu. Test dlya otsinky yavlyshcha interferentsiyi pid chas obrobky nerelevantnykh emotsiyno znachushchykh stymuliv [A test for evaluating the phenomenon of interference during the processing of irrelevant emotionally significant stimuli]. Scientific Bulletin of the Volyn University named after Lesya Ukrainka. Series "Biological Sciences". 2008; 3: P. 70-73. Ukrainian.
2. Kutsenko T. Mizhpivkul'ne perenesennya informatsiyi pry vykonanni skladnoho testu Strupa iz zaluchennyam prostorovoyi oznaky u pravshiv i livshiv [Interhemispheric transfer of information in performance of complex Stroop test involving spatial properties by right- and left-handers]. Bulletin of Cherkasy university. Biological Sciences Series. 2017; 1:P.37-47. Ukrainian.
3. Algom D., Chajut E., Lev S. A rational look at the emotional Stroop phenomenon: A generic slowdown, not a Stroop effect. Journal of Experimental Psychology: General. 2004; 133(3): 323-338.
4. Ben-Haim M. S., Williams P., Howard Z., Mama Y., Eidels A., Algom D. The emotional Stroop task: assessing cognitive performance under exposure to emotional content. J. Vis. Exp. 2016; 112: e53720, doi:10.3791/53720.
5. Boyson A. The effect of age on interhemispheric transfer time: an event related potential study. The Plymouth Student Scientist. 2013; 6(2): 78-97.

6. Compton R. J., Banich M. T., Mohanty A., Milham M. P., Herrington J., Miller G. A. et al. Paying attention to emotion: An fMRI investigation of cognitive and emotional Stroop tasks. Cognitive, affective, and behavioural neuroscience. 2003; 3(2): P. 81-96.
7. Erbil N., Yagcioglu S. Connectivity measures in the Poffenberger paradigm indicate hemispheric asymmetries. Functional Neurology. 2016; 31(4): 249-256.
8. Geukes S. Stroop effects from newly learned color words: effects of memory consolidation and episodic context. Frontiers in Psychology. 2015. 6 (278): 1-16.
9. MacLeod C. M. Half a century of research on the Stroop effect: an integrative review. Psychological Bulletin. 1991; 101(2): 163-203.
10. Rosenfeld J. Peter (Editor) Detecting concealed information and deception: recent developments. Academic Press, 1 edition. 2018: 396.

Надійшла до редколегії 20.01.2019

Отримано виправлений варіант 21.02.2019

Підписано до друку 21.02.2019

Received in the editorial 20.01.2019

Received a revised version on 21.02.2019

Signed in the press on 21.02.2019

Т. Куценко, канд. біол. наук, доц.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ВЛИЯНИЕ КОГНИТИВНОЙ НАГРУЗКИ НА ПРОЯВЛЕНИЕ ЭМОЦИОНАЛЬНОГО ЭФФЕКТА СТРУПА

Эмоциональный эффект Струпа (ЭЭС) является результатом большей задержки при назывании цвета, которым написаны эмоциональные слова, чем цвета, которым написаны нейтральные слова, за счет переключения внимания на эмоционально значимую информацию. ЭЭС преимущественно применяется в обследованиях психопатологий, но перспективным является его использование и для решения прикладных психофизиологических задач, от профессионального отбора и нейромаркетинга до детекции лжи и выявления угроз со стороны эмоционально нестабильных индивидов. Поскольку ЭЭС чувствителен к условиям тестирования, то исследовались различные модификации эмоционального теста Струпа (ЕТС). В рамках субтестов предъявлялись нейтральные и эмоциональные (с негативной окраской) слова. Включение в субтесты дистракторов (тормозных слов, названий растений и животных, на которые не нужно реагировать нажатием клавиш) затрудняет выполнение задачи, проявляется в значительном удлинении времени реакции. В случае выполнения задания со значительной когнитивной нагрузкой левая рука реагирует на эмоциональные стимулы дольше, чем правая. Полученные результаты могут указывать на формирование особой системы обработки эмоциональной информации в правом полушарии, тогда как левое полушарие сосредоточено на выполнении когнитивной задачи. Вероятно, что в случае усиления когнитивного контроля подсистемы обработки эмоциональной и когнитивной информации работают относительно автономно, межполушарное взаимодействие усиливается, а функциональная асимметрия уменьшается. С уменьшением когнитивного давления возрастает функциональная асимметрия, вероятно, уменьшается межполушарное взаимодействие, а ЭЭС не обнаруживается. Полученные величины латентных периодов реакции на эмоционально значимые и нейтральные раздражители могут быть использованы для разработки шкал и критериев оценки эмоциональных реакций человека при необходимости их обнаружения.

Ключевые слова: эмоциональный эффект Струпа, латентные периоды реакции, межполушарная асимметрия, метаконтроль.

T. Kutsenko, Ph.D.

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,

INFLUENCE OF COGNITIVE LOAD ON THE EXPRESSION OF THE EMOTIONAL STROOP EFFECT

The Emotional Stroop Effect (ESE) is the result of a greater delay in naming colours of written emotional words than colours of written neutral words, because of shifting attention to emotionally meaningful information. ESE is mainly used in psychopathology surveys, but its application is also promising for solving applied psychophysiological problems, from professional screening and neuromarketing to detecting lies and detecting threats from emotionally unstable individuals. Because the ESE is sensitive to testing conditions, various modifications to the Emotional Stroop Test (EST) have been investigated. Within the subtests, neutral and emotional (negatively coloured) words were presented. The inclusion of distractors in subtests (target words, names of plants and animals that were not required to be answered by keystrokes) complicates the task, which manifests itself in a considerable extension of the reaction time. When performing a task with significant cognitive load, the left hand responds to emotional stimuli longer than the right. The results obtained may indicate the formation of a special system for processing emotional information in the right hemisphere, while the left hemisphere focuses on the cognitive task. It is likely that in the case of increased cognitive load, the subsystems for processing emotional and cognitive information operate relatively autonomously, inter-hemispheric interaction is enhanced, and functional asymmetry is reduced. As cognitive pressure decreases, functional asymmetry is likely to increase inter-hemispheric interaction, and ESE is not detected. The obtained values of latent periods of reaction to emotionally significant and neutral stimuli can be used to develop scales and criteria for evaluating a person's emotional reactions when it is needed.

Keywords: emotional Stroop effect, latent periods of reaction, hemispheric asymmetry, metacontrol.

УДК 612.35:616.36

DOI: https://doi.org/10.17721/1728_2748.2020.80.35-40

В. Кравченко, канд. біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
К. Демидова, канд. біол. наук
Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Київ, Україна

ВАРІАТИВНІСТЬ СЕРЦЕВОГО РИТМУ ПРИ ПЕРЕГЛЯДІ ЕМОЦІЙНО ЗАБАРВЛЕНИХ ЗОБРАЖЕНЬ У ЖІНОК У РІЗНІ ФАЗИ МЕНСТРУАЛЬНОГО ЦИКЛУ

Досліджено особливості динаміки спектральних показників варіативності серцевого ритму та частоти дихання у 32 жінок 17–23 років при перегляді емоційних зображень IAPS (International affective picture system) у різні фази менструального циклу. Показано, що відмінності в регуляції серцевого ритму, пов'язані з переглядом емоційних зображень різного типу, виявляються переважно у фолікулярну фазу циклу. У цей період значущі відмінності при перегляді емоційних зображень різного типу виявлялися в абсолютній і відносній потужності дуже низько- (VLF) та високочастотного (HF) компонентів спектра. У фазу овуляції чутливим до типу емоцій маркером була потужність низькочастотного компонента спектра (LF), що відображає вплив симпатичного відділу нервової системи на серцевий ритм. Найбільше значення цей показник мав при перегляді неприємних зображень порівняно з приємними й еротичними візуальними стимулами. Внесок симпатичного відділу в регуляцію серцевого ритму виявлявся при перегляді негативних і нейтральних зображень, і лише перегляд зображень еротичного характеру характеризувався зростанням парасимпатичної активності, що виявлялась у збільшенні потужності високочастотного компонента спектра HF, зниженні частки LF/HF і частоти дихання. Показано, що впродовж менструального циклу вегетативний баланс зсувається в бік переважання симпатичного регулювання серцевого ритму, яке досягає максимуму в лютеїнову фазу. У зв'язку з цим ступінь активності симпатичної ланки, яку реєстрували за потужністю низькочастотного компонента LF під час перегляду неприємних зображень, була найменшою у фолікулярну фазу, а найбільшою – у лютеїнову. Не виявлено значущих відмінностей між спектральними показниками варіативності кардіоінтервалів під час перегляду емоційних зображень у лютеїнову фазу, що свідчить про малу інформативність цього періоду циклу для оцінювання особливостей емоційного реагування жінок на основі аналізу серцевого ритму.

Ключові слова: фази менструального циклу, зображення IAPS, емоції, варіативність серцевого ритму, вегетативний баланс.

Вступ. Аналіз варіабельності серцевого ритму (BCR) є відносно нескладним інструментом оцінювання функціонального стану людини, який сьогодні застосовують у різних сферах, від моніторингу розвитку стресорного стану на виробництві [1] до використання показників BCR як індикаторів розвитку емоцій різного знаку [2]. Популярності цей метод набув завдяки тому, що, отримавши запис послідовності кардіоінтервалів з одного відведення ЕКГ та застосувавши комп'ютеризовані алгоритми математичного аналізу тривалості R-R-інтервалів, можна дослідити взаємодію нервових і гуморальних впливів на серцевий ритм, що за грамотної інтерпретації дає можливість зазирнути в поточний функціональний стан та оцінити ступінь психоемоційної напруги обстежуваного. Ускладнює використання показників BCR те, що в сучасній літературі зустрічаються до 30 різних показників, розрахованих на основі тривалостей кардіоінтервалів, багато з яких дублюють одне одного. Тому актуальним є порівняти, які з показників BCR є більш чутливими до станів, що виникають при перегляді емоційно забарвленого матеріалу для того, щоб надалі використовувати їх першочергово. Відомо, що BCR синхронізована з ритмом дихання, що виявляється в явищі респіраторної синусної аритмії – вкороченні R-R-інтервалу на виходу та подовженні на виходу. Зростання дихальної синусної аритмії розглядається як один з показників тону блукаючого нерва, хоча механізми цього явища не однорідні [3]. Зміни частоти дихання модулюють вираженість BCR і також залежать від рівня уваги та емоційного збудження, тому оцінювання цього простого показника може дати додаткову інформацію щодо психоемоційного стану людини, особливо в інтерпретації разом із показниками BCR.

Ще одне питання, якому не приділяється увага при проведенні досліджень за участю жінок, полягає в неврахуванні можливих відмінностей показників, зумовлених гормональними коливаннями впродовж менструального циклу. Зазвичай фаза циклу не контролюється дослідниками, хоча дані літератури переконливо свідчать про існування фазових відмінностей як у когнітивній, так і емоційній сферах. Відомо, що зміни рівня

статевих гормонів у жінок впродовж менструального циклу впливають на характер їхнього реагування як на біологічно, так і соціально важливі подразники [4, 5] і здатні суттєво змінювати рівень тривожності, больову чутливість та практично всі когнітивні функції, включаючи здатність до навчання, пам'ять, рівень уваги тощо [6, 8]. Це пояснюється тим, що статеві гормони, діючи на специфічні до них рецептори у мигдалині, гіпоталамусі, гіпокампі, передній поясній звивині, здатні через геномні й негеномні механізми змінювати функціональний стан цих підкоркових структур, які, у свою чергу, здатні змінювати функціональну активність різних ділянок кори [4, 7, 8]. Важливим є також те, що підкоркові структури, які є мішенями для статевих гормонів, утворюють у мозкові систему формування емоційних відповідей на будь-які подразники [9]. На тлі флуктуації статевих гормонів впродовж менструального циклу змінюється функціональний стан цих структур, у результаті чого ті самі подразники в різні фази менструального циклу сприймаються по-різному. Завданням роботи було дослідити особливості варіативності серцевого ритму та частоти дихання жінок при сприйнятті емоційних стимулів у різні фази менструального циклу за показниками спектрального аналізу BCR і виявити найбільш чутливі до емоційних сигналів маркери серцевого ритму.

Матеріали та методи. В експериментах обстежували брали участь 32 студентки Київського національного університету імені Тараса Шевченка віком від 17 до 23 років. Усі обстежувані були здорові, тобто на момент дослідження не вживали ліків, не хворіли на неврологічні чи психічні захворювання. Жінки, що брали участь у експериментах, мали регулярний впродовж року менструальний цикл тривалістю 27–35 днів та не вживали гормональні протизаплідні препарати. Кожна обстежувана жінка брала участь у дослідженні тричі: у фолікулярну фазу (2–4 день циклу); фазу овуляції (12–16 день циклу) та у лютеїнову фазу менструального циклу (21–25 день циклу). Наявність і час овуляції у кожної з обстежуваних оцінювали за характером кристалізації слини при використанні тест-мікроскопа "Арбор" (реєстраційне свідоцтво МЗ України № 817/2002).

Метод заснований на тому, що під час овуляції, коли концентрація естрогенів у крові жінки стає максимальною, у слині під мікроскопом виявляється кристалізація у вигляді характерних "листіків папороті". У представленому дослідженні жінки перший раз брали участь у тестуванні у різні фази циклу. Так, у фолікулярну фазу вперше брали участь у дослідженні 12 жінок, вдруге – 8, втретє – 12 жінок; у фазу овуляції вперше – 11 жінок, вдруге – 13, втретє – 8 жінок; у лютеїнову фазу вперше – 9 жінок, вдруге – 11, втретє – 12 жінок. Випадковий вибір першого разу тестування був спрямований на зменшення впливу на результати дослідження особливостей реагування при повторних тестуваннях.

У всіх учасників експериментів упродовж кожного обстеження реєстрували ЕКГ і пневмограму за схемою: у стані спокою (закриті очі) – 3,5 хв; при пред'явленні на екрані монітора комп'ютера серії зображень, що здатні викликати позитивні емоції – 1,5 хв; при пред'явленні нейтральних стимулів – 1,5 хв; при пред'явленні зображень еротичного характеру – 1,5 хв; при пред'явленні зображень, що здатні викликати негативні емоції – 1,5 хв; у стані спокою (закриті очі) – 3,5 хв. Перед першою та між кожною наступною серією пред'явлень зображень із позитивним, негативним, еротичним чи нейтральним змістом реєстрували ЕКГ і пневмограму (1,5 хв) при пред'явленні серії беззмістовних зображень сірого кольору двох типів, які по чергово змінювали одне одного.

Як стимульний матеріал використовувалися фотографії Міжнародної системи афективних зображень (IAPS) [10]. Із цього ряду зображень були відібрані чотири групи стимулів: нейтральні, позитивні, негативні та еротичні. Перші три групи були відібрані за нормативними значеннями оцінки емоцій у жінок за 9-бальною шкалою рівня приємності, що для нейтральних зображень становили 4,5 – 5,5 балів, для позитивних – більше 7,6 балів, для негативних – менше 2,0 балів. З кожної групи було сформовано по 3 різні набори стимулів (по 15 зображень) для послідовних етапів дослідження, які містили однакову кількість зображень з певної тематики. Час пред'явлення окремого зображення (фотографії) в серії становив 6 с.

Для дослідження варіативності серцевого ритму (BCP) реєстрували кардіограму в передньому відведенні по Небу за допомогою діагностичного комплексу "Полі-Спектр". Обробка ЕКГ проводилася з використанням програми "Полі-Спектр" та модуля аналізу варіативності ритму серця "Полі-Спектр-Ритм". Математична обробка масиву кардіоінтервалів у вказаній програмі відповідає рекомендаціям стандарту "Варіабельність ритму серця. Стандарт вимірювання, фізіологічної інтерпретації і клінічного використання", що прийнятий у 1996 році групою експертів Європейського кардіологічного товариства і Північноамериканського товариства електростимуляції і електрофізіології [11].

Аналізу підлягали показники статистичного (часового) аналізу кардіоінтервалів: середня тривалість так званих "нормальних" (normal-normal чи NN) інтервалів R-R (RRNN, мс), тобто всіх кардіоінтервалів, крім екстрасистол і компенсаторних пауз, що слідують за ними. Вивчалися показники спектрального (частотного) аналізу: TP (мс2) – повна потужність спектра коливань серцевого ритму, HF (мс2) – потужність спектра серцевого ритму в області високих частот (0,15–0,4 Гц), LF (мс2) – потужність спектра серцевого ритму в області низьких частот (0,04–0,15 Гц), VLF (мс2) – потужність спектра серцевого ритму в області "дуже" низьких частот (0,003–0,04 Гц), LF/HF – співвідношення потужностей спектра серцевого ритму в області низьких і високих частот. Крім абсолютних потужностей, визначалися також відносні значення зазначених спектральних компонентів (HF %; LF %; VLF %).

Статистичний аналіз проводився за допомогою пакету STATISTICA 10.0 (Statsoft, USA, 2011). Для опису вибіркового розподілу вказували медіани та міжквартильний розкид (Me [25 %; 75 %]). При порівнянні залежних вибірок застосовували критерій Фрідмана для дисперсійного аналізу повторних вимірів, після чого використовували непараметричний Т-критерій знакових рангів Вілкоксона. Для порівняння незалежних вибірок використовували критерій Манна – Уїтні. Критичний рівень значущості міжгрупових відмінностей при перевірці статистичної гіпотези приймався рівним $p = 0,05$ у випадку парних порівнянь і $p = 0,0085$ з урахуванням поправки Бонфероні для множинних порівнянь.

Результати та їх обговорення. У науковій літературі з використанням аналізу BCP зустрічаються до 30 різних показників, розрахованих на основі тривалостей кардіоінтервалів. Ми намагалися з'ясувати, які з них найбільш інформативні для оцінювання емоційних станів, щоб звужити коло потенційних параметрів для подальшого аналізу. У цій роботі ми представляємо фрагмент аналізу спектральних показників серцевого ритму, які дозволяють на основі швидкого перетворення Фур'є виділити кілька частотних складових із сумарної ритмограми. Так, загальна потужність спектра (total power, TP) складається із трьох частотних діапазонів, а саме: дуже низькочастотного (VLF) із межами від 0 до 0,04 Гц, низькочастотного (LF) із межами від 0,04 до 0,15 Гц та високочастотного (HF) із межами від 0,15 до 0,4 Гц. Згідно із сучасними уявленнями про регуляцію серцевого ритму кожен із цих компонентів спектрограми відображає внесок різних відділів АНС у його регуляцію [12]. Посилення потужності VLF інтерпретують як активність надсегментарних відділів, зокрема гіпоталамо-гіфозарно-надниркової осі, і розглядають як маркер психоемоційного напруження різного ґенезу. Збільшення потужності низькочастотної складової LF інтерпретують як внесок симпатичного відділу АНС у регуляцію серцевого ритму [13], а збільшення частки високочастотних коливань HF відображає збільшення тону парасимпатичної системи, притаманного розслабленому стану. Крім того, на варіативність серцевого ритму великий вплив має патерн дихання, тому ми включили до аналізу показники, що характеризують стан цієї системи як потенційно чутливого індикатора зміни емоційного стану.

Для виявлення чутливих до емоційного збудження маркерів серцевого ритму ми перевірили, чи відрізняються спектральні показники BCP під час візуального сприйняття емоційно забарвлених зображень різного ступеня приємності та активації. Для відповіді на це питання було проведено дисперсійний аналіз повторних вимірів за непараметричним критерієм Фрідмана спектральних показників, отриманих при перегляді чотирьох типів афективних зображень із картотеки IAPS (приємні, нейтральні, еротичні, аверсивні), що дозволяє виявити наявність статистично значущої різниці у значеннях показника BCP на чотирьох згаданих етапах. Було проаналізовано наявність чи відсутність різниці показників при перегляді зображень у різні фази менструального циклу обстежуваних. Результати аналізу представлено в табл. 1 у третій колонці. Перше, що привертає увагу, це те, що більшість відмінностей спектральних показників виявлялася при перегляді зображень IAPS обстежуваними у фолікулярній фазі менструального циклу. Як видно з представлених даних, у фолікулярну фазу значущі відмінності між етапами виявлялись у всіх показниках BCP, окрім загальної потужності спектра TP. Найбільш чутливим до типу презентованих зображень виявився діапазон "дуже" низьких частот VLF, як абсолютна, так і відносна його потужність. Відносна потужність "дуже" низьких частот була значуще нижча при перегляді жінками еротичних зображень порівняно з позитивними,

негативними та з меншим рівнем значущості ($p = 0,04$) нейтральних стимулів. Цей показник зазвичай інтерпретується як відображення центральних надсегментарних

впливів на серцевий ритм, і при сприйнятті еротичних стимулів центральна регуляція серцевого ритму в обстежуваних послаблювалася.

Таблиця 1. Показники спектрального аналізу варіативності серцевого ритму та частоти дихання в жінок під час пред'явлення зображень IAPS у різні фази менструального циклу, медіана (25 %; 75 %), $n = 32$

Показник	Фаза циклу	Критерій Фрідмана χ^2	Позитивні стимули	Нейтральні стимули	Еротичні стимули	Негативні стимули
TP, мс ²	Фолікулярна	4,200000 $p = 0,24066$	3647 (2205; 4753)	3693 (2582; 5012)	2909 (2466; 4986)	3868 (2683; 5834)
	Овуляція	4,312500 $p = 0,22964$	2979 (2113; 5442)	4004 (1961; 6606)	3548 (2614; 4506)	3713 (2530; 7229)
	Лютеїнова	4,480000 $p = 0,21408$	3153 * (2063; 4491)	3455 (2234; 4504)	2983 (2006; 4964)	4314 (3082; 6025)
VLF, мс ²	Фолікулярна	10,23871 $p = 0,01664$	788* (441; 1183) [Er $p=0,007$]	768* (447; 1439) [Er $p=0,017$]	535* (195; 993) [П, Н, А]	895* (492; 1862) [Er $p=0,002$]
	Овуляція	1,425000 $p = 0,69969$	965 (557; 1552)	631 (286; 1636)	598 (318; 1368)	723 (529; 1253)
	Лютеїнова	1,012500 $p = 0,79823$	463 (310; 1167)	857 (345; 1295)	556 (338; 1347)	908 (349; 2081)
VLF, %	Фолікулярна	10,76699 $p = 0,01306$	29* (17; 36) [Er $p=0,001$]	25* (17; 37) [Er $p=0,04$]	20* (9; 31) [П, Н, А]	31* (18; 43) [Er $p=0,004$]
	Овуляція	1,387500 $p = 0,70847$	33 (11; 49)	20 (11; 44)	21 (11; 38)	24 (12; 39)
	Лютеїнова	1,081505 $p = 0,78154$	23 (13; 29)	28 (16; 38)	20 (12; 37)	26 (14; 38)
LF, мс ²	Фолікулярна	4,238710 $p = 0,23682$	964 (460; 1246)	1098 (701; 1660)	776 (443; 1222)	866 (506; 1455)
	Овуляція	9,000000 $p = 0,02929$	749* (437; 1271) [A $p=0,0016$]	977 (641; 2027)	900* (533; 1217) [A $p=0,0009$]	1289* (728; 2185) [Е, П]
	Лютеїнова	4,462500 $p = 0,21566$	775 (535; 1204)	989 (555; 1483)	795 (675; 1583)	1473 (596; 1894)
LF, %	Фолікулярна	3,116129 $p = 0,37407$	27 (17; 32)	31 (25; 35)	26 (17; 32)	25 \$ # (16; 32)
	Овуляція	8,437500 $p = 0,03779$	26* (17; 31) [H $p=0,018$] [A $p=0,01$]	34* (20; 43) [П]	25* (19; 34) [A $p=0,025$]	29* (24; 41) [Er]
	Лютеїнова	2,212500 $p = 0,52949$	29 (21; 37)	31 (24; 39)	32 (24; 38)	32 (24; 42)
HF, мс ²	Фолікулярна	10,27742 $p = 0,01635$	1228 (883; 2259)	1730* (722; 2239) [Er $p=0,011$] [A $p=0,03$]	1487* (837; 2584) [H]	1329* (889; 2570) [H]
	Овуляція	3,865204 $p = 0,27639$	1134 (661; 1949)	1287 (583; 2207)	1276 (808; 2482)	1124 (789; 2160)
	Лютеїнова	1,950000 $p = 0,58285$	1547 (752; 2039)	1152 (752; 1685)	1342 (776; 1936)	1379 (927; 2529)
HF, %	Фолікулярна	9,077419 $p = 0,02828$	48* (39; 54) [Er $p=0,04$]	43* (27; 55) [Er $p=0,003$]	49* (37; 63) [Av $p=0,007$]	42* (31; 50) [Er $p=0,007$]
	Овуляція	2,040752 $p = 0,56399$	39 (23; 64)	34 (20; 53)	47 (28; 65)	39 (22; 52)
	Лютеїнова	3,282132 $p = 0,35014$	46 (36; 61)	38 (25; 53)	44 (29; 59)	39 (27; 51)
LF/HF	Фолікулярна	7,683871 $p = 0,05302$	0,56 (0,41; 0,79)	0,64* (0,51; 1,32) [Er $p=0,004$]	0,48* (0,31; 0,81) [А, Н]	0,60 * \$ (0,38; 0,97) [Er $p=0,036$]
	Овуляція	6,225000 $p = 0,10116$	0,64 (0,35; 1,05)	1,05 (0,37; 1,54)	0,56 (0,33; 1,19)	0,80 (0,52; 1,73)
	Лютеїнова	5,962500 $p = 0,11345$	0,67 (0,40; 1,05)	0,78 (0,51; 1,55)	0,63 (0,48; 1,37)	0,86 (0,55; 1,51)
Частота дихальних рухів, /хв	Фолікулярна	11,75486 $p = 0,00827$	18* (17; 19) [Er $p=0,02$]	18* (16; 19) [Er $p=0,01$]	17* (16; 18) [П, Н, А]	18* (16; 20) [Er $p=0,02$]
	Овуляція	10,10000 $p = 0,01774$	18* (17; 19) [Er $p=0,009$]	17 (16; 20) [Er $p=0,011$]	17* (15; 19) [П, Н]	18 (16; 19)
	Лютеїнова	3,472340 $p = 0,32437$	18 (16; 19)	17 (16; 18)	17 (16; 19)	18 (16; 19)

Примітки: * – значущі відмінності щодо іншого типу зображень у ту ж фазу циклу (рівень значущості та тип указані у квадратних дужках і виділені жирним шрифтом);

\$ – значущі відмінності при перегляді однотипних зображень між фолікулярною фазою і овуляцією ($p < 0,05$);

– значущі відмінності при перегляді однотипних зображень між фолікулярною та лютеїновою фазами ($p < 0,05$);

А – аверсивні (негативні), Ер – еротичні, П – позитивні, Н – нейтральні.

Поряд із цим у низько- та високочастотному діапазоні спектра також фіксувались значущі відмінності між різними типами зображень. При попарному порівнянні між різними зображеннями з'ясувалось, що спектральні показники BCP відрізняються від усіх інших типів зображень при перегляді еротичних стимулів: за цих умов реєстрували найменшу абсолютну та відносну потужність VLF діапазону, найвищу відносну потужність високочастотної складової (HF %) та найменшу частку LF/HF порівняно з нейтральними та негативними зображеннями. Це означає, що під час перегляду еротичних зображень у обстежуваних переважали парасимпатичні впливи на серцевий ритм і напруження було мінімальним.

Під час овуляції також було виявлено статистично значущі відмінності, але лише для низькочастотної складової спектра LF. Абсолютна потужність LF була максимальною при перегляді аверсивних зображень, значущі відмінності зареєстровано порівняно з переглядом позитивних та еротичних стимулів. Відносна потужність низькочастотного компонента LF % мала тенденцію до значущих відмінностей (зважаючи на множинні порівняння чотирьох різних стимулів, рівень p приймався за 0,008, а не 0,05) – була менше при перегляді позитивних зображень порівняно з нейтральними та негативними, а при перегляді еротичних була нижче, ніж при аверсивних. Зважаючи, що LF відображає внесок симпатичного відділу в регуляцію серцевого ритму, можемо зробити висновок, що у фазу овуляції жінки сильніше реагують на неприємні зображення активацією симпатоадреналової системи порівняно з іншими фазами.

Привертають увагу зміни спектральних показників BCP при перегляді зображень еротичного характеру, чітко виражені у фолікулярну та меншою мірою – у овуляторну фазу. Зважаючи на специфіку таких стимулів та їх здатність викликати сексуальне збудження, ми очікували найбільш виражені автономні реакції на ці подразники саме у фолікулярну фазу, коли зростає ймовірність запліднення. У літературі показано, що у фолікулярну фазу виявляють збільшену активність у мозкових структурах, а саме орбітофронтальній корі, при перегляді фото привабливих чоловіків [19]. Також досліджено, що амплітуда компонента викликаних потенціалів, що пов'язана з реакцією на стимули сексуального змісту, пропорційна до рівня естрогену в слині [21]. В іншому дослідженні було продемонстровано, що під час перегляду аудіовізуального сексуального контенту в жінок зростає рівень естрогену і тестостерону, причому зростання естрогену був найбільший у фолікулярну фазу [20]. Зважаючи, що естрогени впливають на активність структур гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової системи, здійснюючи анксиолітичний вплив [17], це також пояснює зниження симпатичної активності при перегляді еротичних зображень у фолікулярну фазу циклу.

Щодо лютеїнової фази, то вона виявилась найменш інформативною для оцінювання впливу емоційного контенту – згідно із критерієм Фрідмана, жоден показник статистично значуще не відрізнявся при перегляді зображень різного типу в цю фазу. Якби всі обстежувані проходили процедуру експерименту за схемою: перший етап – фолікулярна фаза, другий етап – овуляція, третій етап – лютеїнова фаза, то можна було б припустити, що відсутність відмінностей спектральних показників BCP пояснюється мінімальною новизною обстановки обстеження, що веде до

зниження напруги регуляторних систем. Але дизайн експерименту був інакший, обстежувані проходили експеримент уперше незалежно від того, яка саме фаза менструального циклу в них фіксувалась, тобто третина жінок мала перше тестування саме під час лютеїнової фази. Тому пояснення відсутності значущих відмінностей при перегляді емоційно забарвлених зображень у лютеїнову фазу слід шукати у специфіці мозкових реакцій на тлі високого рівня в цей період прогестерону. Як показано в дослідженні [16], характер реагування на емоційні сигнали та рівень активності ключових мозкових структур на них відрізняється в різні фази циклу. Авторами була продемонстрована більша активація головного мозку при перегляді негативних зображень у фолікулярну фазу порівняно з лютеїною, зокрема сильнішу активацію мигдалини і краще розпізнавання емоцій у фолікулярну фазу, а також негативні кореляції рівня прогестерону і відповідей мигдалини на загрози, сумні й нейтральні обличчя. Розглянутий у еволюційному контексті, такий вплив рівня гормонів на емоційну обробку, на думку вчених, може створювати можливість для більшої чутливості жінок до соціальних стимулів під час фолікулярної фази, що полегшує соціальні взаємодії, які зазвичай передують реалізації статевої поведінки. Проте в даному дослідженні не вивчалися емоційні процеси під час овуляції.

Порівняння показників BCP при перегляді однотипних зображень IAPS у різні фази циклу виявило значущі відмінності лише при перегляді зображень з негативним змістом (комірки в таблиці відмічені сірим кольором). Зокрема, співвідношення потужностей низько- та високочастотних компонентів спектра LF/HF при перегляді неприємних зображень було значуще меншим під час фолікулярної фази порівняно з овуляцією, що також підтверджує наше припущення щодо зсуву симпато-вагального балансу в бік переважання впливів симпатичної системи під час овуляції. Крім того, відносна потужність низькочастотного компонента спектра LF %, а отже, і активність симпатичного відділу, була більшою під час овуляції та лютеїнової фази циклу порівняно з фолікулярною під час перегляду зображень з негативною валентністю, у той час як при перегляді інших зображень відмінностей BCP між фазами не було виявлено. Це означає, що саме негативні емоційні стимули сприймалися жінками відмінно в різні фази циклу, і мінімальний рівень напруження на них був під час фолікулярної фази. На сьогодні накопичено чимало експериментальних підтверджень тому, що циркулюючі естрогени здійснюють регуляторний вплив на виділення гормонів гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової осі через естрогенові бета-рецептори, які експресуються в гіпоталамічних гормонпродукуючих нейронах [7], і на вивільнення норадреналіну в лобній корі. Вважається, що в такий спосіб здійснюється анксиолітичний вплив естрогенів, що полягає у зменшенні виділення норадреналіну і поведінкових реакцій, характерних для стрес-відповіді. Так, у роботі [17] саме в лютеїнову фазу спостерігалася найбільша стрес-індукована активність гіпоталамо-гіпофізарної осі. У наших дослідженнях [18] також було виявлено збільшений рівень симпатичної активності за показниками BCP у стані спокою саме в лютеїнову фазу менструального циклу. Тому можемо зробити висновок, що у фолікулярну фазу емоційні сигнали різного знаку краще розрізняються за вегетативними проявами, проте сприй-

няття негативних емоційних сигналів перебігає з меншою симпатичною активацією порівняно із другою половиною менструального циклу.

Таким чином, у нашій роботі було показано, що в різні фази менструального циклу чутливими до знаку емоційних стимулів є різні показники ВСР. У фолікулярну фазу значущі відмінності при перегляді емоційних зображень різного типу виявлялися в абсолютній та відносній потужності дуже низько- (VLF) та високочастотного (HF) компонентів спектра. У фазу овуляції чутливим до типу емоцій маркером була потужність низькочастотного компонента спектра (LF), що відображає вплив симпатичного відділу нервової системи на серцевий ритм. Найбільше значення цей показник мав при перегляді неприємних зображень порівняно з приємними й еротичними візуальними стимулами. У лютеїнову фазу жоден зі спектральних показників ВСР не відрізнявся при перегляді емоційних і нейтральних зображень, що свідчить про малу інформативність цього періоду для оцінювання емоційного впливу стимулів за спектральними показниками ВСР.

Висновки

1. Виявлені відмінності спектральних показників варіативності серцевого ритму та частоти дихання при перегляді емоційно забарвлених зображень різного типу жінками під час фолікулярної фази менструального циклу.

2. Перегляд еротичних зображень у фолікулярну фазу супроводжувався переважанням парасимпатичних впливів на серцевий ритм, а також меншою частотою дихання порівняно з переглядом позитивних і негативних зображень.

3. Аналіз показників ВСР свідчить про зсув вегетативного балансу в бік переважання симпатичного відділу в регуляції серцевого ритму в жінок у другій половині менструального циклу.

4. Перегляд зображень із негативним емоційним змістом супроводжується меншою активністю симпатичної нервової системи у фолікулярну фазу порівняно з іншими фазами менструального циклу.

5. У лютеїнову фазу менструального циклу відмінностей між спектральними показниками варіативності серцевого ритму під час перегляду емоційних зображень різного типу не відзначалося, що свідчить про малу інформативність цього періоду для аналізу особливостей реагування на емоційні сигнали на основі варіативності кардіоінтервалів.

Список використаних джерел:

- Low A. Heart rate variability: New perspectives on assessment of stress and health risk at the workplace / A. Low, R. McCraty // *Heart & Mind J.* – 2018. – Vol. 2(1). – P. 16-27.
- Shi H. Differences of Heart Rate Variability Between Happiness and Sadness Emotion States: A Pilot Study / H. Shi, L. Yang, L. Zhao // *J. Med. Biol. Eng.* – 2017. – Vol. 37. – P. 527.
- Yasuma F. Respiratory sinus arrhythmia: why does the heart beat synchronize with respiratory rhythm? / F. Yasuma, J. Hayano // *Chest.* – 2004. – Vol. 125(2). – P. 683-690.
- Hormonal cycle modulates arousal circuitry in women using functional magnetic resonance imaging / J. M. Goldstein, M. Jerram, R. Poldrack et al. // *J. Neurosci.* – 2005. – Vol. 25. – P. 9309-9316.
- Menstrual cycle phase modulates reward-related neural function in women / J. C. Dreher, P. J. Schmidt, P. Kohn et al. // *PNAS.* – 2007. – Vol. 104. – P. 2465-2470.
- Sherwin B. B. Estrogen and cognitive function in women / B. B. Sherwin // *Endocrine Reviews.* – 2003. – Vol. 24. – P. 133-151.
- Weiser M. J. Estrogen receptor beta in the brain: from form to function / M. J. Weiser, C. D. Foradori, R. J. Handa // *Brain research reviews.* – 2008. – Vol. 57. – P. 309-320.
- How progesterone impairs memory for biologically salient stimuli in healthy young women / G. van Wingen, F. van Broekhoven, R. J. Verkes et al. // *J. Neurosci.* – 2007. – Vol. 27. – P. 11416-11423.

9. Heilman K. M. The neurobiology of emotional experience / K. M. Heilman // *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* – 1997. – Vol. 9. – P. 439-448.

10. Lang P. J. International affective picture system (IAPS): Affective ratings of pictures and instruction manual / P. J. Lang, M. M. Bradley, B. N. Cuthbert. – NIMH Center for the Study of Emotion & Attention. University of Florida, 2005. – 9 p.

11. Heart rate variability. Standards of measurements, physiological interpretation, and clinical use. Task force of the European society of cardiology and the North American society of pacing and electrophysiology // *Eur. Heart J.* – 1996. – Vol. 17. – P. 354-381.

12. McCraty R. Heart rate variability: New perspectives on physiological mechanisms, assessment of self-regulatory capacity, and health risk / R. McCraty, F. Shaffer // *Glob Adv Health Med.* – Vol. 2015 (4). – P. 46-61.

13. The utility of low frequency heart rate variability as an index of sympathetic cardiac tone: A review with emphasis on a reanalysis of previous studies / G. A. Reyes del Paso, W. Langewitz, L. J. Mulder et al. // *Psychophysiology.* – Vol. 2013(50). – P. 477-87.

14. Influence of the menstrual cycle on nonlinear properties of heart rate variability in young women / X. Bai, J. Li, L. Zhou, X. Li // *Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol.* – 2009. – Vol. 297(2). – P. 765-774.

15. Brar T. Effect of Different Phases of Menstrual Cycle on Heart Rate Variability (HRV) / T. K. Brar, K. D. Singh, A. Kumar // *J. Clin Diagn Res.* – 2015. – Vol. 9(10). – CC01-CC4.

16. Facial emotion recognition and amygdala activation are associated with menstrual cycle phase / B. Derntl, C. Windischberger, S. Robinson et al. // *Psychoneuro endocrinology.* – 2008. – Vol. 33. – P. 1031-1040.

17. Impact of gender, menstrual cycle phase, and oral contraceptives on the activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis / C. Kirschbaum, B. M. Kudielka, J. Gaab et al. // *Psychosomatic medicine.* – 1999. – Vol. 61. – P. 154-162.

18. Варіативність серцевого ритму у жінок в різні фази менструального циклу / В. І. Кравченко, Ю. С. Демченко, К. Ю. Максимович, М. Ю. Макаруч // *Вісник КНУ імені Тараса Шевченка. Серія "Біологія".* – 2008. – № 52-53. – С. 52-55.

19. Neural activation in the orbit of rostral cortex in response to male faces increases during the follicular phase / H. A. Rupp, T. W. James, E. D. Ketterson et al. // *Horm Behav.* – 2009. – Vol. 56(1). – P. 66-72.

20. Menstrual cycle phase predicts women's hormonal responses to sexual stimuli / T. N. Shirazi, J. A. Bossio, D. A. Puts, M. L. Chivers // *Horm Behav.* – 2018. – Vol. 103. – P. 45-53.

21. Munk A. Fluctuations of estradiol during women's menstrual cycle: Influences on reactivity towards erotic stimuli in the late positive potential / A. J. Munk, A. C. Zoeller, J. Hennig // *Psychoneuro endocrinology.* – 2018. – Vol. 91. – P. 11-19.

Reference (Scopus):

- Low A. Heart rate variability: New perspectives on assessment of stress and health risk at the workplace / A. Low, R. McCraty // *Heart & Mind J.* – 2018. – Vol. 2(1). – P. 16-27.
- Shi H. Differences of Heart Rate Variability Between Happiness and Sadness Emotion States: A Pilot Study / H. Shi, L. Yang, L. Zhao // *J. Med. Biol. Eng.* – 2017. – Vol. 37. – P. 527.
- Yasuma F. Respiratory sinus arrhythmia: why does the heartbeat synchronize with respiratory rhythm? / F. Yasuma, J. Hayano // *Chest.* – 2004. Vol. 125(2) – P. 683-690.
- Goldstein J. M. Hormonal cycle modulates arousal circuitry in women using functional magnetic resonance imaging / J. M. Goldstein, M. Jerram, R. Poldrack et al. // *J. Neurosci.* – 2005. – Vol. 25. – P. 9309-9316.
- Dreher J. C. Menstrual cycle phase modulates reward-related neural function in women / J. C. Dreher, P. J. Schmidt, P. Kohn et al. // *PNAS.* – 2007. – Vol. 104. – P. 2465-2470.
- Sherwin B. B. Estrogen and cognitive functioning in women / B. B. Sherwin // *Endocrine Reviews.* – 2003. – Vol. 24. – P. 133-151.
- Weiser M. J. Estrogen receptor beta in the brain: from form to function / M. J. Weiser, C. D. Foradori, R. J. Handa // *Brain research reviews.* – 2008. – Vol. 57. – P. 309-320.
- Van Wingen G. How progesterone impairs memory for biologically salient stimuli in healthy young women / G. van Wingen, F. van Broekhoven, R. J. Verkes et al. // *J. Neurosci.* – 2007. – Vol. 27. – P. 11416-11423.
- Heilman K. M. The neurobiology of emotional experience / K. M. Heilman // *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* – 1997. – Vol. 9. – P. 439-448.
- Lang P. J. International affective picture system (IAPS): Affective ratings of pictures and instruction manual / P. J. Lang, M. M. Bradley, B. N. Cuthbert. – NIMH Center for the Study of Emotion & Attention. University of Florida, 2005. – 9 p.
- Heart rate variability. Standards of measurements, physiological interpretation, and clinical use. Task force of the European society of cardiology and the North American society of pacing and electrophysiology // *Eur. Heart J.* – 1996. – Vol. 17. – P. 354-381.
- McCraty R. Heart rate variability: New perspectives on physiological mechanisms, assessment of self-regulatory capacity, and health risk / R. McCraty, F. Shaffer // *Glob Adv Health Med.* – Vol. 2015(4). – P. 46-61.

13. Reyes del Paso G. A. The utility of low frequency heart rate variability as an index of sympathetic cardiac tone: A review with emphasis on a reanalysis of previous studies / G.A. Reyes del Paso, W. Langewitz, L.J. Mulder, A. van Roon, S. Duschek // *Psychophysiology* – Vol. 2013(50) – P.477-87.
14. Bai X. Influence of the menstrual cycle on nonlinear properties of heart rate variability in young women / X. Bai, J. Li, L. Zhou, X. Li // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. – 2009. – Vol. 297(2). – P.765-774.
15. Brar T. Effect of Different Phases of Menstrual Cycle on Heart Rate Variability (HRV) / T. K. Brar, K. D. Singh, A. Kumar // *J. Clin Diagn Res*. – 2015. – Vol. 9(10). – CC01–CC4.
16. Derntl B. Facial emotion recognition and amygdala activation are associated with menstrual cycle phase / B. Derntl, C. Windischberger, S. Robinson et al. // *Psychoneuro endocrinology*. – 2008. – Vol.33. – P. 1031-1040.
17. Kirschbaum C. Impact of gender, menstrual cycle phase, and oral contraceptives on the activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis / C. Kirschbaum, B. M. Kudielka, J. Gaab et al. // *Psychosomatic medicine*. – 1999. – Vol.61. – P. 154-162.
18. Kravchenko V. Heart rate variation in different phases of menstrual cycle / V. I. Kravchenko, J. S. Demchenko, K. Ju. Maksimovich, M. Ju. Makarchuk // *Visnyk Taras Shevchenko National University of Kyiv. Biology*. – 2008. – № 52-53. – P. 52-55.

19. Rupp H. Neural activation in the orbitofrontal cortex in response to male faces increases during the follicular phase / H. A. Rupp, T. W. James, E. D. Kettererson, D. R. Sengelaub, E. Janssen, J. R. Heiman // *Horm Behav*. – 2009. – Vol. 56(1). – P.66-72.
20. Shirazi T. N. Menstrual cycle phase predicts women's hormonal responses to sexual stimuli / T. N. Shirazi, J. A. Bossio, D. A. Puts, M. L. Chivers // *Horm Behav*. – 2018. – Vol. 103. – P. 45-53.
21. Munk A. Fluctuations of estradiol during women's menstrual cycle: Influences on reactivity towards erotic stimuli in the late positive potential / A. J. Munk, A. C. Zoeller, J. Hennig // *Psychoneuro endocrinology*. – 2018. – Vol. 91. – P. 11-19.

Надійшла до редколегії 20.01.2019
Отримано виправлений варіант 21.02.2019
Підписано до друку 21.02.2019

Received in the editorial 20.01.2019
Received a revised version on 21.02.2019
Signed in the press on 21.02.2019

В. Кравченко, канд. биол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
Е. Демидова, канд. биол. наук
Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Київ, Україна

ВАРИАТИВНОСТЬ СЕРДЕЧНОГО РИТМА ПРИ ПРОСМОТРЕ ЭМОЦИОНАЛЬНО ОКРАШЕННЫХ ИЗОБРАЖЕНИЙ У ЖЕНЩИН В РАЗЛИЧНЫЕ ФАЗЫ МЕНСТРУАЛЬНОГО ЦИКЛА

Изучались особенности динамики спектральных показателей вариабельности сердечного ритма у 32 женщин 17–23 лет при просмотре эмоциональных изображений IAPS (International affective picture system) в разные фазы менструального цикла. Показано, что различия в регуляции сердечного ритма, связанные с просмотром эмоциональных изображений различного типа, проявляются преимущественно в фолликулярной фазе менструального цикла. В этот период значимые различия при просмотре эмоциональных изображений различного типа обнаруживались в абсолютной и относительной мощностях очень низко- (VLF) и высокочастотного (HF) компонентов спектра. В фазу овуляции чувствительным к типу эмоций маркером была мощность низкочастотного компонента спектра (LF), отображающая влияние симпатического отдела нервной системы на сердечный ритм. Наибольшее значение этот показатель имел при просмотре неприятных изображений по сравнению с приятными и эротическими визуальными стимулами. Вклад симпатического отдела в регуляцию сердечного ритма был выражен при просмотре негативных и нейтральных изображений, и только просмотр изображений эротического характера характеризовался ростом парасимпатической активности, что проявлялось в увеличении мощности высокочастотного компонента спектра HF и снижении частоты дыхания. В исследовании показано, что в течение менструального цикла вегетативный баланс сдвигается в сторону преобладания симпатического регулирования сердечного ритма, которое достигает максимума в лютеиновую фазу. В связи с этим степень активности симпатического звена, которую регистрировали по мощности низкочастотного компонента LF, при просмотре неприятных изображений была наименьшей в фолликулярной фазе, а наибольшей – в лютеиновой. Не выявлено значимых различий между спектральными показателями вариабельности кардиоинтервалов при просмотре эмоциональных изображений в лютеиновую фазу, что свидетельствует о малой информативности этого периода цикла для оценки особенностей эмоционального реагирования женщин на основе анализа сердечного ритма.

Ключевые слова: фазы менструального цикла, изображения IAPS, эмоции, вариабельность сердечного ритма, вегетативный баланс.

V. Kravchenko, Ph.D.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
K. Demidova, Ph.D.
Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

HEART RHYTHM VARIATION DURING AFFECTIVE PICTURES VIEWING IN WOMEN IN DIFFERENT PHASES OF THE MENSTRUAL CYCLE

The peculiarities of the dynamics of the spectral indices of cardiac rhythm variability in 32 women 17-23 years of age while viewing emotional IAPS (International affective picture system) images in different phases of the menstrual cycle were studied. It is shown that the differences in the regulation of the heart rhythm associated with viewing emotional images of different types are manifested mainly in the follicular phase of the menstrual cycle. During this period, significant differences in viewing emotional images of different types were found in the absolute and relative power of the very low-frequency (VLF) and high-frequency (HF) component of the spectrum. In the ovulation phase, emotion-sensitive marker was a low-frequency spectrum component (LF), reflecting the effect of the sympathetic nervous system on cardiac rhythm. This indicator was significantly higher when viewing unpleasant images compared to pleasant and erotic visual stimuli. The contribution of the sympathetic division to the regulation of cardiac rhythm was observed during viewing of negative and neutral images, and only the viewing of erotic images was characterized by an increase in parasympathetic activity, which was accompanied with the increased power of the high-frequency component of the spectrum (HF) reducing the proportion of LF/HF and respiratory rate. The study shows that during the menstrual cycle, the autonomic balance shifts toward the predominance of sympathetic regulation of the heart rhythm, which reaches a maximum in the luteal phase. In this regard, the activity level of the sympathetic link recorded by the power of the low-frequency (LF) component while viewing unpleasant images was the lowest in the follicular phase and the highest in the luteal one. No significant differences were found between the spectral indices of cardio-interval variability when viewing emotional images in the luteal phase, indicating that this period of the cycle was low informative to assess the characteristics of women's emotional response based on heart rate analysis.

Keywords: menstrual cycle phases, IAPS image, emotions, heart rate variability, autonomic balance.

УДК 616.72-002: 577.122.8

DOI: https://doi.org/10.17721/1728_2748.2020.80.41-44О. Короткий, канд. біол. наук,
Л. Кот, канд. біол. наук,
К. Дворщенко, докт. біол. наук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ПЕРЕКИСНЕ ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ У ХРЯЩОВІЙ ТКАНИНІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТЕОАРТРИТУ ТА ПРИ ВВЕДЕННІ МУЛЬТИПРОБІОТИКА

Остеоартрит (ОА) є розповсюдженим захворюванням, яке пов'язано з порушенням опорно-рухової системи. Остеоартрит – це хронічне дегенеративне захворювання, яке призводить до скутості, болю у суглобах та подальшому розвитку інвалідності. Роль вільнорадикального окиснення ліпідів зростає при патологічних процесах. Зміна інтенсивності вільнорадикальних процесів може свідчити про розвиток патології, в тому рахунку пов'язаної з запаленням у суглобах.

Метою роботи було дослідити дію мультипробіотика на вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів у хрящовій тканині щурів за умов моноіодацетат-індукованого остеоартриту.

Дослідження проведені на білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях масою 180-240 г з дотриманням загальних етичних принципів експериментів на тваринах. Усіх тварин розділяли на чотири експериментальні групи: контроль, контроль на введення мультипробіотика, модель експериментального остеоартриту, остеоартрит + мультипробіотик. Визначення показників проводили у хрящовій тканині колінних суглобів щурів. Вміст дієнових кон'югатів визначали в гептан-ізопропанольному екстракті спектрофотометричним методом, шиффових основ – флуориметричним методом. Вміст ТБК-активних сполук визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою (ТБК). Концентрацію білка визначали за методом Лоурі. Статистичну обробку результатів дослідження проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики.

Встановлено, що при моноіодацетат-індукованому остеоартриті у хрящовій тканині щурів зростає вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів (дієнових кон'югатів, ТБК-активних сполук, шиффових основ). Показано, що при введенні мультипробіотика тваринам з моноіодацетат-індукованим остеоартритом вищевказані показники відновлювались.

Ключові слова: моноіодацетат-індукований остеоартрит, мультипробіотик, перекисне окиснення ліпідів, хрящ.

Вступ. Серед захворювань суглобів важливе місце займають остеоартрити (ОА). Так, у людей старше 65 років ОА розвивається у 90% населення, у частини з них це призводить до розвитку інвалідності. Крім того, зростає ризик розвитку ОА за умов механічних травм, інфекційних захворювань та метаболічних порушень [1-3]. Серед досліджень останніх років з'являються дані про потенціальний взаємозв'язок між розвитком ОА та станом мікрофлори травної системи [4, 5]. Оскільки дисбіоз кишкової мікробіоти тісно пов'язаний з патогенезом деяких метаболічних та запальних захворювань, відповідно він може бути задіяний у розвитку ОА. Тому актуальним питанням стає дослідження участі кишкової мікрофлори у розвитку захворювань суглобів.

Проведений нами аналіз даних літератури та безпосередньо отримані нами результати свідчать, що ефективним пробіотичним препаратом є мультипробіотик "Симбітер[®]", який здатен підтримувати та відновлювати нормобіоз шлунково-кишкового тракту (ШКТ) на різних експериментальних моделях [6, 7].

Важливу роль у розвитку та прогресуванні запалення у суглобах відіграє інтенсифікація вільнорадикальних процесів, в результаті чого відбувається пошкодження синовіальних клітин, деструкція хрящової тканини, ерозія кісток та суглобових поверхонь [8, 9].

Тому метою нашої роботи було дослідити дію мультипробіотика на вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів у хрящовій тканині щурів при експериментальному остеоартриті.

Об'єкт та методи досліджень. Усіх тварин розділяли на чотири експериментальні групи. Перша група – контроль: тваринам в перший день вводили в колінну зв'язку 0,05 мл 0,9% розчину NaCl та щоденно протягом 14 діб з 8-ої по 22-гу добу вводили пергастрально 1 мл питної води в перерахунку на 1 кг маси тіла тварини. Друга група – мультипробіотик: тваринам в перший день вводили в колінну зв'язку 0,05 мл 0,9% розчину NaCl та щоденно протягом 14 діб, з 8-ої по 22-гу добу вводили пергастрально мультипробіотик "Симбітер[®]" ("Пролісок", Україна) у дозі 140 мг/кг, розведений в 1 мл питної води на 1 кг маси тварини. Третя група – модель остеартри-

ту: щурам в перший день вводили в колінну зв'язку 1 мг моноіодацетату натрію (МІА), розчиненого у 0,05 мл 0,9% розчину NaCl [10] та щоденно протягом 14 діб вводили пергастрально 1 мл питної води в перерахунку на 1 кг маси тварини. Четверта група – остеартрит + мультипробіотик: тваринам вводили в перший день в колінну зв'язку 1 мг моноіодацетату натрію, розчиненого у 0,05 мл 0,9% розчину NaCl та пергастрально мультипробіотик у дозі 140 мг/кг, розведений в 1 мл питної води на 1 кг маси тварини. Тварин умертвляли на 30 добу після початку експерименту згідно протоколу етичного комітету, після чого швидко робили забір хрящової тканини колінного суглобу. Загальна кількість тварин, залучених до експериментальних досліджень, становила 20 особин.

У гомогенаті хрящової тканини визначали наступні показники. Вміст білка вимірювали за методом Лоурі [11]. Вміст дієнових кон'югатів визначали в гептан-ізопропанольному екстракті спектрофотометричним методом, шиффових основ – флуориметричним методом [12, 13]. Вміст ТБК-активних продуктів визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) [14]. Статистичну обробку результатів дослідження проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики.

Результати та їх обговорення. Одним з наслідків дії вільних радикалів на компоненти клітини є окиснення ліпідів. Його оцінюють за вмістом продуктів перекисного окиснення ліпідів – дієнових кон'югатів (первинні продукти), ТБК-активних сполук, основним компонентом яких є малоновий діальдегід (вторинні продукти) та шиффових основ (кінцеві продукти). З літературних даних відомо, що у синовіальній рідині хворих на ОА вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів зростає в кілька разів [15, 16]. Зрозуміло, що подібні процеси повинні відбуватись також у тканинах суглобу, зокрема, хрящовій тканині.

Встановлено зростання вмісту продуктів ПОЛ у хрящовій тканині щурів при введенні моноіодацетату натрію зростає вміст дієнових кон'югатів у 2 рази, вміст ТБК-активних продуктів – в 2,3 раза, вміст шиффових основ – в 2,1 раза відносно контролю (табл. 1).

Виявлено, що при введенні мультипробіотика тваринам з експериментальним остеартритом у сироватці

крові рівень продуктів ліпідної пероксидації знижується: дієнових кон'югатів і шиффових основ в 1,9 раза та ТБК-активних продуктів – в 1,7 раза відносно групи тварин з ОА (табл. 1).

Виявлене зниження продуктів ПОЛ у хрящовій тканині щурів з експериментальним ОА при застосуванні

мультипробіотика вказує на антиоксидантний ефект даного препарату. При введенні мультипробіотика інтактним щурам досліджувані показники залишаються в межах контрольних значень.

Таблиця 1. Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів у хрящовій тканині колінних суглобів щурів при остеоартриті (M±m, n=10)

Показник	Дієнові кон'югати, нмоль × мг білка ⁻¹	ТБК-активні продукти, нмоль × мг білка ⁻¹	Шиффові основи, ум. од. × мг білка ⁻¹
Контроль	279,88 ± 18,27	65,21 ± 6,18	8,06 ± 0,72
Мультипробіотик	271,67 ± 15,35	61,07 ± 5,73	7,84 ± 0,68
Остеоартрит	570,14 ± 22,81*	149,97 ± 12,36*	16,91 ± 0,68*
Остеоартрит + мультипробіотик	294,41 ± 21,39#	87,42 ± 8,05 ^{##}	8,85 ± 0,76 [#]

* – p < 0,05, відносно контролю; # – p < 0,05, відносно групи щурів з ОА.

Згідно проведених експериментальних досліджень було встановлено, що при експериментальному остеоартриті у хрящовій тканині інтенсифікуються процеси ліпідної пероксидації, про що свідчить збільшення рівня дієнових кон'югатів, ТБК-активних продуктів та шиффових основ.

Подібні результати були отримані іншими дослідниками. Показано, що в хондроцитах *in vitro* при ОА збільшується вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів, а саме, малонового альдегіду та гідроксиноненалу [17]. Суглобовий хрящ не має в своєму складі судин, а отже, надходження кисню обмежене. І хоча метаболізм клітин добре пристосований до гіпоксії, було виявлено, що хондроцити чутливі до кисню. В дослідженні хондроцитів *in vitro* було показано, що гіпоксія сприяє експресії хондрогенного фенотипу і формуванню специфічного хрящового матриксу, що вказує на важливість підтримки певного рівня парціального тиску кисню в культурі клітин. Крім впливу самого кисню, активні форми кисню відіграють важливу роль в регуляції ряду основних видів метаболізму, таких як активація клітин хондроцитів, проліферація і ремоделювання матриксу. Проте, коли генерація АФК перевищує антиоксидантний потенціал клітини, розвивається окисний стрес, що призводить до структурних та функціональних ушкоджень хряща, таких як загибель клітин і деградації матрикса [18, 19].

На моделі *in vitro* показано, що малоновий альдегід, який є продуктом перекисного окиснення ліпідів при окисному стресі здатен окислювати білки хрящового матриксу, що призводить до змін біохімічних та біофізичних властивостей хрящової тканини [20].

У синовіальній рідині пацієнтів, хворих на остеоартрит виявляють розвиток окисного стресу, що супроводжується підвищеною продукцією активованих кисневих метаболітів (H₂O₂, NO*) і активацією перекисного окислення ліпідів (малонового диальдегіду) на фоні дисбалансу і інгібування компонентів антиоксидантної системи (супероксиддисмутази, каталази, глутатіон-S-трансферази, глутатіонпероксидази, зниження вмісту відновленого глутатіону). Інтенсифікація вільнорадикального окислення і посилення прооксидантно властивостей синовіальної рідини хворих на остеоартрит залежали від вираженості патологічного процесу, тяжкості оперативного втручання при артроскопії і сприяли поглибленню структурно-дистрофічних змін суглобового хряща і підвищенню рівня апоптозу і некрозу хондроцитів [21, 22].

Виявлене зниження утворення продуктів ліпідної пероксидації у хрящовій тканині суглоба щурів з експериментальним ОА при введенні мультипробіотика свідчить про антиоксидантні властивості препарату. Це пов'язано з широким спектром біологічної активності мультипробіотика "Симбітер®": здатність ефективно відновлювати порушений мікроекологічний баланс та зменшувати розвиток запальних процесів в організмі. Та-

кож важливе значення у відновленні гомеостазу організму відіграє здатність бактеріальних штамів у складі мультипробіотика "Симбітер®" синтезувати біологічно активні антиболіти (вітаміни, коротколанцюгові жирні кислоти, антиоксиданти та імунomodulators) [23-26].

Висновки. Встановлено, що при моноіодацетат-індукованому остеоартриті у хрящовій тканині колінного суглобу щурів зростає вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів, що свідчить про активацію вільнорадикальних процесів. При введенні мультипробіотика "Симбітер®" щурам з експериментальною моделлю остеоартриту спостерігається часткове зниження вмісту продуктів ліпідної пероксидації у хрящовій тканині колінного суглобу, що може свідчити про процеси відновлення порушеного окисно-антиоксидантного балансу.

Список використаних джерел:

- Man G.S. Osteoarthritis pathogenesis – a complex process that involves the entire joint / Man G.S., Mologhianu G. // J. Med. Life. – 2014. – Vol. 7, №1. – P. 37-41.
- O'Neill T.W. Update on the epidemiology, risk factors and disease outcomes of osteoarthritis/ O'Neill T.W., McCabe P.S., McBeth J. // Best Pract Res Clin Rheumatol. 2018 Apr;32(2):312-326. doi: 10.1016/j.berh.2018.10.007.
- Hunter D.J. Osteoarthritis / Hunter D.J., Bierma-Zeinstra S. // Lancet. 2019 Apr 27;393(10182):1745-1759. doi: 10.1016/S0140-6736(19)30417-9.
- Vitetta L. The gastrointestinal microbiome and musculoskeletal diseases: a beneficial role for probiotics and prebiotics / Vitetta L., Coulson S., Linnane A.W., Butt H. // Pathogens. 2013 Nov 14;2(4):606-26. doi: 10.3390/pathogens2040606.
- Bravo-Blas A. Microbiota and arthritis: correlations or cause? / Bravo-Blas A., Wessel H., Milling S. // Curr. Opin. Rheumatol. – 2016. – Vol. 28(2). – P. 161-167.
- Вплив окисного стресу на рівень експресії генів TGF-β і HGF у печінці щурів в умовах тривалої шлункової гіпохлоридрії та за введення мультипробіотика Симбітер / К.О. Дворченко [та ін.] // Укр. біохім. журн. – 2013. – Т. 85, № 5. – С. 114-123.
- Абдулахад К.Ф.А. Дослідження впливу мультипробіотиків 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.
- Lugrin J. The role of oxidative stress during inflammatory processes / Lugrin J., Rosenblatt-Velin N., Parapanov R., Liaudet L. // Biol Chem. 2014 Feb;395(2):203-30. doi: 10.1515/hsz-2013-0241.
- Drevet S. Reactive oxygen species and NADPH oxidase 4 involvement in osteoarthritis /Drevet S., Gavazzi G., Grange L. et al. // Exp. Gerontol. – 2018. – Vol. 111. – P. 107-117. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Baragi V.M. A new class of potent matrix metalloproteinase 13 inhibitors for potential treatment of osteoarthritis: Evidence of histologic and clinical efficacy without musculoskeletal toxicity in rat models/ Baragi V.M., Becher G., Bendele A.M., et al. // Arthritis. Rheum. – 2009. – Vol. 60(7). – P. 2008-2018.
- Lowry O.H. Protein measurement with Folin phenol reagent./ Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // J. Biol. Chem. 1951; 193(1): 265-275.
- Гаврилов В.Б. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов/ Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Хмара Н.Ф. // Лабораторное дело. – 1988. – № 2. – С. 60-63.
- Колесова О.Е. Перекисное окисление липидов и методы определения продуктов липопероксидации в биологических средах / Коле-

сова О.Е., Маркин А.А., Федорова Т.Н. // Лабораторное дело. – 1984. – № 9. – С. 540-546.

14. Современные методы в биохимии // Под ред. Ореховича В.Н., М: Медицина, 1977. – С. 62-68.

15. Xue L., Li X. Associations between D3R expression in synovial mast cells and disease activity and oxidant status in patients with rheumatoid arthritis/ Xue L., Li X., Chen Q., He J. at al. // Clin Rheumatol. 2018 Oct;37(10):2621-2632. doi: 10.1007/s10067-018-4168-1.

16. Yin G, Li Y. Pim-2/mTORC1 Pathway Shapes Inflammatory Capacity in Rheumatoid Arthritis Synovial Cells Exposed to Lipid Peroxidations/ Yin G, Li Y, Yang M, Cen XM, Xie QB. // Biomed. Res. Int. 2015;2015:240210. doi: 10.1155/2015/240210.

17. Shan L. Fangchinoline supplementation attenuates inflammatory markers in experimental rheumatoid arthritis-induced rats / Shan L, Tong L, Hang L, Fan H. // Biomed. Pharmacother. 2019 Mar;111:142-150. doi: 10.1016/j.biopha.2018.12.043.

18. Rieder B. Hydrostatic pressure-generated reactive oxygen species induce osteoarthritic conditions in cartilage pellet cultures/ Rieder B., Weihs A.M., Weidinger A., Szwarc D. at al. // Sci. Rep. 2018 Nov 19;8(1):17010. doi: 10.1038/s41598-018-34718-8.

19. van Dalen SCM. The role of NOX2-derived reactive oxygen species in collagenase-induced osteoarthritis/ van Dalen SCM, Kruisbergen NNL, Walgreen B. at al. // Osteoarthritis Cartilage. 2018 Dec;26(12):1722-1732. doi: 10.1016/j.joca.2018.08.014.

20. Abusarah J. An overview of the role of lipid peroxidation-derived 4-hydroxynonenal in osteoarthritis / Abusarah J., Bentz M., Benabdoune H. at al. // Inflamm Res. 2017 Aug;66(8):637-651. doi: 10.1007/s00011-017-1044-4.

21. Внуков В.В. Свободнорадикальное окисление в синовиальной жидкости и апоптоз хондроцитов при гонартрозе./ Внуков В.В., Кролевец И.В., Милутина Н.П. и соавт. // Валеология. 2012;(4):38.

22. Wu Q. Advanced oxidation protein products induce chondrocyte apoptosis via receptor for advanced glycation end products-mediated, redox-dependent intrinsic apoptosis pathway / Wu Q., Zhong Z.M., Zhu S.Y., Liao C.R. at al. // Apoptosis. 2016 Jan;21(1):36-50. doi: 10.1007/s10495-015-1191-4.

23. Янковский Д.С. Микрофлора и здоровье человека / Д.С. Янковский, Г.С. Дымент. – К.: ТОВ "Червона Рута–Турс", 2008. – 552 с.

24. Янковський Д.С. Інноваційні технології оздоровлення мікробіому людини/ Янковський Д.С., Широбоков В.П., Димент Г.С. // Nauka innov. 2018, 14(6): 5-17.

25. Xu C., Shi Z. Metabolic engineering of *Lactococcus lactis* for high level accumulation of glutathione and S-adenosyl-L-methionine/ Xu C., Shi Z., Shao J., Yu C., Xu Z. // World J. Microbiol Biotechnol. 2019 Nov 14;35(12):185. doi: 10.1007/s11274-019-2759-x.

26. Wieërs G. Front Cell Infect. /Wieërs G., Belkhir L., Enaud R. at al. // Microbiol. 2020 Jan 15;9:454. doi: 10.3389/fcimb.2019.00454.

Reference (Scopus):

1. Man G.S., Mologhianu G. Osteoarthritis pathogenesis – a complex process that involves the entire joint // J. Med. Life. – 2014. – Vol. 7, №1. – P. 37-41.

2. O'Neill T.W., McCabe P.S., McBeth J. Update on the epidemiology, risk factors and disease outcomes of osteoarthritis // Best Pract Res Clin Rheumatol. 2018 Apr;32(2):312-326. doi: 10.1016/j.berh.2018.10.007.

3. Hunter D.J., Bierma-Zeinstra S. Osteoarthritis // Lancet. 2019 Apr 27;393(10182):1745-1759. doi: 10.1016/S0140-6736(19)30417-9.

4. Vitetta L., Coulson S., Linnane A.W., Butt H. The gastrointestinal microbiome and musculoskeletal diseases: a beneficial role for probiotics and prebiotics // Pathogens. 2013 Nov 14;2(4):606-26. doi: 10.3390/pathogens2040606.

5. Bravo-Blas A., Wessel H., Milling S. Microbiota and arthritis: correlations or cause? // Curr. Opin. Rheumatol. – 2016. – Vol. 28(2). – P. 161-167.

6. Вплив окисного стресу на рівень експресії генів TGF-β і HGF у печинці шхурів у умовках тривалої шлункової гіпохлоридії та за введення мультипробиотику Cymbiter / K.O. Dvorschenko [ta in.]. // Ukr. biokhim. zhurn. – 2013. – Т. 85, № 5. – С. 114-123

7. Abdulakhad K.F.A. Doslidzhennia vplyvu multiprobiotykyv hrupy "Symbiter" na sekretornu funktsiiu shlunka u shchuriv v umovakh trivaloi hiperhastrynmii: avtoref. dys....kand. biol. nauk: 03.00.13 / Abdulakhad Kusai F. Abdulakhad; Kyivs. nats. un-t im. Tarasa Shevchenka. – K., 2012. – 20 s.

8. Lugin J., Rosenblatt-Velin N., Parapanov R., Liaudet L. The role of oxidative stress during inflammatory processes // Biol Chem. 2014 Feb;395(2):203-30. doi: 10.1515/hsz-2013-0241.

9. Drevet S., Gavazzi G., Grange L. et al. Reactive oxygen species and NADPH oxidase 4 involvement in osteoarthritis // Exp. Gerontol. – 2018. – Vol. 111. – P. 107-117. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

10. Baragi V.M., Becher G., Bendele A.M., et al. A new class of potent matrix metalloproteinase 13 inhibitors for potential treatment of osteoarthritis: Evidence of histologic and clinical efficacy without musculoskeletal toxicity in rat models // Arthritis. Rheum. – 2009. – Vol. 60(7). – P. 2008-2018.

11. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951; 193(1): 265-275.

12. Gavrilov V.B., Gavrilova A.R., Hmara N.F. Izmerenie dienovykh kon'yugatov v plazme krovi po UF-pogloscheniyu geptanovykh i izopropanolnykh ekstraktov // Laboratornoe delo. – 1988. – # 2. – S. 60-63. ekst dlya perevoda

13. Колесова О.Е., Маркин А.А., Федорова Т.Н. Перекисное окисление липидов и методы определения продуктов липопероксидации в биологических средах // Лабораторное дело. – 1984. – № 9. – С. 540-546.

14. Sovremennyye metody v biohimii // Pod red. Orekhovicha V.N., M: Meditsina, 1977. – S. 62-68.

15. Xue L., Li X., Chen Q., He J., Dong Y., Wang J., Shen S., Jia R., Zang Q.J., Zhang T., Li M., Geng Y. Associations between D3R expression in synovial mast cells and disease activity and oxidant status in patients with rheumatoid arthritis // Clin Rheumatol. 2018 Oct;37(10):2621-2632. doi: 10.1007/s10067-018-4168-1.

16. Yin G, Li Y, Yang M, Cen XM, Xie QB. Pim-2/mTORC1 Pathway Shapes Inflammatory Capacity in Rheumatoid Arthritis Synovial Cells Exposed to Lipid Peroxidations // Biomed. Res. Int. 2015;2015:240210. doi: 10.1155/2015/240210.

17. Shan L, Tong L, Hang L, Fan H. Fangchinoline supplementation attenuates inflammatory markers in experimental rheumatoid arthritis-induced rats // Biomed. Pharmacother. 2019 Mar;111:142-150. doi: 10.1016/j.biopha.2018.12.043.

18. Rieder B., Weihs A.M., Weidinger A., Szwarc D., Nürnberger S., Redl H., Rünzler D., Huber-Gries C., Teuschl A.H. Hydrostatic pressure-generated reactive oxygen species induce osteoarthritic conditions in cartilage pellet cultures // Sci. Rep. 2018 Nov 19;8(1):17010. doi: 10.1038/s41598-018-34718-8.

19. van Dalen SCM, Kruisbergen NNL, Walgreen B, Helsen MMA, Sløtjes AW, Cremers NAJ, Koenders MI, van de Loo FAJ, Roth J, Vogt T, Blom AB, van der Kraan PM, van Lent PLEM, van den Bosch MHJ. The role of NOX2-derived reactive oxygen species in collagenase-induced osteoarthritis // Osteoarthritis Cartilage. 2018 Dec;26(12):1722-1732. doi: 10.1016/j.joca.2018.08.014.

20. Abusarah J., Bentz M., Benabdoune H., Rondon P.E., Shi Q., Fernandes J.C., Fahmi H., Benderdour M. An overview of the role of lipid peroxidation-derived 4-hydroxynonenal in osteoarthritis // Inflamm Res. 2017 Aug;66(8):637-651. doi: 10.1007/s00011-017-1044-4.

21. Vnukov V.V., Krolevets I.V., Milyutina N.P., Gutsenko O.I., Zabrodin, M.A., Anina S.B., Brazhnikov Yu.I. Svobodnoradikalnoe oksilenie v sinovialnoy zhidkosti i apoptoz hondrotsitov pri gonartroze. Valeologiya. 2012;(4):38.

22. Wu Q., Zhong Z.M., Zhu S.Y., Liao C.R., Pan Y., Zeng J.H., Zheng S., Ding R.T., Lin Q.S., Ye Q., Ye W.B., Li W., Chen J.T. Advanced oxidation protein products induce chondrocyte apoptosis via receptor for advanced glycation end products-mediated, redox-dependent intrinsic apoptosis pathway // Apoptosis. 2016 Jan;21(1):36-50. doi: 10.1007/s10495-015-1191-4.

23. Yankovskiy D.S. Mikroflora i zdorove cheloveka / D.S. Yankovskiy, G.S. Dyiment. – K.: TOV "Chervona Ruta–Turs", 2008. – 552 s.

24. Iankovskiy D.S., Shyrobokov V.P., Dyment H.S. Innovatsiini tekhnologii ozdorovlennia mikrobiomu liudyny // Nauka innov. 2018, 14(6): 5-17.

25. Xu C., Shi Z., Shao J., Yu C., Xu Z. Metabolic engineering of *Lactococcus lactis* for high level accumulation of glutathione and S-adenosyl-L-methionine // World J. Microbiol Biotechnol. 2019 Nov 14;35(12):185. doi: 10.1007/s11274-019-2759-x.

26. Wieërs G., Belkhir L., Enaud R., Leclercq S., Philippart de Foy J.M., Dequenne I., de Timary P., Cani P.D. // Front Cell Infect. Microbiol. 2020 Jan 15;9:454. doi: 10.3389/fcimb.2019.00454.

Надійшла до редколегії 22.01.2019
Отримано виправлений варіант 24.02.2019
Підписано до друку 24.02.2019

Received in the editorial 22.01.2019
Received a revised version on 24.02.2019
Signed in the press on 24.02.2019

А. Короткий, канд. биол. наук, Л. Кот, канд. биол. наук, Е. Дворченко, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОСТЕОАРТРИТЕ И ПРИ ВВЕДЕНИИ МУЛЬТИПРОБИОТИКА

Целью работы было исследовать действие мультипробиотики на содержание продуктов перекисного окисления липидов в хрящевой ткани крыс при моноодацетат-индуцированном остеоартрите.

Исследования проведены на белых нелинейных половозрелых крысах-самцах массой 180-240 г с соблюдением общих этических принципов экспериментов на животных. Всех животных разделили на четыре экспериментальные группы. Первая группа – контроль: животным в первый день вводили в колленную связку 0,05 мл 0,9% раствора NaCl и ежедневно на протяжении 14 суток с 8-ого по 22-ой

день вводили пергастрально 1 мл питтєвєй водї в перерасчетє на 1 кг масси тєла животногє. Вторєя грєппа – мультїпробіотик: животним в первїй дєнь вводили в колєннує сувязку 0,05 мл 0,9% рєствєра NaCl і єждєднєвно на прєтяжєнні 14 сутєк с 8-огє по 22-рєй дєнь вводили пергастрально мультїпробіотик "Сїмбітєр®" ("Пролїсок", Україна) в дєзє 140 мг/кг, рєзвєдєннїй в 1 мл питтєвєй водї на 1 кг масси животногє. Трєтєя грєппа – мєдєль остєоартрєзє: крїсам в первїй дєнь вводили в колєннує сувязку 1 мг моноїодєцєтєтє натрїє, рєзвєдєннє в 0,05 мл 0,9% рєствєра NaCl і єждєднєвно на прєтяжєнні 14 сутєк вводили пергастрально 1 мл питтєвєй водї в перєсєчєтє на 1 кг масси животногє. Чєтвєртєя грєппа – остєоартрєз+ мультїпробіотик: животним вводили в первїй дєнь вводили в колєннує сувязку 1 мг моноїодєцєтєтє натрїє, рєствєрєннє в 0,05 мл 0,9% рєствєра NaCl, і пергастрально мультїпробіотик в дєзє 140 мг/кг, рєзвєдєннїй в 1 мл питтєвєй водї на 1 кг масси животногє. Животних умєртвєляли на 30 сутєк пєслє нєчєлє експєрїмєнтєлє прєтєкєлє єтїчнєгє комїтєтє, пєслє чєгє бїстрє дєлєли зєбрє хрїщєй. Сєдєржєннє дїєновєх коньєгєтєв опрєдєляли в гєптєн-їзєпрєпєнєлєнєм екстрєктє спєктрєфєтємєтрїчєскїм мєтєдєм, шїфєвєх оснєвєнїй – флєурїмєтрїчєскїм мєтєдєм. Сєдєржєннє ТБК-актївнєх сєдїєнїєнїй опрєдєляли по рєакцїї с тїєбарбїтєрєвєй кїслєтєй (ТБК).

Устєновлєнє, чтє прї моноїодєцєтєтє-їндєковєнєм остєоартрїтє в хрїщєвєй тєкєнї вєзрєстєєт сєдєржєннє прєдєктєв пєрєкїснєгє окїслєннє лїпїдєв (дїєновєх коньєгєтєв, ТБК-актївнєх сєдїєнїєнїй, шїфєвєх оснєвєнїй). Пєкєзєнє, чтє прї длїтєлєнєм ввєдєннїї мультїпробіотїкє животним с моноїодєцєтєтє-їндєковєнєм остєоартрїтєм вїшє укєзєннєє пєкєзєтєлї вєстєнєєвїєлєлїсь.

Ключєвєє слєвє: моноїодєцєтєтє-їндєцїєрєвєннїй остєоартрїт, мультїпробіотик, пєрєкїснєє окїслєннє лїпїдєв, хрїщ.

O. Korotkyi, Ph.D., L. Kot, Ph.D., K. Dvorshchenko, Dr.Sc.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

LIPID PEROXIDATION IN RAT CARTILAGE UNDER EXPERIMENTAL OSTEOARTHRITIS AND ADMINISTRATION OF MULTIPROBIOTIC

The aim of the study was to investigate the effect of multiprobiotic on the content of lipid peroxidation products in rat cartilage during monoiodoacetate-induced osteoarthritis.

The study was carried out on white non-linear, sexually mature male rats (weight 180-240g), according to general ethical principles of experiments on animals. All animals were divided into four experimental groups. The first group – Control: animals got injection into knee ligament 0.05 ml of 0.9% NaCl solution on the first day of the experiment and then got intragastric administration 1 ml of drinking water per 1 kg of the animal weight daily for 14 days from the 8th to 22nd days. The second group – Multiprobiotic: animals got injection into knee ligament 0.05 ml of 0.9% NaCl solution on the first day of the experiment and then got intragastric administration 140 mg / kg of multiprobiotic Symbiter® (Prolisok, Ukraine) diluted in 1 ml of drinking water per 1 kg of animal weight. The third group, MIA-induced OA: animals got injection into knee ligament 1 mg of sodium monoiodoacetate, dissolved in 0.05 ml of 0.9% NaCl on the first day of the experiment and then got intragastric administration 1 ml of drinking water per 1 kg of animal weight daily for 14 days from the 8th to 22nd days. The fourth group – MIA-induced OA + Multiprobiotic: animals got injection into knee ligament 0.05 ml of 1 mg of sodium monoiodoacetate, dissolved in 0.05 ml of 0.9% NaCl on the first day of the experiment and then got intragastric administration 140 mg / kg of multiprobiotic diluted in 1 ml of drinking water per 1 kg of animal weight. All animals were killed on day 30 of the experiment, according to the protocol of the ethics committee with rapid blood sampling. The content of the products of oxidative modification of proteins (OMP) and oligopeptides was determined by the level of carbonyl derivatives that were detected in reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine. The content of diene conjugates was determined in the heptane-isopropanol extract by the spectrophotometric method, and of Schiff bases – by the fluorimetric method. The content of TBK-active compounds was determined by reaction with thiobarbituric acid.

It has been established that MIA-induced OA the content of lipid peroxidation products (diene conjugates, TBK-active compounds, schiff bases) increases in the cartilage. It was shown that with the administration of multiprobiotic in animals with MIA-induced OA, the above indicators were restored.

Key words: monoiodoacetate-induced osteoarthritis, multiprobiotic, lipid peroxidation, cartilage.

УДК: 581.55:581.524.3 (477.81)

DOI: https://doi.org/10.17721/1728_2748.2020.80.44-49

А. Бончковський, студ.,
О. Безсмертна, канд. біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ОСОБЛИВОСТІ РОСЛИННОЇ СУКЦЕСІЇ У КАР'ЄРІ ЦЕГЕЛЬНОГО ЗАВОДУ В С. НОВИЙ ТІК (РІВНЕНСЬКА ОБЛАСТЬ)

Припинєннє експлуєтєцїї кар'єрї є причїноє поселєннє пїєнєрнїх рєслїн, щє освєюють вїлнї вїд рєслїннє-грєнтєвєгє покрївє дїєлєнкї в пєвнїй пєслїдєвнєстї, якї нєзївєють сукцєсїємї. Тєорєтїчнї оснєвї вїдновнїх рєслїннїх сукцєсїї у кар'єрєх рєзрєблєнї пєкї щє вїднєснє слєбкє, хєчє ємпїрїчнїх дєслїджєнєв, прїсвєчєнїє цїй прєблємєтїцї, бєгєтє. Об'єктєм нєшєгє дєслїджєннє є кар'єр цєгєлєнєгє зєвєдє, щє мїстїтєсьє нє схїднїй околїцї с. Нєвїй Тїк (Дємїдїєвськїй рєєрїєн, Рївнєнськєя облєстє) у цєнтрєлнїй чєстїнї Вєлїнськєй вїсєчїнї, зє 27 км нє пїдєнє вїд м. Лєцьк. Із 2008 рєкє, з мємєнтє припинєннє фєнкцїєнєвєннє цєгєлєнєгє зєвєдє, у кар'єрї вїдбєвєєтьсьє пєрвїннє рєслїннє сукцєсїє, щє нєрєзї пєрєбєвєє нє стєдїї мєлєдєстї є хєрєктєрїзєуєтьсьє стрїкмїм зрєстєннєм бїєрїзномєнїттє. Стєнєм нє осїнь 2019 рєкє вїзнєчєнє 72 вїдї рєслїн, з якїх 6 вїдїє – дєрєвє, 1 вїд кєущїє тє 65 вїдїє трєв. Вїдпєвїднє дє сїстємєтїчнєгє єнєлїзу сєрєд вїєвєлєнїх вїдїє пєрєвєжєють прєдстєєвнїкї рєдїєн Asteraceae тє Fabaceae. Вїзнєчєнє пєрєвєжєєчїє єкєлєгє-бїєлєгїчнїє грєппї рєслїн у кар'єрї: вїднєснє освїтлєннє пєрєвєжєють гєлїєфїтї; вїдпєвїднє дє тєрмїчнєгє рєжїмє нєйбїлєшє чєстєкє стєнєвєлєють вїдї пємїрнє-тєплєгє клїмєтє; у рєслїннєм покрївї нє сучєснємє єтєпї сукцєсїї зєгєлєм пєрєвєжєють цєнтрєлнєєврєпєйськїє вїдї. Нє оснєвї єнєлїзу зєсєлєннє рєслїннїмї єсєцїєчїєм тє пєєвї мїжєвїдєвєй тє внєтрїшнєєвїдєвєй кєнкєрєнцїї встєновлєнє, щє рєслїннє сукцєсїє в дєслїджєвєнєм кар'єрї пєрєбєвєє нє стєдїї мєлєдєстї. Тєжє вїєвєлєнє гєтєрєхрєннїстє тє мїкрєзєлєннє дїфєрєнцїєцїю прєцєсїє сукцєсїї в рїзнїх дїєлєнкєх кар'єрє. Вїдмїннїстє прєхєджєннє стєдїї сукцєсїї зєлєжнє вїд єсєблїєвєстєй рєлєєфє вїєзєтє зє оснєвє длє мїкрєзєлєннєє кар'єрє. Устєновлєнє, щє нє сучєснємє єтєпї рєслїннєй сукцєсїї вїзнєчєлєннєм фєктєрєм єкїснєгє тє кїлєкїснєгє склєдє фїтєцєнєзїє є єбїєтїчнї фєктєрї кар'єрє, єсєблїє мєрфєлєгїє і дїнємїкє рєлєєфє, є тєжє лїтєлєгє-стєрєогрєфїчнє бєдєвєє вїдклєдїє. Вїєвєлєнє їнїцїєлєннє стєдїю грєнтєвєй сукцєсїї, щє стєлє мєжлїєвєю у зє'єзєкє із нєкєпїчєннєм знєчнїєй кїлєкєстї мєртмєсї в єстєннї рєкї.

Ключєвїє слєвє: рєслїннє сукцєсїє, фїтєцєнєз, єлїєннїй кар'єр, гєтєрєхрєннїстє.

Встєп. Припинєннє експлуєтєцїї кар'єрї є причїноє поселєннє пїєнєрнїх рєслїн, щє освєюють вїлнї вїд рєслїннє-грєнтєвєгє покрївє дїєлєнкї у пєвнїй пєслїдєвнєстї, якї нєзївєють сукцєсїємї. У прєцєсї рєзвїтєкє рєслїннїє сукцєсїї нє лїшє хєрєктєрїзєуєтьсьє усклєднєннєм внєтрїшнє- і мїжєвїдєвєй кєнкєрєнцїї тє

лєтєрєлєннєй єргєнїзєцїї фїтєцєнєзїєв, є їє тєнєсформєуєтьсьє сєрєдєвїщє прєжїєвєннє. У рєзєлєьтєтї кємплєкєснїєй тєнєсформєцїї кємпєнєнтїє єкєсїєстємїє кар'єрє вїдбєвєєтьсьє утвєрєннє влєснєгє лєндшєфтє, нєблїжєнєгє дє фєнєвєгє, єднєк із пєвнїмї вїдмїннєстємї, якї єбєуємєлєнї пєрєвєжєно єсєблїєвєстємїє рєлєє-

ефу. Рослинні сукцесії містять комплексну інформацію про особливості швидкості та напрямки заселення рослинності на первинних ділянках, що буде корисним для проведення фіторекультивациі порушених земель. Звідси можна почерпнути інформацію про швидкість регенерації фітоценозу, фактори впливу на проходження стадій рослинної сукцесії тощо. Кожен окремих тип кар'єру створює власні екологічні умови, тому адаптація рослин до тих чи інших параметрів середовища відбуватиметься дещо по-різному.

Теоретичні основи відновних рослинних сукцесій у кар'єрах розроблені поки що відносно слабо, хоча емпіричних досліджень, присвячених цій проблематиці, багато. Переважно проводилися дослідження рослинних сукцесій буровугільних [8], кам'яновугільних [10], сірчанних [1], піщаних [5, 13, 20, 7], вапнякових [18, 21] та гранітних [15, 22] кар'єрів. Проте вивчення рослинних сукцесій у кар'єрах із видобутку глинистої (лесової) сировини для виробництва цегли фактично не мало місця. У лесових кар'єрах слід очікувати зовсім іншого тренду рослинних сукцесій, адже лесові породи зазвичай перешаровуються із вкопними ґрунтами, які мають підвищений вміст гумусу та інших органо-мінеральних сполук. У результаті цього можна припустити, що рослинні сукцесії у таких кар'єрах будуть пришвидшеними, що, у свою чергу, стимулюватиме ініціальний педогенез.

Матеріали і методи. Досліджуваний кар'єр цегельного заводу знаходиться на східній околиці с. Новий Тік Демидівського району Рівненської області (25°12'Е, 50°29'N) у центральній частині Волинської височини, за 27 км на південь від м. Луцьк. Він розташований у прибережній частині долини р. Берестова – правої притоки р. Стир. Абсолютна висота брівки кар'єру становить 204 м. Із 2008 року кар'єр не експлуатується. З 1994 по 2008 роки перебував у приватній власності, у цей час проводився видобуток мінеральної сировини для виготовлення цегли. З моменту припинення експлуатації кар'єру в ньому розпочалася рослинна сукцесія, яка є об'єктом дослідження цієї статті.

Вивчення рослинної сукцесії у кар'єрі проводилися упродовж 2015-2019 рр. Фітоценотичні дослідження передусім передбачали збирання гербарію, мета якого полягала у визначенні в камеральних умовах видового складу рослинності кар'єру на різних етапах сукцесії. Гербаризація зразків проводилася за методикою А. К. Скворцова [12]. Визначення видів проводилось за допомогою таких праць, як "Флора СССР", "Флора Кавказу", "Флора европейской части СССР", "Определитель высших растений Украины", "Екофлора України", "Flora Europaea" [4, 6, 9, 14, 23, 24]. Номенклатура таксонів подана відповідно до "Vascular plants of Ukraine: a nomenclatural Checklist" [19] з урахуванням сучасніших праць [16, 23]. Відповідно до шкали Г. Еленберга [17], яка передбачає бальну оцінку екологічних умов зростання рослин (освітленість, температура, континентальність, вологість, кислотність, поживні речовини у ґрунті), встановлено належність практично всіх видів рослин кар'єру до різних екологічних груп. Життєві форми рослин встановлено за Серебряковим [11].

Окрім цього, у перший рік спостережень вибрано 30 перспективних і репрезентативних ділянок площею 1 м² для подальшого дослідження темпів та особливостей окупації фітоценозами території кар'єру. Ділянки закладалися відповідно до комплексу критеріїв: особливостей фітоценозів, експозиції та геодинаміки схилу, літо-

логічного складу порід, а також гідрологічного режиму території. У межах кількох експериментальних ділянок закладено прикопки для вивчення генетичного профілю ініціальних ґрунтів та літологічного субстрату, на якому розвивається рослинна сукцесія. У п'яти прикопках за допомогою автоматичного пристрою AMSTAT визначено кислотність ґрунту з точністю до 0,1 рН, а також виконано гранулометричний аналіз літологічного субстрату за методом Качинського [3].

Результати досліджень

Абіотичні фактори рослинної сукцесії. Досліджуваний кар'єр розкриває лесово-ґрунтову формування верхнього та середнього плейстоцену, із горизонтами балкового алювію. Днище кар'єру розрізає лучний середньоплейстоценовий ґрунт завадівського кліматоліту, який характеризується підвищеним вмістом гумусу та середньосуглинковим гранулометричним складом. У цілому відклади, що залягають в основі кар'єру, середньо- та важкосуглинкові (вміст фракції мулу досягає 32 %). Вище залягає товща педоседиментів прилуцького та кайдацького кліматолітів супіщаного механічного складу, які перешаровуються із піщаними горизонтами балкового алювію. Верхній літологічний комплекс представлений передусім потужною товщею легко- чи середньосуглинкових лесоподібних суглинків, карбонатних, із вертикальною окремістю, що робить їх піддатливими до ерозійних та гравітаційних геоморфологічних процесів [2]. Розкриття кар'єром горизонтів вкопних ґрунтів із підвищеним вмістом гумусу (до 0,6 %) певною мірою обумовлює пришвидшений темп розвитку рослинної сукцесії.

Відносно легкий гранулометричний склад відкладів верхньої літологічної товщі та південна експозиція схилів кар'єру визначають високу динаміку геоморфологічних процесів (обвали, осипи, лінійна та площинна ерозія, осуви). Саме рельєфотворчі процеси є головним лімітуючим фактором розвитку рослинної сукцесії. Проте в останні роки відбувається поступова стабілізація геоморфологічних процесів, у результаті чого стало можливим поселення окремих груп рослин навіть на крутих схилах. У днищі кар'єру на середньосуглинкових породах із низькими показниками інфільтрації навесні формуються тимчасові водойми, які пересихають лише у період з червня по серпень. У сніжні роки все днище кар'єру затоплюється талими сніговими водами.

Визначено кислотність літологічного субстрату, на основі чого встановлено, що у днищі кар'єру породи та ініціальні ґрунти кислотні (табл. 1). Це обумовлено сезонним стоянням тут вологи та розвитком процесів оглеєння. На схилах кар'єру та у фронтальній частині конусів виносу реакція середовища слабко кисла, нейтральна і навіть слаболужна (рН = 6,2–7,3), що пов'язано із карбонатністю горизонтів лесів, які відслонюються на схилах. Фоновий ґрунт (чорнозем типовий) характеризується слабкокислою реакцією середовища (рН = 6,5).

Визначено гранулометричний склад ініціальних ґрунтів у кар'єрі (табл. 1). Встановлено, що гранулометричний склад ініціальних ґрунтів легший від літологічного субстрату. Зокрема, більшість ініціальних ґрунтів мають крупнопилувато-легкосуглинковий механічний склад із підвищеним вмістом фракцій дрібно-го піску в розкопі № 1 та середньозернистого піску – у розкопі № 4.

Таблиця 1. Гранулометричний склад та кислотність ініціальних ґрунтів у днищі кар'єру

Розкоп	Кислотність, pH	Гранулометричний склад: фракції мм					
		>0,25	0,05-0,25	0,05-0,01	0,01-0,005	0,005-0,001	<0,001
Розкоп 1. Сухе днище кар'єру	5,3	6,59 %	47,63 %	17,15 %	9,84 %	16,83 %	1,96 %
Розкоп 2. Пролувіальний шлейф	6,2	9,46 %	15,49 %	53,05 %	10,75 %	4,45 %	6,8 %
Розкоп 3. Періодично затоплюване днище кар'єру	5,0	2,34 %	17,14 %	50,01 %	14,82 %	14,9 %	0,79 %
Розкоп 4. Сухе днище кар'єру	5,2	25,31 %	6,14 %	51,94 %	4,57 %	4,24 %	7,8 %

Схили кар'єру характеризуються південною експозицією, тому показники інсоляції є досить значними, узимку глибина промерзання незначна, а навесні відбувається швидке танення снігу. Відсутність постійного затінку обумовлює абсолютне переважання геліофітів у рослинному покриві. У днищі кар'єру поряд із рослинною сукцесією відбувається формування ініціальних ґрунтів, потужність яких не перевищує поки що декількох сантиметрів. В основі схилів утворюються акумулятивні (намиті) педоліти із потужнішим генетичним профілем, більшим вмістом органічних речовин. На таких ґрунтах частіше поселяються мохи та евтрофи. У межах періодично зволжених ділянок формуються ініціальні гідроморфні ґрунти з ембріональними ознаками оглеєння та псевдоопідзолення. На схилах ґрунтоутворення ще не розпочалося.

Видовий склад фітоценозів. Вивчення рослинної сукцесії у кар'єрі проводилося упродовж 2015-2019 рр. У перший рік досліджень було ідентифіковано 25 таксонів, з яких 6 видів дерев, 1 вид кущів і 18 видів трав. Станом на осінь 2019 року у кар'єрі зареєстровано 72 види рослин, з них:

1) 5 видів дерев: *Pinus sylvestris* L., *Betula pendula* Roth., *Salix caprea* L., *Salix fragilis* L. та *Pyrus communis* L.

2) 2 види чагарників: *Swida sanguinea* (L.) Opiz та *Salix triandra* L.

3) 65 видів трав, з яких 48 видів трав'янистих полікарпиків, 15 видів трав'янистих монокарпиків і 2 види земноводних трав.

Станом на 2019 рік рослинний покрив кар'єру представлений 24 родинами, з яких домінували види таких родин, як *Asteraceae* (37,5 %), *Fabaceae* (13,9 %), *Apiaceae* (5,6 %), *Salicaceae* (4,2 %), *Poaceae* (4,2 %), *Onagraceae* (4,2 %), *Plantaginaceae* (4,2 %) та ін. Такий видовий склад відображає поширення рослин із широкою екологічною амплітудою, що забезпечує їх поселення навіть на субстратах із низьким вмістом поживних речовин.

За 4 роки спостережень у кар'єрі з'явилося 47 нових видів трав, які більшою мірою представлені оліготрофами. За цей період відбулося не лише зростання біорізноманіття піонерних фітоценозів, а й поступова окупація рослинами геодинамічних форм рельєфу, зокрема пролувіально-делювіального шлейфу, відвалів, схилів тощо. У цілому дерева та чагарники зростають передусім у днищі кар'єру, особливо на перезволоженому ділянках, тоді як трави окупують делювіально-пролувіальні шлейфи, сухе днище кар'єру, а останнім часом – також схили.

Екологічні групи рослин. Проаналізовано положення кожного виду рослин у шкалі Еленберга (рис. 1), що дало змогу з'ясувати екологічну нішу кожного таксона відповідно до певних абіотичних екологічних факторів (освітленість, термічний режим, континентальність клімату, зволоження, pH реакція субстрату, вміст азоту в субстраті тощо).

За показником *освітленості* практично всі види належать до геліофітів. Серед світлолюбних рослин можна зазначити такі, як *Artemisia absinthium* L., *Achillea millefolium* L. та *Oenothera biennis* L. Також незначно представлені тіневитривалі рослини: зокрема, на періодично затоплюваній ділянці кар'єру утворює

асоціації *Salix fragilis* L. Домінування геоліофітів у рослинному покриві пояснюється як південною експозицією кар'єру, відсутністю затінених ділянок, так і слабо сформованим деревним покривом.

За *термічним режимом* практично всі види належать до фітобіоти помірного та помірно-теплого клімату. Найбільшу частку становлять усе ж види помірно-теплого клімату, серед яких *Artemisia absinthium* L., *Pyrus communis* L., *Knautia arvensis* (L.) Coult., *Trifolium hybridum* L. та ін. Дещо рідше зустрічаються види, що зростають переважно у помірному кліматі – *Salix fragilis* L., *Phragmites australis* (Cav.) Trin., *Swida sanguinea* (L.) Opiz.) та ін. Однак також наявні представники теплого (*Oenothera biennis* L.) та прохолодного (*Verbascum thapsus* L.) клімату. Загалом видовий склад рослинності за термічним режимом цілком корелюється із типом клімату цієї території.

За показником *континентальності* у кар'єрі зростають рослини як субокеанічного, так і субконтинентального клімату. Перші у геоботанічному аспекті представлені видами центральноєвропейської провінції, такими як *Senecio jacobaea* L., *Tussilago farfara* L., *Salix caprea* L., *Knautia arvensis* (L.) Coult. та ін. Рослини субконтинентального та перехідного до континентального клімату в кар'єрі мають підрядне значення і представлені такими видами, як *Achillea millefolium* L., *Pinus sylvestris* L., *Artemisia absinthium* L. Тобто у рослинному покриві на сучасному етапі сукцесії більше центральноевропейських видів, аніж східноєвропейських.

За показником *зволоженості* у кар'єрі зростають досить різноманітні групи рослин. У перезволоженому днищі кар'єру, де в період сніготанення і частих дощів утворюються тимчасові водойми, утворює значні за площею асоціації гідрофіт *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. Поряд із ним формують єдині угруповання гігрофіти *Salix fragilis* L. та *Salix triandra* L. Незважаючи на це, найбільше виявлено рослин сухих місцезростань, таких як *Crepis tectorum* L., *Medicago sativa* L., *Verbascum thapsus* L. та ін. Трапляються також ксерофіти *Achillea millefolium* L., *Helichrysum arenarium* (L.) Moench., *Artemisia campestris* L., які зростають на добре дренованих схилах південної експозиції.

За показником *кислотності субстрату* зростають види як на помірно кислому, так і на лужному субстраті. Однак найбільша кількість видів зростає на едафотопі із нейтральною реакцією. У днищі кар'єру, де в ініціальних середньосуглинкових ґрунтах активними є процеси псевдопідзолення та оглеєння, зростають рослини помірно кислих ґрунтів, такі як *Epilobium angustifolium* L., *Artemisia campestris* L. А на схилах кар'єру, де відслонюються карбонатні лесоподібні суглинки, трапляються види, що зростають на слаболужному субстраті: *Tussilago farfara* L., *Echium vulgare* L. та ін.

За показником *збагачення субстрату азотом* зростають рослини, які потребують достатнього або високого вмісту азоту. Це такі види, як *Taraxacum officinale* (L.) Weber., *Verbascum thapsus* L., *Phragmites australis* (Cav.) Trin. та ін. У той же час у кар'єрі зростають види рослин, які притаманні для дуже бідних і вкрай бідних місцезростань (*Achillea millefolium* L. та *Helichrysum arenarium* (L.) Moench.), відповідно.

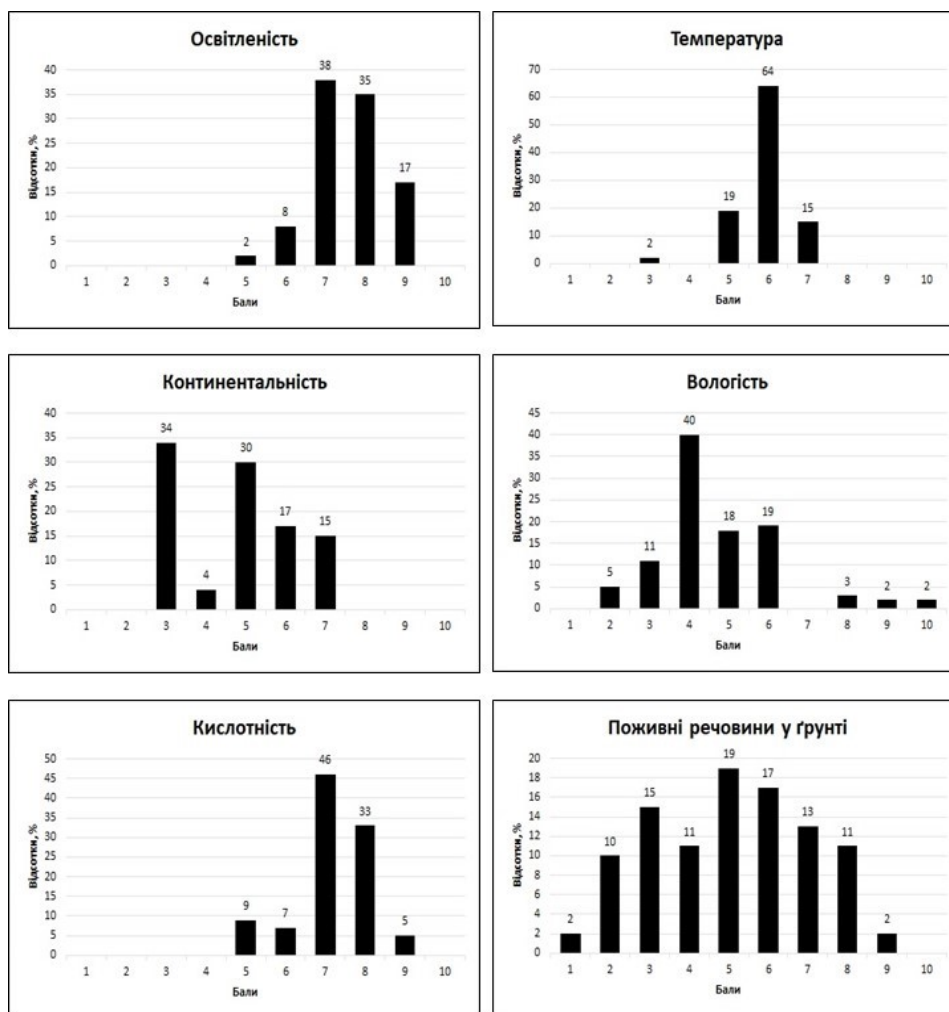


Рис. 1. Співвідношення різних екологічних груп рослин за шкалою Еленберга

Гетехронність та просторова диференціація.

Проведені дослідження дають підстави вважати, що рослинна сукцесія досліджуваного кар'єру зараз, найвірогідніше, перебуває на стадії молодості, яка характеризується різким зростанням видового різноманіття фітоценозів та ускладненням міжвидових фітоценозичних зв'язків. Проте рослинна сукцесія у різних частинах кар'єру відбувається по-різному, що обумовлено особливостями комплексу абіотичних факторів усередині кар'єру, з яких визначальними є рельєф та літологічний субстрат. Останні визначають гетерохронність сукцесії, тобто перебування сукцесії на різних фазах та стадіях, а також обумовлюють поширення відмінних фітоценозичних груп у різних частинах кар'єру. З метою виділення однорідного набору фітоценозів проведено умовне зонування кар'єру за рельєфом, геодинамікою та особливостями рослинних сукцесій. Виділено такі зони:

I. Відвали: позитивні форми рельєфу, складені середньоплейстоценовими важкими та середніми суглинками із низьким вмістом гумусу (0,2-0,3 %), зазнають процесів дефлюкції (зсування матеріалу), тому заселені рослинністю ще дуже мало. Тут зростають переважно деревні види (*Pinus sylvestris* L., *Betula pendula* Roth), які є невибагливими за трофністю і мають міцнішу кореневу систему, стійку до процесів дефлюкції. Однак в останні роки спостерігається поступове заростання північних схилів (*Tussilago farfara* L., *Carex* sp., *Melilotus officinalis* (L.) Pall та ін.), що, імовірно, обумовлено менш виразними циклами набухання-усадки глинистого субстрату.

II. Фронтальна зона: складена дрібними відвалами, купами виробничого сміття, слідами нагортання, відходами неякісної цегли. Такі ділянки почали заселятися ще під час функціонування цегельного заводу, тому тут рослинні угруповання характеризуються найбільшими показниками проективного покриття, а в рослинному покриві досить високу частку становлять представники синантропної рослинності.

III. Днище кар'єру, на нашу думку, доцільно поділити на три підзони.

1. Періодично затоплювані ділянки охоплюють південно-західну частину днища кар'єру, характеризуються важким гранулометричним складом підстильних порід, гідроморфним ініціальним ґрунтоутворенням, періодичним затопленням у весняний період сніготоплення і під час зливових дощів у літній період. Для цієї підзони типовою є гігро- та гідрофітна рослинність (*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud., *Salix fragilis* L., *Salix triandra* L.) та високі показники проективного покриття.

2. Сухе днище займає центральну частину кар'єру, у сніжні роки затоплюється талими сніговими водами навесні, у напрямку схилу відбувається постійна акумуляція делювіально-пролювіальних відкладів, змитих зі схилів. Днище кар'єру розкриває лучний ґрунт середнього плейстоцену, який характеризується підвищеним вмістом гумусу, що обумовлює найшвидшу окупацію території евтрофами. Дерев відносно небагато (*Pinus sylvestris* L., *Betula pendula* Roth.).

3. Пролувіальна підзона розташована у східній частині кар'єру і приурочена до похованої балки,

вивопненої соліфлюкційно-делювіальними лесоподібними суглинками, які дуже піддатливі до ерозійних процесів. Рослинність цієї підзони у зв'язку із динамічною седиментацією суглинків у днищі відносно розріджена, високу роль відіграють деревні породи *Pinus sylvestris* L. та *Betula pendula* Roth.

IV. Зона штучної тераси, утвореної у результаті видобутку верхньоплейстоценових суглинків. Тераса підвищується над рівнем днища на 4-7 м. Характеризується достатньо високою стійкістю рельєфу. Це зумовило першочергове заселення тераси рослинністю. Однак проективне покриття тераси незначне, у зв'язку із відновленням видобутку мінеральної сировини місцевим населенням в останні роки.

V. Зона схилів кар'єру характеризується високою динамікою, низкою геоморфологічних процесів (осипи, обвали, осуви, зсуви, лінійна та площинна ерозія). У зв'язку із відмінним літологічним складом кожного стратиграфічного горизонту мікрорельєф схилу є складним: із мікротерасами, ускладнений ерозійними формами рельєфу та потужним делювіальним шлейфом в основі. Рослини на крутих схилах зростають на більш-менш стабільних ділянках. Більш заселеними є західна частина кар'єру та місця виходу на денну поверхню гумусованих викопних ґрунтів.

VI. Зона брівки кар'єру розташована із тилової частини кар'єру. Вона характеризується певними виробленими формами рельєфу (невеликими витягнутими заглибленнями глибиною до 2-3 м), значні площі не були трансформовані. Заглиблення у східній частині є місцем витоків ерозійних борозн, тому вони досі заселені погано. Ця зона є буферною, тому тут рослинні сукцесії найшвидше проходять стадії розвитку, а видовий склад дуже сильно наближається до фонового ландшафту. Значну частку займають представники синантропної рослинності.

Висновки. За період п'ятирічних спостережень установлено такі особливості рослинної сукцесії в досліджуваному кар'єрі:

Рослинна сукцесія перебуває на стадії молодості. За п'ятирічний період досліджень відбувся перехід від ініціальної стадії, коли рослинні угруповання спостерігалися у вигляді ізольованих осередків у днищі кар'єру, до стадії молодості, коли більше половини кар'єру заселено рослинними асоціаціями з появою між- та внутрішньовидової конкуренції.

2. Аномально швидке заселення кар'єру рослинністю. Станом на жовтень 2019 року в кар'єрі виявлено 72 таксони рослин, з яких 6 видів дерев, 1 вид кущів та 65 видів трав (48 видів полікарпиків, 15 видів монокарпиків і 3 види земноводних трав), тоді як у 2015 році було виявлено всього 25 видів рослин, з яких тих же 6 видів дерев, 1 вид кущів та 19 видів трав. Найбільша кількість видів належить до родин *Asteraceae* і *Fabaceae*, які характеризуються широкою екологічною амплітудою. Настільки швидке заселення кар'єру рослинністю пов'язане передусім із розкриттям кар'єром горизонтів похованих ґрунтів плейстоцену, які характеризуються відносно високим вмістом поживних речовин.

3. Гетерохронність сукцесії – у відмінних частинах кар'єру сукцесія перебуває на різних стадіях. Зокрема, у днищі кар'єру рослинна сукцесія перебуває на стадії молодості з найбільшими показниками видового різноманіття, проективного покриття та ясності, а також високою участю дерев у фітоценозах (*Pinus sylvestris* L., *Betula pendula* Roth., *Salix caprea* L. та ін.). У той же час досі активні геоморфологічні процеси на схилах унеможливають формування тут постійних фітоценозів.

4. Мікрональність рослинної сукцесії, що обумовлена просторовою диференціацією абіотичних факторів усередині кар'єру. Виділено такі мікрозони рослинної сукцесії: відвали, фронтальна зона, днище кар'єру (періодично затоплювані ділянки, сухе днище, пролювіальний шлейф), антропогенна тераса, схили, брівка кар'єру.

5. Різноманіття екологічних груп рослинності у кар'єрі. Контрастність геоморфологічних та едафічних умов у кар'єрі обумовлена поширенням відмінних екологічних груп рослинності на сучасному етапі сукцесії. За освітленістю повністю домінують геліофіти; за термічним режимом усі рослини належать до тих, що зростають у помірному та помірно-теплому кліматі. Найбільша диференціація екологічних груп спостерігається за вологістю (від ксерофітів до гідрофітів), а також за вмістом азоту в субстраті (від бідних на азот місцезростань до багатих на азот ділянок).

Список використаних джерел:

1. Білонога В. М. Первинні сукцесії техногенних ландшафтів сірчанних родовищ / В. М. Білонога, А. К. Малиновський // Праці Наукового товариства ім. Шевченка. – 2001. – № 7. – С. 75–82.
2. Бончковський О. С. Новий Тік – новий розріз лесово-ґрунтової серії неоплейстоцену Волинської височини / О. С. Бончковський // Фізична географія та геоморфологія. – 2015. – Вип. 3 (79). – С. 77–89.
3. Вадюнина А. Методы исследования физических свойств почв и грунтов / А. Вадюнина, С. Корчагина. – Москва: Высшая школа, 1961.
4. Гроссгейм А. А. Флора Кавказа / А. А. Гроссгейм. – Баку: Изд-во АзФАН, 1939. – 564 с.
5. Гусев А. П. Начальные стадии сукцессии на песчаных техноэко-топах в широколиственно-лесном и южнотаежном ландшафтах / А. П. Гусев, Д. В. Веселкин // Весник ВДУ. – 2015. – 5(89). – С. 41–46.
6. Екофлора України / ред. Я. П. Дідух. – Київ: Фітосоціоцентр, 2000. – 284 с.
7. Коронатова Н. Г. Сукцессия фитоценозов при зарастании выработанных карьеров в подзоне северной тайги Западной Сибири / Н. Г. Коронатова, Е. В. Миляева // Сибирский экологический журнал. – 2011. – № 5. – С. 697–705.
8. Моторина Л. В. Сравнительная характеристика растительного покрова на отвалах открытых разработок бурого угля и железной руды / Л. В. Моторина, Т. И. Ижевская // Растения и промышленная среда. – Свердловск: Изд-во УрГУ, 1980. – [Сб. 7]. – С. 80–87.
9. Определитель высших растений Украины / ред.: Ю. Н. Прокудин и др. – Киев: Наукова думка, 1987. – 548 с.
10. Попович В. В. Фітомеліорація згасаючих териконів Львівсько-Волинського вугільного басейну / В. В. Попович // Львів: ЛДУ БЖД, 2014.
11. Серебряков И. Г. Жизненные формы высших растений и их изучение / И. Г. Серебряков // Полевая геоботаника. – М.; Л.: Наука, 1964. – № 3. – С. 146–205.
12. Скворцов А. К. Гербарий. Пособие по методике и технике / А. К. Скворцов. – Москва: Наука, 1977. – 199 с.
13. Фесенко О. С. Локально-катастрофические сукцессии лесной растительности в зонах расширения шахтных полей западного Донбаса / О. С. Фесенко // Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. – 2006. – № 38. – С. 180–182.
14. Флора европейской части СССР / ред. Ф. Федорова. – Л.: Изд-во "Наука", Ленинградское отделение, 1974. – 404 с.
15. Хлизіна Н. В. Літофільні сукцесії в скельних екотопах відвалів гірничозбагачувальних комбінатів в Кривбасу / Н. В. Хлизіна // Ґрунтознавство. – 2007. – № 8. – С. 57–65.
16. Цвелев Н. Краткий конспект сосудистых споровых растений Восточной Европы / Н. Цвелев // Новости систематики высших растений. – 2005. – С. 7–32.
17. Ellenberg H. Zeigerwerte der Gefasspflanzen Mitteleuropas / H. Ellenberg // Göttingen: Goltze, 1974. – P. 97.
18. Khater C. Application of restoration ecology principles to the practice of limestone quarry rehabilitation in Lebanon / C. Khater, M. Arnaud // Lebanese Science Journal. – 2007. – № 1(8). – P. 19–28.
19. Mosyakin S. Vascular plants of Ukraine. A nomenclature checklist / S. Mosyakin, M. Fedoronchuk. – Kiev: XXIV, 1999.
20. Rahmonov O. Relations between vegetation and soil in initial succession phases in post-sand excavations / O. Rahmonov, A. Szymczyk // Ekologia. – 2010. – № 4(29). – С. 412–429.
21. Spontaneous succession in limestone quarries as an effective restoration tool for endangered arthropods and plants / R. Tropek, T. Kadlec, P. Karesova et al. // Journal of Applied Ecology. – 2010. – № 47. – P. 139–147.
22. Trnková R. Spontaneous succession of vegetation on acidic bedrock in quarries in the Czech Republic / R. Trnková, K. Řehounková, K. Prach // Preslia. 82. – 2010. – P. 333–343.
23. Tutin T. Flora Europaea. Second edition / T. Tutin, V. Heywood, N. Burges // New York, 1993.

24. Tutin T. Flora Europaea / T. Tutin, V. Heywood, N. Burges // Cambridge : At the university press, 1964.

Reference:

1. Bilonoha M., Malynovskyi K. Primary successions of man-made landscapes of sulfur deposits, Proceedings of the Shevchenko Scientific Society, 2001; 7: 75–82.
2. Bonchkovskiy O.S. Novyi Tik – a new section of the Neo-Pleistocene loess-soil formation of Volyn Upland. Physical Geography and Geomorphology, 2015; 3 (79): 77–89.
3. Vadyunina A., Korchagina S. Methods of studying the physical properties of soils and rocks. Moscow: Higher School, 1961.
4. Grossgeym A. Caucasus Flora. Baku: AzFAN Publishing House, 1939: 564.
5. Gusev A., Veselkin D. Initial succession stages on sand technocotopes in broad-leaved forest and south taiga landscapes. Vesnik VDU, 2015; 5(89): 41–46.
6. Didukh Y. Ecoflora of Ukraine. Kyiv: Phytosociocenter, 2000: 284.
7. Koronova N., Milyayeva E. H. F. Succession of phytocenoses during overgrowing of quarries in the northern taiga subarea of Western Siberia. Siberian Ecological Journal, 2011; 5: 697–705.
8. Motorina L., Izhevskaya T. Comparative characteristics of vegetation cover on open-cast mine openings of brown coal and iron ore. Plants and industrial environment. Sverdlovsk: Publishing house of USU, 1980; 7: 80–87.
9. Prokudin Y. Key to Higher Plants of Ukraine, Kiev: Scientific Opinion, 1987: 548.
10. Popovych V. Phytomelioration of the extinguished heaps of the Lviv-Volyn coal area: LDU BZD, 2014.
11. Serebryakov I. Life forms of higher plants and their study. Field geobotany. Moscow: Science, 1964; 3: 146–205.
12. Skvortsov A. Herbarium. Manual on a technique and equipment. Moscow: Science, 1977: 199.
13. Fesenko O. Local-catastrophic successions of forest vegetation in the expansion zones of mine fields in western Donbas. Bulletin of Dnipropetrovsk University. Biology, 2006; 38: 180–182.

14. Fedorova F. Flora of the European part of the USSR. Leningrad: Nauka Publishing House, 1974: 404.

15. Khlyzina N. Lithophilic successions in rock ecotopes of dumps of mining and processing enterprises of Kryvbas. Pedology, 2007; 8: 57–65.
16. Tsvelev N. A brief synopsis of vascular spore plants in Eastern Europe. Systematics news of higher plants, 2005: 7–32.
17. Ellenberg H. Zeigerwerte der Gefasspflanzen Mitteleuropas. Gottingen: Goltze, 1974: 97.
18. Khater C., Arnaud M. Application of restoration ecology principles to the practice of limestone quarry rehabilitation in Lebanon. Lebanese Science Journal, 2007: 1 (8): 19–28.
19. Mosyakin S., Fedoronchuk M. Vascular plants of Ukraine. A nomenclature checklist. Kiev: XXIV, 1999.
20. Rahmonov O., Szymczyk A. Relations between vegetation and soil in initial succession phases in post-sand excavations. Ekologia, 2010: 4 (29): 412–429.
21. Tropek R., Kadlec T., Karesova P. and other. Spontaneous succession in limestone quarries as an effective restoration tool for endangered arthropods and plants. Journal of Applied Ecology, 2010; 47: 139–147.
22. Trnková R., Řehouňková K., Prach K. Spontaneous succession of vegetation on acidic bedrock in quarries in the Czech Republic. Preslia, 82, 2010; 333–343.
23. Tutin T., Heywood V., Burges N. Flora Europaea. Second edition. New York, 1993.
24. Tutin T., Heywood V., Burges N. Flora Europaea. Cambridge: At the university press, 1964.

Надійшла до редколегії 22.01.2019

Отримано виправлений варіант 24.02.2019

Підписано до друку 24.02.2019

Received in the editorial 22.01.2019

Received a revised version on 24.02.2019

Signed in the press on 24.02.2019

A. Bonchkovskiy, stud.,
O. Bezsmertna, kand. biol. nauk
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ОСОБЕННОСТИ РАСТИТЕЛЬНОЙ СУКЦЕССИИ В КАРЬЕРЕ КИРПИЧНОГО ЗАВОДА В С. НОВЫЙ ТОК (РОВЕНСКАЯ ОБЛАСТЬ)

Прекращение эксплуатации карьеров является причиной поселения пионерных растений, которые осваивают свободные от растительно-почвенного покрова участки в определенной последовательности, которые называют сукцессиями. Теоретические основы восстановительных растительных сукцессий в карьерах разработаны пока что относительно слабо, хотя эмпирических исследований, посвященных этой проблематике, много. Объектом нашего исследования является карьер кирпичного завода, который находится на восточной окраине с. Новый Ток (Демидовский район, Ровенская область) в центральной части Волинской возвышенности, в 27 км к югу от г. Луцк. С 2008 года, с момента прекращения функционирования кирпичного завода, в карьере имеет место первичная растительная сукцессия, которая сейчас находится на стадии молодости и характеризуется ростом биоразнообразия. По состоянию на осень 2019 года в карьере определены 72 вида растений, в том числе 6 видов деревьев, 1 вид кустарников и 65 видов трав. Исходя из результатов систематического анализа, среди выявленных видов преобладают представители семейств Asteraceae и Fabaceae. Определены преобладающие эколого-биологические группы растений в карьере: по отношению к освещению преобладают гелиофиты; в отношении к термическому режиму наибольшую долю составляют виды умеренно-теплого климата; в растительном покрове на современном этапе сукцессии в целом преобладают центральноевропейские виды. На основе анализа заселения растительными ассоциациями и появления межвидовой и внутривидовой конкуренции установлено, что растительная сукцессия в исследуемом карьере находится на стадии молодости. Также обнаружены гетерохронность и микрозональная дифференциация процессов сукцессии в разных участках карьера. Отличие прохождения стадий сукцессии в зависимости от особенностей рельефа взято за основу для микрозонирования карьера. Установлено, что на современном этапе сукцессии определяющими факторами качественного и количественного состава фитоценозов являются абиотические факторы карьера, особенно морфология и динамика рельефа, а также литолого-стратиграфическое строение отложений. Выявлена инициальная стадия почвенной сукцессии, что стало возможным в связи с накоплением значительного количества мортмассы в последние годы.

Ключевые слова: растительная сукцессия, фитоценоз, глиняный карьер, гетерохронность.

A. Bonchkovskiy, stud.,
O. Bezsmertna, Ph.D.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

FEATURES OF VEGETATION SUCCESSION IN THE LOESS QUARRY OF THE BRICK FACTORY IN NOVYI TIK VILLAGE (RIVNE REGION, UKRAINE)

Termination of quarries is the reason for the settlement of pioneer plants, which exploit "free" areas of soil in a certain sequence, called successions. The theoretical foundations of restorative plant successions in the quarries are still relatively poorly developed, although there is much empirical research on the subject. The object of our study is the quarry of a brick factory located in the eastern outskirts of the village. Novyi Tik (Demydiv district, Rivne region) in the central part of Volyn height, 27 km south of Lutsk. Since 2008, when the brick factory ceased to function in the quarry, there has been a primary plant succession, which is now at a youth stage and is characterized by an increase in biodiversity. As of autumn 2019, 72 plants species have been identified in the quarry, including 6 species of trees, 1 species of shrubs and 65 species of grasses. According to the results of the systematic analyze, the Asteraceae and Fabaceae families predominate. The prevailing ecological groups of plants in the quarry are determined: in relation to lighting prevail heliophytes; in relation to the thermal regime, the largest proportion is made up of temperate-warm climate species; in the vegetation cover at the present stage of succession, Central European species prevail. Based on the analysis of the population of plant associations and the appearance of interspecific and intraspecific competition, it is established that plant succession in the studied quarry is at a youth stage. Also, heterochrony and microzonal differentiation of succession processes in different parts of the quarry are found. The difference in the passage of succession stages depending on the features of the relief is taken as the basis for the quarry microzonation. It has been established that at the present stage of vegetation succession, the determining factor in the qualitative and quantitative composition of plant communities is abiotic quarry factors, especially morphology and relief dynamics and lithological-stratigraphic structure of deposits. The initial stage of soil succession was revealed, which became possible due to the accumulation of a significant amount of mortmass in recent years.

Keywords: vegetation succession, plant community, loess quarry, heterochronism.

UDK 57.084.1:615.357:616-091.814:616-056.527
DOI: https://doi.org/10.17721/1728_2748.2020.80.50-56

O. Kalmukova, Ph.D. stud.,
K. Chumak, stud.,
O. Voronina, Ph.D.,
M. Dzerzhynsky, Dr. Sc.

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

MORPHO-FUNCTIONAL STATE OF RATS PANCREAS UNDER MELATONIN ADMINISTRATION DURING OBESITY DEVELOPMENT: CHRONOTHERAPEUTIC APPROACH

Overweight and obesity often cause some comorbidity like insulin resistance, diabetes type 2, cancer, cardio-vascular pathology etc. Pancreas is the important organ in carbohydrate metabolism and insulin signaling, that under obesity conditions undergo pathologic changes. For diminish adverse effects of obesity in the role of therapeutic agent is considered melatonin – pineal gland pleiotropic multifunctional molecule. In view of development precision medicine, which include processing personalized data of whole genome sequencing, microbiome, individual day/night regime etc., time selection of drug administration for maximize efficacy and minimize side effects to each patient in according of private organism circadian rhythm is the main goal of chronotherapy approach. The aim of our study was to determine morpho-functional state (morphology characteristic of exocrine and endocrine part; morphometric parameters: areas of pancreatic islets, acini and acinar cell nucleus) of pancreas in rats with high-calorie (high fat) diet-induced obesity after melatonin administration in determined time of the day (evening and morning). Melatonin was administered daily by gavage for 7 weeks in dose 30 mg/kg 1 h before lights-off (ZT11, evening) or 1 h after lights-on (ZT01, morning) rats with high-calorie diet (HCD). Rats with HCD had morbid changes in pancreas cells morphology of exocrine and endocrine part, which manifested in presence of macrophage and leukocyte infiltration of islets, vacuolization and lipid droplets in acinocytes cytoplasm, while areas of islets, acini and acinar cell nucleus decreased. Obese rats with melatonin administration demonstrate amelioration of HCD-associated changes in pancreas. Namely, in rats with development obesity melatonin administrations increased area of pancreatic islets in comparison to HCD group, moreover pancreas acini area reach control values. Also were observed difference between time-of-day interventions of melatonin on acinar cell nucleus area parameters: evening administration showed more strong action in increased to control level direction. Together, is suggesting about melatonin ameliorative role on morpho-functional state of pancreas exocrine and endocrine part under HCD-induced obesity conditions, additionally evening administration 1 h before light-off displayed more beneficial influence compared to morning.

Keywords: melatonin, obesity, chronobiology, pancreatic islets, high-fat diet, pancreatic acinar cells.

Introduction. Obesity is one of the major diseases in the modern world. It is a multifactorial disease associated with several metabolic disorders, including insulin resistance, hyperglycemia, dyslipidemia and high blood pressure, which exacerbate each other [1]. They increase the risk of cardiovascular disease and type 2 diabetes, and their combination is called metabolic syndrome. Factors of metabolic syndrome include dysglycemia, atherogenic dyslipidemia, insulin resistance, hypertension and, in fact, obesity [2].

Worldwide, about 3.4 million people die from obesity every year, which is more than from underweight at the same time [3]. For every 5-unit increase in BMI above 25 kg/m², overall mortality increases by 29 %, vascular pathology mortality by 41 %, and diabetes-related mortality by 210 % [4]. According to the World Health Organization (WHO), obesity in Europe affects between 20 % and 30 % of adults, while in Ukraine, obesity are harmed 16 % of men and 26 % of women, whereas among children and adolescents, obesity expanded by 11.1 % [5].

One of the organs most affected by obesity is the pancreas, while disorders in its work affect the whole body and cause various diseases. Obesity is accompanied by ectopic fat accumulation, which leads to pancreatic steatosis, which in combination with metabolic syndrome is called non-alcoholic fatty pancreas disease (NAFPD). It is also possible to replace acinar cells with adipocytes. NAFPD is accompanied by infiltration of organ tissues by adipocytes and can develop into nonalcoholic fatty steatopancreatitis (NASP). Ectopic fat-related oxidative stress and adipocyte-produced adipocytokines lead to inflammation and organ dysfunction [6]. All of this is likely to increase the risk of pancreatitis, pancreatic cancer and B-cell dysfunction. Studies in Europe and America indicate that obesity, accompanied by acute pancreatitis of different etiologies, promotes severe pancreatitis, increases the risk of complications and increases mortality [7].

Nowadays the problem of acute pancreatitis is one of the most complex and unresolved in modern pancreatology, which often linked with increased body mass index (BMI) and mediated through elevated triglycerides [8]. The incidence of acute pancreatitis according to WHO is 20-80 cases per 100,000 population per year. The severe form accounts for about 15 % of all cases of acute pancreatitis. In necrotic pancreatitis, the mortality rate reaches 20-40 %. High lethality is associated with excessive activation of proteolysis, severe endotoxemia, and purulent-necrotic complications caused by both the lesion of the pancreas itself and parapancreatic area [9].

Today, one of the remedies for correcting pancreatic function is melatonin (MT), a hormone that was isolated from the pineal gland in 1958 by Aaron Lerner, but the link between the pineal gland and carbohydrate metabolism was established 75 years ago [10]. Since then, many studies have tested the effects of melatonin on carbohydrate metabolism, blood glucose and insulin secretion, and many conflicting results have been obtained, although all animals have elevated blood levels of melatonin at night and decreased in the afternoon, the physiological processes may be different depending on the lifestyle and modes of administration. Although melatonin receptors have been found in the pancreas, the role of melatonin in the pancreas has not yet been fully established [11]. In addition, although many studies have been devoted to the antioxidant effect of melatonin and its metabolites, there are doubts about the efficacy of melatonin as an antioxidant at physiological concentrations [12].

Thus, the aim of our study was to evaluate influence of melatonin different time (morning and evening) administration on pancreas morpho-functional state in rats with high-calorie diet-induced obesity.

Materials and methods. White nonlinear male rats weighing 100-120 g were used in this study. The light cycle was 12-h light and 12-h darkness, with lights-off at 19:00 h (ZT12). All experiments on animals were carried out in

compliance with the international principles of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experimental and other scientific purposes (European Convention, Strasburg, 1986), Article 26 of the Law of Ukraine "On the Protection of Animals from Cruelty" (No. 3447-IV, February 21, 2006) as well as all norms of bioethics and biological safety.

During the first week, all animals received standard rodent chow. On the 8th day, the animals were randomized into 2 groups: control animals received standard chow (15,27 kJ·g⁻¹) for 10 weeks and experimental rats received high-calorie diet (HCD) (28,71 kJ·g⁻¹) consisting of standard chow (60 %), lard (10 %), eggs (10 %), sugar (9 %), peanut (5 %), dry milk (5 %) and vegetable oil (1 %) [13]. Food and water were available ad libitum. To confirm the development of obesity the animals were weighed one time a week until the average body gain reached a significant difference of at least 30 % between the two groups and the respective animals were classified as having the normal body mass (Control) and those with development of obesity (HCD). Rats of HCD group were divided into two subgroups: one subgroup received MT (group HCD_{ZT01}) in the morning 1 hour after light-on; animals of the second subgroups obtained MT administrations 1 h before light-off (group HCD_{ZT11}). Thus, the experimental four subgroups are indicated below as: normal body mass (control), HCD, HCD_{ZT01}, HCD_{ZT11}.

Melatonin (Alcon Biosciences, USA) was administered daily by single peroral by gavage introductions for 7 wk (30 mg/kg). Melatonin treatment was begun at 6th week of study after obesity is developed.

On the last day of the experiment, the animals were decapitated, and then the pancreas was isolated.

Histological examination was performed to characterize the morphology and functional status of pancreas. Fragments of pancreas in the size of 1x1 cm were fixed in 4 % of paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer for 72 hours, after which they were dehydrated and embedded into paraffin according to a standard procedure. From the paraffin blocks, 5 µm sections were performed and stained with Bemer's hematoxylin and eosin. Further examination of sections was performed using a light microscope BX41 (Olympus, Japan). Microphotographs were taken using the DP20 (Olympus, Japan) digital camera and the Quick-PHOTO MICRO software (Promicra, Czech Republic).

The cross-sectional area of the acinar cell nucleus and the pancreatic acini were used as criteria for assessing the morphology and functional status of the pancreas exocrine part; and the cross-sectional area of the pancreatic islets was used to evaluation the state of the pancreas endocrine part. All parameters were measured using the Image J software (National Institutes of Health, USA).

Statistical data analysis was performed using the Statistica 6.0 (Stat-Soft, USA) and Microsoft Excel 2010 software (Microsoft, USA). The distribution of values was estimated using Shapiro-Wilk W-test. Since the deviation of these values distribution of from the normality was minor, to evaluate the differences between the values we used Student's t-test with a posteriori Bonferroni test. The differences with probability of the null hypothesis $p < 0.05$ were considered significant. The obtained results are presented as the mean $\pm$ standard error of mean.

Results and discussion. During the experiment, morphological changes in the histological structure of the pan-

creas in a group which receive a high-calorie diet were recorded (**Fig. 1 A, B**). In the exocrine part of the pancreas, along with normal tightly packed acini containing acinocytes in which there is pronounced acidophilia on the apical part and basophilia on the basal part of the cell, containing a rounded or oval nucleus (**Fig. 1 C**); was appeared basophilic cells (**Fig. 1 A**, asterisk), that can be may be acinocytes with impaired mechanism of synthesis and excretion of enzymes (that characterize reduced to absent zymogen granules and interstitial fibrosis [14]), or possibly macrophages, the accumulation of which is often accompanied by inflammation [15]. Macrophage infiltration may accompany interleukin-1 β secretion and decreases insulin secretion [16]. In the cytoplasm of some acinar cells were indicated vacuolization (**Fig. 1 A**, arrow) with structures that resembles lamellar bodies and which appear during activation of autophagy process [17]. In some acinar cells were explored lipid microvesicular droplets in apical side (**Fig. 1 B**, arrowheads) that is evidenced about fatty dystrophy in exocrine part of pancreas [18]. Pancreas of groups that received melatonin (both HCD_{ZT01} and HCD_{ZT11}) mostly did not demonstrate acute pathologic changes (**Fig. 1 D**) in exocrine part of pancreas and resemble to morphology pancreas of control group. Distinguish features between HCD_{ZT01} and HCD_{ZT11} did not observe.

Besides was marked changes in endocrine part of pancreas under conditions of HCD (**Fig. 2 A**): in pancreatic islets were destroyed (that can be caused by apoptosis of β -islets cells with followed fibrosis [19]), in some cases were observed leukocytes infiltrate in peripheral part of islets (**Fig. 2 A** arrow), that may also include macrophage with stimulation of inflame [20]. While in control group (**Fig. 2 C**) nucleus in cells of pancreas islets were light with good visible nucleolus and heterochromatin, in HCD group nucleus were dark with low synthetic activity, that resulting in falling acidophilic features of cytoplasm (**Fig. 2 B** asterisk). Groups that received melatonin (both HCD_{ZT01} and HCD_{ZT11}) mostly did not demonstrate acute pathologic changes (**Fig. 2 D**) in endocrine part of pancreas and resemble to morphology control group. Distinguish features in morphology of pancreatic islets between HCD_{ZT01} and HCD_{ZT11} did not observe.

The changes we described in HCD group accord with data of other HCD obesity model within 3 and 6 months, namely: lesions of the endocrine part in which some pancreatic islets were fibrotic and disorganized, in the tissues of the pancreas were signs of inflammation, contained macrophages and lymphocytes [21].

The morphometric assay denote on negative influence of HCD on the pancreas. The average area of the pancreatic islets for the HCD group decreased significantly by 55 % in compared to control (**Fig. 3**). Reduction of islets was shown also in high fat diet [22] and that can impact on insulin signaling destructions. In the HCD_{ZT01} group with morning melatonin administration, the average area of pancreatic islets decreased by 35 % in compared to control group and increased by 45 % in compared to HCD group. In the HCD_{ZT11} group with evening melatonin administration, the average area of the islets decreased by 24 % in compared to control group and increased by 69 % in compared to HCD group. However, no significant difference between HCD_{ZT01} and HCD_{ZT11} groups in the areas of the pancreatic islets is observed.

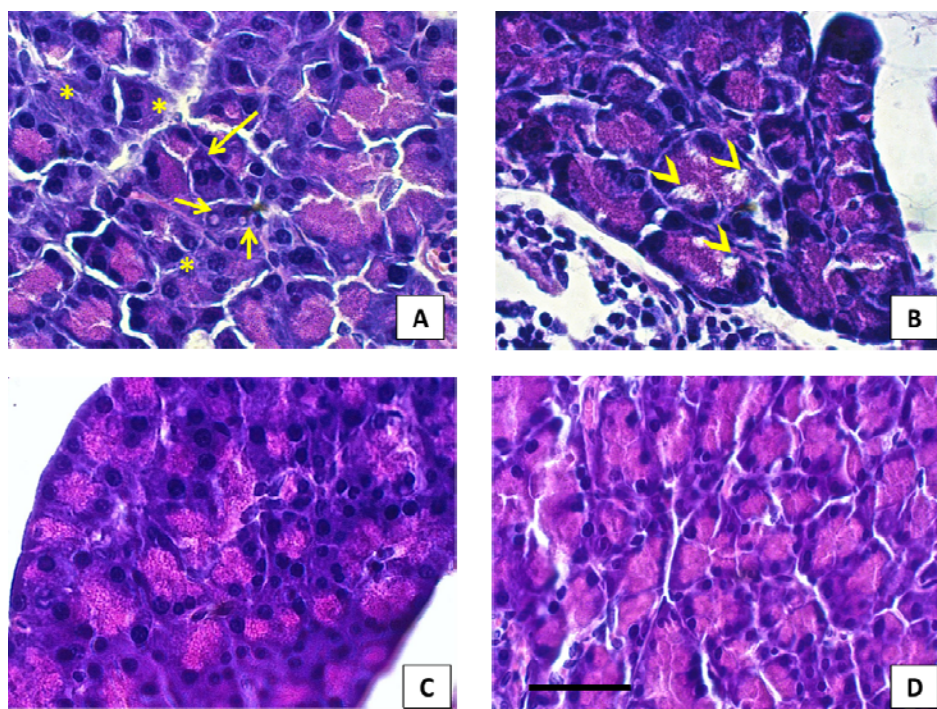


Fig. 1. Microphotographs of rats' pancreas exocrine part sections: A, B – HCD group; C – control group; D – HCD_{ZT11} group; hematoxylin-eosin staining; scale bar 30 μ m. Notes: arrow – cytoplasmic vacuolization of acinar cells, asterisk – basophilia of apical cytoplasmic part in acinar cells, arrowheads – microvesicular lipid droplet inclusions in the cytoplasm of acinar cells

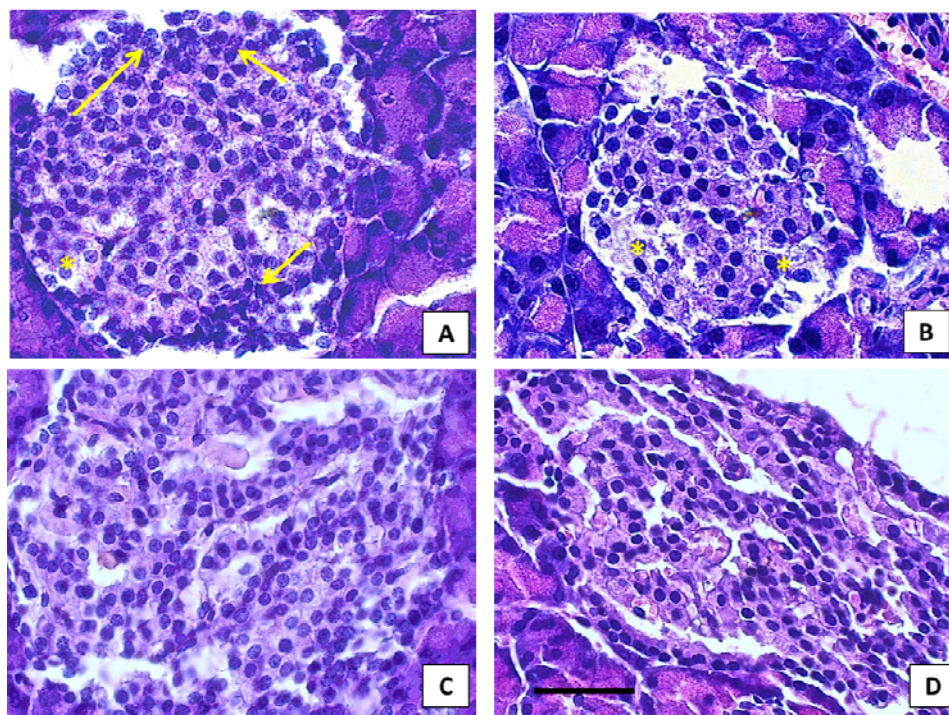


Fig. 2. Microphotographs of rats' pancreas endocrine part sections: A, B – HCD group; C – control group; D – HCD_{ZT11} group; hematoxylin-eosin staining; scale bar 30 μ m. Notes: arrow – leukocyte infiltration, asterisk – low acidophilic color of cytoplasm

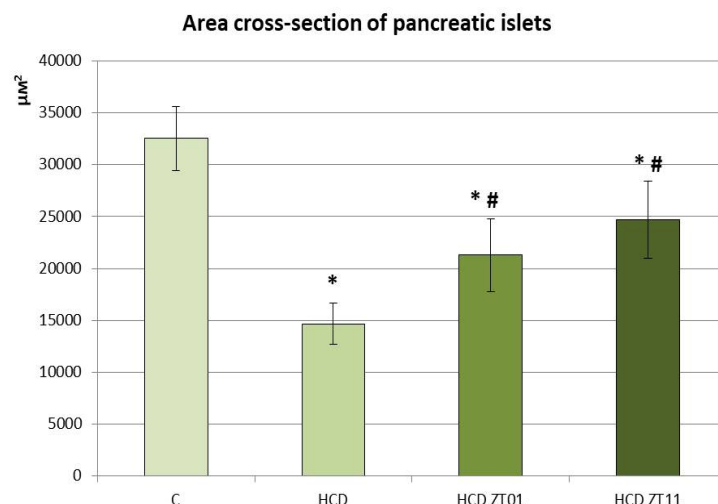


Fig. 3. The morphometric analysis data of the rats' pancreatic islets area.
C – control, HCD – obesity, HCD_{ZT01} – morning melatonin administration to rats with HCD, HCD_{ZT11} – evening melatonin administration to rats with HCD

Notes: * – a significant difference between the control and experimental groups, $p \leq 0.05$; # – a significant difference between the HCD and experimental groups, $p \leq 0.05$

In exocrine part of pancreas were analyzed cross-section areas of acini and acinar cell nucleus (Fig. 4). In the HCD group the acini area decreased by 30 % compared to control. At the same time, in the HCD_{ZT01} group with morning introduction of melatonin the acini area increased by 33 %, in HCD_{ZT11} increased by 47 % compared to HCD. Pancreatic acini area of melatonin treatment groups had reached control level and did not significant differ between each other group.

During obesity development area cross-section of acinar nucleus (Fig. 4) in HCD group decreased by 22 % compared to control. Decreasing acini areas as well as

acinocyte nucleus areas may indicate about diminish in protein synthesis in these cells. In the HCD_{ZT01} group, the nucleus area increased by 9 % compared to the HCD group, while compared to the control its level decreased by 21 %. In the HCD_{ZT11} group area of acinar nucleus increased by 21 % compared to the HCD group, but still by 11 % less than the corresponding parameter in the control group. In this case, a significant difference was found between the results obtained in the morning and evening administration: the average nucleus area at the HCD_{ZT11} group increased by 10 % than in the HCD_{ZT01}.

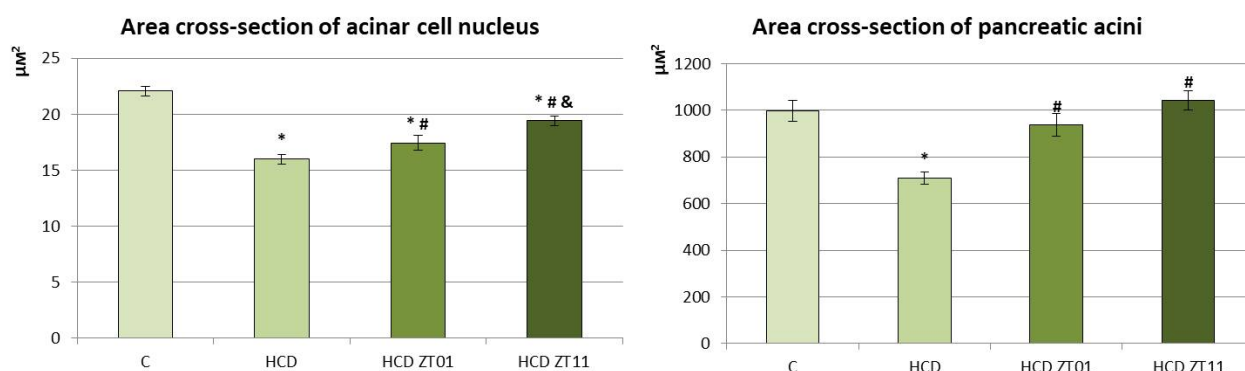


Fig. 4. The morphometric analysis data of the rats' pancreatic exocrine part. C – control, HCD – obesity, HCD_{ZT01} – morning melatonin administration to rats with HCD, HCD_{ZT11} – evening melatonin administration to rats with HCD.

Notes: * – a significant difference between the control and experimental groups, $p \leq 0.05$;

– a significant difference between the HCD and experimental groups, $p \leq 0.05$;

& – a significant difference between the HCD_{ZT01} and HCD_{ZT11}, $p \leq 0.05$

Thus, in the high-calorie diet group abnormal changes in the exocrine and endocrine parts of pancreas due to obesity development were detected. Our sections contained signs that obesity leads to ectopic accumulation of fat in cells, which is accompanied by inflammation. Obesity inflammation is observed in the liver, muscles, adipose tissue and pancreas. Obesity leads to organ infiltration by macrophages that produce proinflammatory cytokines [23]. Such macrophages were found in the morphological analysis of pancreas sections. A particular role in the onset of

inflammation is put on IL-1 β , which stimulates the production of a number of proinflammatory factors. IL-1 β itself is probably produced in response to the prolonged action of high concentrations of free fatty acids and glucose, which lead to cell damage and apoptosis. In addition, adipocytes also have the ability to synthesize cytokines and chemokines. Prolonged inflammation leads to a decrease in the pancreatic parenchyma mass and the fibrosis appearance [24], which we also observed on drugs.

Other animal studies have also shown that a high-fat diet leads to fibrosis. Obesity-induced insulin resistance, inflammation and lipotoxicity lead to pancreatic endocrine dysfunction and can cause decreasing β -cell number and thus diminished islet area [25]. Studies in mice have shown that a high-calorie diet with fat and carbohydrates leads to an increase in β -cell apoptosis, while a high-carbohydrate diet over the same period (12 weeks) moderate to an increase in β -cell mass and insulin secretion [26].

In humans, clinical studies suggest that there is a link between obesity and impaired endocrine pancreatic function, but most clinical studies do not find apparent abnormalities of exocrine pancreatic function in overweight individuals [27].

The melatonin usage in obesity development conditions partially retained the morpho-functional state of the pancreas. This is due to its nonspecific effects (antioxidant, anti-inflammatory) and specific effects on carbohydrate metabolism (MT1 and MT2 receptors have been detected in β -cells and α -cells). Also, with intraluminal administration, melatonin strongly stimulates the secretion of pancreatic enzymes, which is probably related to its effect on the digestive tract receptors [28].

Studies in mice using pinealectomy have shown that it leads to insulin resistance and leptin resistance. Exogenous administration of melatonin returned glucose metabolism back to normal level. In addition, a study in mice fed a high-fat diet showed that administration of melatonin corrected the reduced insulin sensitivity. In a mouse experiment with a genetic model of obesity, melatonin was shown to reduce inflammation and obesity-induced alteration of adipokine levels. Experiments indicate the lipolytic action of melatonin, which is achieved by stimulating the sympathetic nervous system [29]. Melatonin is known as an insulin synthesis inhibitor that can protect β -cells from damage by over-insulin synthesis during obesity.

A study in pigs with acute pancreatitis showed that the group receiving melatonin had less pronounced acinar and fat necrosis [30]. There are experiments that suggest the possibility of mitigating induced hyperglycemia obesity through the use of melatonin. This study showed the detrimental effect of smoking on the pancreas, which manifested in the reduction of pancreatic islets. Melatonin in this study reduced inflammation and apoptosis levels β -cells, improved the status and function of β -cells, and also increase insulin secretion [31].

Thus, the results of this experiment do not contradict the results of such experiments except those where a high carbohydrate diet was used.

Also in this experiment, a significant difference in the cross-sectional area of acinocyte nuclei was detected, depending on the time of melatonin administration. In the study of other parameters with the evening administration of melatonin, the results obtained were also closer to those in the control group. This difference may be related to the circadian rhythm of the body. Circadian rhythm is controlled at the level of the body – the pacemaker and the molecular clock at the cellular level. The central mammalian pacemaker is the suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus, and there are also peripheral pacemakers. The pacemaker is guided by an auto-transcriptional / translational feedback loop provided by clock genes. Interestingly, the pancreas has its own pacemaker rhythm. Thus, although insulin and glucagon secretion are dependent on food intake, experiments have shown the existence of circadian rhythm in their levels [32]. The main regulators of

circadian rhythm are CLOCK and BMAL1, they form a heterodimer and bind to an enhancer that regulates the expression of rhythm-related PER and CRY genes. The heterodimer formed by PER and CRY is directed to the nucleus, where it inhibits the expression of CLOCK and BMAL1. In β -cells of rats with knockout BMAL1, insulin levels are lower, suggesting that these genes are linked to carbohydrate metabolism [33].

SCN affect the synthesis of melatonin, and melatonin, in turn, regulates the functions of SCN, especially at dawn and at dusk. This is done at the expense of MT1 and MT2. There is evidence that the density of these receptors has a circadian rhythm: there are studies showing an increase in the density of MT1 receptors in SCN during dusk [34].

Melatonin exerts its specific effect on cells via MT1 and MT2 receptors. Though MT2 receptors melatonin mediates the effect on insulin secretion with the activation of phospholipase C. MT2 inhibition experiments have shown a decrease in the effect of melatonin on insulin secretion. MT1 inhibition showed no such effect. There is evidence that MT2 receptors are more represented in β -cells and MT1 in α -cells [34].

Conclusions. Thus, it has been established that obesity induced high-calorie diet leads to significant changes in the morphological structure of pancreas exocrine and endocrine part. It has been shown that daily administration of melatonin in a dose of 30 mg / kg for 7 weeks to obese rats leads to improvement of the pancreas morpho-functional state. Observed a tendency of greater efficiency during evening melatonin administration more (1 hour before light-off) than morning (shown significant difference in area of acinar cell nucleus, and other parameters save this direction).

Reference:

1. Pothuraju R. Pancreatic cancer associated with obesity and diabetes: an alternative approach for its targeting / R. Pothuraju, S. Rachagani, W. Junker [et al.] // *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. – 2018. – Vol. 37, № 1. – P. 1-15.
2. Mendrick D. Metabolic syndrome and associated diseases: from the bench to the clinic / D. L. Mendrick, A. M. Diehl L. S. Topor [et al.] // *A Toxicological Sciences*. – 2018. – Vol. 162, № 1. – P. 36-42.
3. Catanzaro R. Exploring the metabolic syndrome: Nonalcoholic fatty pancreas disease / R. Catanzaro, B. Cuffari, A. Italia [et al.] // *World journal of gastroenterology*. – 2016. – Vol. 22, № 34. – P. 7660.
4. Apovian C. M. Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden / C. M. Apovian // *Am J Manag Care*. – 2016. – Vol. 22, № 7. – P. 176-85.
5. Лещенко І. В. Патолофізіологічна роль ожиріння у розвитку захворювань підшлункової залози / І. В. Лещенко, В. Г. Шевчук, С. А. Суходоля [et al.] // *Вісник Вінницького національного медичного університету*. – 2013. – Vol. 17, № 2. – P. 499-504.
6. Sakai N. S. Obesity, metabolic disease and the pancreas—Quantitative imaging of pancreatic fat / N. S. Sakai, S. A. Taylor, M. D. Chouhan [et al.] // *The British journal of radiology*. – 2018. – Vol. 91, № 1089. – P. 20180267.
7. Esser N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes / N. Esser, S. Legrand-Poels, J. Piette [et al.] // *Diabetes research and clinical practice*. – 2014. – Vol. 105, № 2. – P. 141-150.
8. Hansen S. E. J. Body Mass Index, Triglycerides, and Risk of Acute Pancreatitis: A Population-Based Study of 118 000 Individuals / S. E. Hansen, C. M. Madsen, A. Varbo [et al.] // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2020. – Vol. 105, № 1. – P. dgz059.
9. Dirweesh A. Isolated peripancreatic necrosis (PPN) is associated with better clinical outcomes compared with combined pancreatic and peripancreatic involvement (CPN)—a systematic review and meta-analysis / A. Dirweesh, M. Y. Khan, Y. Li [et al.] // *Pancreatology*. – 2019 – Vol. 20, № 1. – P. 1-8.
10. Peschke E. Melatonin and pancreatic islets: interrelationships between melatonin, insulin and glucagon / E. Peschke, I. Bähr, E. Mühlbauer [et al.] // *International journal of molecular sciences*. – 2013. – Vol. 14, № 4. – P. 6981-7015.
11. Tordjman S. Melatonin: pharmacology, functions and therapeutic benefits / S. Tordjman, S. Chokron, R. Delorme [et al.] // *Current neuropharmacology*. – 2017. – Vol. 15, № 3. – P. 434-443.
12. Jaworek J. Effects of melatonin and its analogues on pancreatic inflammation, enzyme secretion, and tumorigenesis / J. Jaworek, A. Leja-

- Szpak, K. Nawrot-Porąbka [et al.] // International journal of molecular sciences. – 2017. – Vol. 18, №1014. – P.1-13.
13. Halenova T. et al. Effect of C60 fullerene nanoparticles on the diet-induced obesity in rats / T. Halenova, N. Raksha, T. Vovk [et al.] // International journal of obesity (2005). – 2018. – Vol. 42, №. 12. – P. 1987-1998.
 14. Suttie A. W., Masson R., Schutten, M. Exocrine pancreas. In: *Boorman's Pathology of the Rat*. Academic Press; 2018. pp. 107-122.
 15. Ray I. Obesity: an immunometabolic perspective / I. Ray, S. K. Mahata, R. K. De // *Frontiers in endocrinology*. – 2016. – Vol. 7. – P. 157.
 16. Olefsky J. M. Macrophages, inflammation, and insulin resistance / J. M. Olefsky, C. K. Glass // *Annual review of physiology*. – 2010. – Vol. 72. – P. 219-246.
 17. Biczko G. et al. Mitochondrial dysfunction, through impaired autophagy, leads to endoplasmic reticulum stress, deregulated lipid metabolism, and pancreatitis in animal models / G. Biczko, E. T. Vegh, N. Shalbueva [et al.] // *Gastroenterology*. – 2018. – Vol. 154, №. 3. – P. 689-703.
 18. Kos K. SPARC: a key player in the pathologies associated with obesity and diabetes / K. Kos, J. P. H. Wilding // *Nature reviews endocrinology*. – 2010. – Vol. 6, №. 4. – P. 225.
 19. Tomita T. Apoptosis in pancreatic β -islet cells in Type 2 diabetes / T. Tomita // *Bosnian journal of basic medical sciences*. – 2016. – Vol. 16, №. 3. – P. 162-179.
 20. Ying W. The role of macrophages in obesity-associated islet inflammation and β -cell abnormalities / W. Ying, W. Fu, Y. S. Lee [et al.] // *Nature Reviews Endocrinology*. – 2019. – Vol. 16. – P. 81-90.
 21. Rebours V. Obesity-induced pancreatopathy in rats is reversible after bariatric surgery / V. Rebours, P. Garteiser, L. Ribeiro-Parenti [et al.] // *Scientific reports*. – 2018. – Vol. 8, №. 1. – P. 1-11.
 22. McPherson N. O. et al. An exercise-only intervention in obese fathers restores glucose and insulin regulation in conjunction with the rescue of pancreatic islet cell morphology and microRNA expression in male offspring / N. O. McPherson, M. Lane, L. Sandeman [et al.] // *Nutrients*. – 2017. – Vol. 9, №. 2. – P. 122.
 23. Duan L. F. Dachaihu decoction ameliorates pancreatic fibrosis by inhibiting macrophage infiltration in chronic pancreatitis / L. F. Duan, X. F. Xu, L. J. Zhu [et al.] // *World journal of gastroenterology*. – 2017. – Vol. 23, №. 40. – P. 7242-7252.
 24. Chen L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs / L. Chen, H. Deng, H. Cui [et al.] // *Oncotarget*. – 2018. – Vol. 9, №. 6. – P. 7204-7218.
 25. Shah N. Nonalcoholic Fatty Pancreas Disease / N. Shah, J. P. Rocha, N. Bhutiani [et al.] // *Nutrition in Clinical Practice*. – 2019. – Vol. 34. – P. 49–56.
 26. Sheng Q. Autophagy protects pancreatic beta cell mass and function in the setting of a high-fat and high-glucose diet / Q. Sheng, X. Xiao, K. Prasad, C. Chen [et al.] // *Scientific reports*. – 2017. – Vol. 7, №. 1. – P. 1-10.
 27. Miyake H. Association of fatty pancreas with pancreatic endocrine and exocrine function / H. Miyake, J. Sakagami, H. Yasuda [et al.] // *PLoS one*. – 2018. – Vol. 13, №. 12.
 28. Jaworek J. Effects of melatonin and its analogues on pancreatic inflammation, enzyme secretion, and tumorigenesis / J. Jaworek, A. Leja-Szpak, K. Nawrot-Porąbka [et al.] // *International journal of molecular sciences*. – 2017. – Vol. 18, №. 5. – P. 1014.
 29. Owino S. Melatonin signaling a key regulator of glucose homeostasis and energy metabolism / S. Owino, D. D. C. Buonfiglio, C. Tchio [et al.] // *Frontiers in endocrinology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 488.
 30. Grupp K. Melatonin treatment of pigs with acute pancreatitis reduces inflammatory reaction of pancreatic tissue and enhances fitness score of pigs: experimental research / K. Grupp, J. Erbes, A. Poppe [et al.] // *World Journal of Emergency Surgery*. – 2019. – Vol. 14, №. 1. – P. 18.
 31. Li T. Melatonin attenuates smoking-induced hyperglycemia via preserving insulin secretion and hepatic glycogen synthesis in rats / T. Li, L. Ni, Z. Zhao [et al.] // *Journal of pineal research*. – 2018. – Vol. 64, №. 4. – P. 12475.
 32. Vieira E. Clock genes, pancreatic function, and diabetes / E. Vieira, T. P. Burris, I. Quesada // *Trends in molecular medicine*. – 2014. – Vol. 20, №. 12. – P. 685-693.
 33. Harada N. Role of clock genes in insulin secretion / N. Harada, N. Inagaki // *Journal of diabetes investigation*. – 2016. – Vol. 7, №. 6. – P. 822.
 34. Waly N. E. Circadian pattern of melatonin MT1 and MT2 receptor localization in the rat suprachiasmatic nucleus / N. E. Waly, R. Hallworth // *Journal of circadian rhythms*. – 2015. – Vol. 13, №1. – P. 1-7.
- Reference (Scopus)**
1. Pothuraju R., Rachagani S., Junker W. M., Chaudhary S., Saraswathi V., Kaur, S., et al. Pancreatic cancer associated with obesity and diabetes: an alternative approach for its targeting. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2018; 37(1): 1-15.
 2. Mendrick D. L., Diehl A. M., Topor L. S., Dietert R. R., Will Y., La Merrill M. A., et al. Metabolic syndrome and associated diseases: from the bench to the clinic. *Toxicological Sciences*. 2018; 162(1): 36-42.
 3. Catanzaro R., Cuffari B., Italia A., Marotta F. Exploring the metabolic syndrome: Nonalcoholic fatty pancreas disease. *World journal of gastroenterology*. 2016; 22(34): 7660.
 4. Apovian C. M. Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden. *Am J Manag Care*. 2016; 22(7): 176-85.
 5. Leshchenko I. V. Patofiziologichna rol ozhyrinnia u rozvytku zakhvoriuvan pidshlunkovoi zalozy / I. V. Leshchenko, V. H. Shevchuk, S. A. Sukhodolia [et al.] // *Visnyk Vinnytskoho natsionalnoho medychnoho universytetu*. – 2013. – Vol. 17, №. 2. – P. 499-504.
 6. Sakai N. S., Taylor S. A., Chouhan M. D. Obesity, metabolic disease and the pancreas—Quantitative imaging of pancreatic fat. *The British journal of radiology*. 2018; 91(1089): 20180267.
 7. Esser N., Legrand-Poels S., Piette J., Scheen A. J., & Paquot N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes research and clinical practice*. 2014; 105(2): 141-150.
 8. Hansen S. E., Madsen C. M., Varbo A., Nordestgaard B. G. Body Mass Index, Triglycerides, and Risk of Acute Pancreatitis: A Population-Based Study of 118 000 Individuals. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2020; 105(1): dgz059.
 9. Dirweesh A., Khan M. Y., Li Y., Choo C., Freeman M. L., Triku-danathan G. Isolated peripancreatic necrosis (PPN) is associated with better clinical outcomes compared with combined pancreatic and peripancreatic involvement (CPN)—a systematic review and meta-analysis. *Pancreatology*. 2019; 20(1): 1-8.
 10. Peschke E., Bähr I., Mühlbauer E. Melatonin and pancreatic islets: interrelationships between melatonin, insulin and glucagon. *International journal of molecular sciences*. 2013; 14(4): 6981-7015.
 11. Tordjman S., Chokron S., Delorme R., Charrier A., Bellissant E., Jaafari N., et al. Melatonin: pharmacology, functions and therapeutic benefits. *Current neuropharmacology*. 2017; 15(3): 434-443.
 12. Jaworek J., Leja-Szpak A., Nawrot-Porąbka K., Szklarczyk J., Kot M., Pierzchalski P., et al. Effects of melatonin and its analogues on pancreatic inflammation, enzyme secretion, and tumorigenesis. *International journal of molecular sciences*. 2017; 18(5): 1014.
 13. Halenova T., Raksha N., Vovk T., Savchuk O., Ostapchenko L., Prylutskyy Y., et al. Effect of C60 fullerene nanoparticles on the diet-induced obesity in rats. *International journal of obesity (2005)*. 2018; 42(12): 1987-1998.
 14. Suttie A. W., Masson R., Schutten, M. Exocrine pancreas. In: *Boorman's Pathology of the Rat*. Academic Press. 2018: 107-122.
 15. Ray I., Mahata S. K., De R. K. Obesity: an immunometabolic perspective. *Frontiers in endocrinology*. 2016; 7: 157.
 16. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol*. 2010; 72:219-46.
 17. Biczko G., Vegh E. T., Shalbueva N., Mareninova O. A., Elperin J., Lotshaw, E., et al. Mitochondrial dysfunction, through impaired autophagy, leads to endoplasmic reticulum stress, deregulated lipid metabolism, and pancreatitis in animal models. *Gastroenterology*. 2018; 154(3): 689-703.
 18. Kos K., Wilding J. P. SPARC: a key player in the pathologies associated with obesity and diabetes. *Nature reviews endocrinology*. 2010; 6(4): 225.
 19. Tomita T. Apoptosis in pancreatic β -islet cells in Type 2 diabetes. *Bosnian journal of basic medical sciences*. 2016; 16(3): 162.
 20. Ying W., Fu W., Lee Y. S., Olefsky J. M. The role of macrophages in obesity-associated islet inflammation and β -cell abnormalities. *Nature Reviews Endocrinology*. 2019; 16: 81-90.
 21. Rebours V., Garteiser P., Ribeiro-Parenti L., Cavin J. B., Doblaz S., Pagé G., et al. Obesity-induced pancreatopathy in rats is reversible after bariatric surgery. *Scientific reports*. 2018; 8(1): 1-11.
 22. McPherson N. O., Lane M., Sandeman L., Owens J. A., Fullston T. An exercise-only intervention in obese fathers restores glucose and insulin regulation in conjunction with the rescue of pancreatic islet cell morphology and microRNA expression in male offspring. *Nutrients*. 2017; 9(2): 122.
 23. Duan L. F., Xu X. F., Zhu L. J., Liu F., Zhang X. Q., Wu N., et al. Dachaihu decoction ameliorates pancreatic fibrosis by inhibiting macrophage infiltration in chronic pancreatitis. *World journal of gastroenterology*. 2017; 23(40): 7242-7252.
 24. Esser N., Legrand-Poels S., Piette J., Scheen A. J., Paquot N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes research and clinical practice*. 2014; 105(2): 141-150.
 25. Shah N., Rocha J. P., Bhutiani N., Omer E. Nonalcoholic Fatty Pancreas Disease. *Nutrition in Clinical Practice*. 2019; 34: 49-S56.
 26. Sheng Q., Xiao X., Prasad K., Chen C., Ming Y., Fusco J., et al. Autophagy protects pancreatic beta cell mass and function in the setting of a high-fat and high-glucose diet. *Scientific reports*. 2017; 7(1): 1-10.
 27. Miyake H., Sakagami J., Yasuda H., Sogame Y., Kato R., Suwa K., et al. Association of fatty pancreas with pancreatic endocrine and exocrine function. *PLoS one*. 2018; 13(12): 1-10.
 28. Jaworek J., Leja-Szpak A., Nawrot-Porąbka K., Szklarczyk J., Kot M., Pierzchalski P., et al. Effects of melatonin and its analogues on pancreatic inflammation, enzyme secretion, and tumorigenesis. *International journal of molecular sciences*. 2017; 18(5): 1014.
 29. Owino S., Buonfiglio D. D. C., Tchio C., Tosini G. Melatonin signaling a key regulator of glucose homeostasis and energy metabolism. *Frontiers in endocrinology*. 2019; 10: 488.
 30. Grupp K., Erbes J., Poppe A., Wodack K., Gocht A., Trepte, C., et al. Melatonin treatment of pigs with acute pancreatitis reduces inflammatory reaction of pancreatic tissue and enhances fitness score of pigs: experimental research. *World Journal of Emergency Surgery*. 2019; 14(1): 18.

31. Li T., Ni L., Zhao Z., Liu X., Lai Z., Di X., et al. Melatonin attenuates smoking-induced hyperglycemia via preserving insulin secretion and hepatic glycogen synthesis in rats. *Journal of pineal research*. 2018; 64(4): 124-75.

32. Vieira E., Burris T. P., Quesada I. Clock genes, pancreatic function, and diabetes. *Trends in molecular medicine*. 2014; 20(12): 685-693.

33. Harada N., Inagaki N. Role of clock genes in insulin secretion. *Journal of diabetes investigation*. 2016; 7(6): 822.

34. Waly N. E., Hallworth R. Circadian pattern of melatonin MT1 and MT2 receptor localization in the rat suprachiasmatic nucleus. *Journal of circadian rhythms*. 2015; 13: 1-7.

Надійшла до редколегії 21.01.2019
Отримано виправлений варіант 21.02.2019
Підписано до друку 21.02.2019

Received in the editorial 21.01.2019
Received a revised version on 21.02.2019
Signed in the press on 21.02.2019

О. Калмыкова, асп.,
К. Чумак, студ.,
О. Воронина, канд. біол. наук,
М. Дзержинський, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ЩУРІВ ПРИ ВВЕДЕННІ МЕЛАТОНІНУ ПІД ЧАС РОЗВИТКУ ОЖИРІННЯ: ХРОНОТЕРАПЕВТИЧНИЙ ПІДХІД

Зайва вага та ожиріння часто викликають такі супутні хвороби, як інсулінорезистентність, діабет другого типу, рак, серцево-судинні патології тощо. Підшлункова залоза грає важливу роль для вуглеводного обміну та сигнальних шляхів інсуліну, що в умовах ожиріння зазнають патологічних змін. Для зменшення несприятливих наслідків ожиріння в ролі терапевтичного агента розглядається мелатонін – багатофункціональний гормон епіфіза. З огляду на розвиток точної медицини, яка включає обробку персональних даних про послідовність геному організму, мікробіому, індивідуальний режим дня/ночі тощо, підбір часу прийому ліків для максимальної ефективності та мінімізації побічних ефектів для кожного пацієнта відповідно до циркадного ритму індивідуального організму становить основну мету у хронотерапевтичному підході. Тому метою нашого дослідження було визначення морфофункціонального стану (зміни структури клітин екзо- та ендокринної частин; морфометричні параметри: площі поперечного перерізу острівців Лангерганса, ацинусів та ядер ацинарних клітин) підшлункової залози у щурів з ожирінням, індукованим висококалорійною (з високим вмістом жиру) дієтою, після введення мелатоніну у визначений час доби (вечері або вранці). Мелатонін вводили щоденно протягом 7 тижнів дозою 30 мг/кг за 1 год до вимкнення світла (ZT11, увечері) або 1 год після включення світла (ZT01, уранці) щурам, які перебували на висококалорійній дієті (ВКД). Щури із ВКД мали патологічні зміни в будові клітин підшлункової залози екзо- та ендокринної частин, що виявлялись у наявності макрофагів, лейкоцитарної інфільтрації острівців, вакуолізації та ліпідних крапель у цитоплазмі ациноцитів; у той же час розміри площі поперечного перерізу острівців, ацинусів та ядер ацинарних клітин зменшувалися. Щури з ожирінням, яким вводили мелатонін, демонстрували зменшення вияву патологічних змін, пов'язаних із впливом ВКД на підшлункову залозу. А саме, збільшилась площа острівців підшлункової залози порівняно з групою ВКД; крім того, площа ацинусів підшлункової залози досягла контрольних значень. Виявили різницю між ранковим і вечірнім введенням мелатоніну за параметрами площі ядер ациноцитів: вечірнє введення виявляло більш ефективну дію в досягненні контрольного рівня. У сукупності мелатонін чинить амеліоративну дію на морфофункціональний стан екзо- та ендокринної частин підшлункової залози в умовах розвитку ожиріння, спричиненого ВКД. Причому після вечірнього введення мелатоніну (за 1 год до вимкнення світла) спостерігається краща тенденція до відновлення змінених параметрів підшлункової залози до контрольного рівня порівняно з ранковим.

Ключові слова: мелатонін, ожиріння, хронобіологія, острівці Лангерганса, висококалорійна дієта, ацинарні клітини підшлункової залози.

О. Калмыкова, асп.,
К. Чумак, студ.,
Е. Воронина, канд. биол. наук,
Н. Дзержинский, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ МЕЛАТОНИНА ПРИ РАЗВИТИИ ОЖИРЕНИЯ: ХРОНОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПОДХОД

Лишний вес и ожирение часто вызывают такие сопутствующие болезни, как инсулинорезистентность, диабет второго типа, рак, сердечно-сосудистые патологии и т. п. Поджелудочная железа играет важную роль для углеводного обмена и сигнальных путей инсулина, которые в условиях ожирения испытывают патологические изменения. Для уменьшения неблагоприятных последствий ожирения в роли терапевтического агента рассматривается мелатонин – многофункциональный гормон эпифиза. Учитывая развитие точной медицины, которая включает обработку персональных данных о последовательности генома организма, микробиома, индивидуальный режим дня/ночи и т. п., подбор времени приема лекарств для максимальной эффективности и минимизации побочных эффектов для каждого пациента в соответствии с циркадным ритмом индивидуального организма составляет основную цель при хронотерапевтическом подходе. Поэтому целью нашего исследования было определение морфофункционального состояния (изменения структуры клеток экзо- и эндокринной частей; морфометрические параметры: площади поперечного сечения островков Лангерганса, ацинусов и ядер ацинарных клеток) поджелудочной железы у крыс с ожирением, индуцированным высококалорийной (с высоким содержанием жира) диетой, после введения мелатонина в определенное время суток (вечером или утром). Мелатонин вводили ежедневно в течение 7 недель в дозе 30 мг/кг за 1 ч до выключения света (ZT11, вечером) или 1 ч после включения света (ZT01, утром) крысам, которые находились на высококалорийной диете (ВКД). Крысы с ВКД имели патологические изменения в структуре клеток поджелудочной железы экзо- и эндокринной частей, которые проявлялись в наличии макрофагов, лейкоцитарной инфильтрации островков, вакуолизации и липидных капель в цитоплазме ациноцитов; в то же время морфометрические данные площади поперечного сечения островков, ацинусов и ядер ацинарных клеток уменьшались. Крысы с ожирением, которым вводили мелатонин, демонстрировали уменьшение наступления патологических изменений, связанных с влиянием ВКД в поджелудочной железе. В частности, увеличилась площадь островков поджелудочной железы по сравнению с группой ВКД; кроме того, площадь ацинусов поджелудочной железы достигала контрольных значений. Обнаружили разницу между утренним и вечерним введением мелатонина по параметрам площади ядер ациноцитов: вечернее введение имело более эффективное действие в достижении контрольного уровня. В совокупности мелатонин оказывает амелиоративное действие на морфофункциональное состояние экзо- и эндокринной частей поджелудочной железы в условиях развития ожирения, вызванного ВКД. Причем после вечернего введения мелатонина (за 1 ч до выключения света) наблюдается лучшая тенденция к восстановлению измененных параметров поджелудочной железы до контрольного уровня по сравнению с утренним введением.

Ключевые слова: мелатонин, ожирение, хронобиология, островки Лангерганса, высококалорийная диета, ацинарные клетки поджелудочной железы.

УДК 579.64:631.81:633.34

DOI: https://doi.org/10.17721/1728_2748.2020.80.57-63

С. Гудзь, асп.,
Л. Сквіка, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
О. Присяжнюк, канд. с.-г. наук,
Я. Цвей, д-р с.-г. наук
Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН, Київ, Україна

МІКРОБІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ҐРУНТУ ЗА ВИРОЩУВАННЯ СОЇ З РІЗНИМИ ВАРІАНТАМИ ДОБРИВ

Метою роботи була порівняльна характеристика мікробіологічних процесів, що відбуваються у ґрунті та ризосфері за вирощування сої в умовах короткоротаційної сівозміни з використанням різних систем удобрення. Мікробіологічними методами визначали вміст у ґрунті та в ризосфері амоніфікуючих, амілолітичних, педотрофних, оліготрофних мікроорганізмів, чисельність неспорової мікрофлори та мікроміцетів. Спрямованість мікробіологічних процесів ґрунту та ризосфери розраховували за допомогою коефіцієнтів мінералізації-іммобілізації, оліготрофності та педотрофності. У варіантах екологічної та біологічної систем удобрення чисельність амоніфікуючих мікроорганізмів у фазу бутонізації сої збільшувалася порівняно із промисловою системою удобрення. Застосування виключно мінерального удобрення сої лише суттєво посилює розвиток мікроорганізмів, що використовують азот мінеральних сполук. Установлено, що чисельність оліготрофних мікроорганізмів була найвищою, що свідчить про вичерпання запасів легкодоступних поживних елементів і посилення гуміфікаційних процесів. За екологічної системи удобрення коефіцієнт мінералізації-іммобілізації азоту був на рівні 0,72-0,83, а за біологічної системи був найнижчим, 0,60-0,99, що підтверджує зрівноваження процесів мінералізації та іммобілізації. Коефіцієнти оліготрофності екологічної та біологічної систем удобрення у фазі бутонізації та побуріння бобів свідчать про достатню забезпеченість ґрунтової мікробіоти легкозасвоюваними органічними речовинами. Застосування екологічної системи удобрення зі збалансованим поєднанням мінеральних та органічних добрив і біологічної системи удобрення із сучасними органічними добривами та гуматами сприяє збільшенню активності мікробіоти ґрунту та поліпшенню перебігу процесів трансформації органічних сполук.

Ключові слова: мікробні процеси, система удобрення, соя, ґрунтова мікробіота.

Вступ. Ґрунтова мікробіота є одним із найважливіших чинників, що визначають процеси формування та біологічні властивості ґрунту, і по суті є складною мікробіологічною системою, адже за даними Патики В. П. [1] вміст мікроорганізмів в 1 г ґрунту становить мільярди клітин. А от на думку Aislabe J. A. та Deslippe J., різноманітність ґрунтової мікрофлори така, що в 1 г ґрунту міститься близько 4000 видів мікроорганізмів [2]. Мікробні угруповання значною мірою визначають родючість ґрунту, а також ріст і розвиток сільськогосподарських рослин, беручи участь у таких важливих процесах, як трансформування рослинних решток та формування гумусу, забезпечення рослинного організму поживними речовинами та факторами росту, колообіг біогенних елементів тощо [3]. Багато видів мікроорганізмів, що живуть у сільськогосподарських рослин пов'язані саме зі змінами ґрунтової мікробіоти.

Склад і чисельність мікробних угруповань ґрунту зазнають динамічних змін упродовж року. Варто зазначити, що чисельність мікробних популяцій у ґрунті визначається не тільки сезонними коливаннями едафічних факторів (вміст елементів живлення, температура ґрунту, наявність доступної вологи тощо), а й вирощуваними сільськогосподарськими культурами [4]. Однак кількісний склад ґрунтової мікробіоти не є показником родючості ґрунту, адже в певні проміжки часу набувають інтенсивного розвитку мікроорганізми, що засвоюють органічний азот, мінеральні його форми, целюлозоруйнівні мікроорганізми та представники інших еколого-трофічних груп. Як наслідок замість збільшення родючості ґрунту може спостерігатись зниження вмісту мінеральних форм азоту та його накопичення у мікробних клітинах. За таких умов мікроорганізми можуть ставати конкурентами рослин за фактори мінерального живлення [5, 6].

Нестачу елементів живлення у ґрунті людина традиційно намагається скоригувати за рахунок застосування більших їх кількостей. Що, у свою чергу, веде до формування більшого рівня антропогенного навантаження ґрунтів, погіршуючи їх агрохімічні та біологічні характеристики. Так, під впливом більших норм доб-

рив суттєво змінюється комплекс мікробіологічних показників, відбуваються зміни, передусім, біорізноманіття та структури основних фізіологічних груп мікроорганізмів, що тільки погіршує перебіг мікробіологічних процесів у ґрунті [7, 8, 12].

Основою сучасних систем землеробства є інтенсивні технології вирощування сільськогосподарських культур в умовах короткоротаційних сівозмін. Провідним напрямом розвитку інтенсивного землеробства, спрямованим на збереження природного потенціалу ґрунтів, є його екологізація. Однією із основних умов екологізації землеробства є раціональне застосування добрив у сівозміні зі збереженням біорізноманіття ґрунтової мікробіоти та її фізіологічних властивостей.

Метою досліджень було встановлення закономірностей перебігу мікробіологічних процесів, що відбуваються у ґрунті та ризосфері за вирощування сої в умовах короткоротаційної сівозміни з використанням різних систем удобрення.

Методика проведення досліджень. Дослідження проводили впродовж 2016–2019 рр. на Білоцерківській дослідно-селекційній станції Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України (БЦДСС), яка розташована в Центральному Лісостепу України, у зоні нестійкого зволоження. Клімат – помірно-континентальний.

Досліджувана нами короткоротаційна сівозміна має чотирирічний цикл ротації та передбачає вирощування таких культур: соя – пшениця озима – буряки цукрові – кукурудза на зерно.

Як контрольний варіант використовували сучасну промислову систему удобрення культур, що передбачає застосування інтенсивних технологій вирощування та пріоритет застосування промислових засобів удобрення доступних на ринку (переважно мінеральних добрив). В екологічній системі удобрення використовували збалансоване поєднання мінеральних та органічних добрив у екологічно регламентованих нормах. За застосування біологічної системи удобрення, для удобрення культур сівозміни, використовували виключно сучасні органічні добрива, рослинні рештки та гумати (табл. 1).

Таблиця 1. Система удобрення сої в короткоротаційній сівозміні

№ з/п	Варіант системи удобрення	Основне удобрення	Передпосівне удобрення	Удобрення по вегетації
1	Біологічна	поживні рештки кукурудзи (8-12 т/га) + Біогумус (вермикомпост) "ЕКОЧУДО" 200 кг/га	-	Квантум – ГУМАТ, 1 л/га
2	Екологічна	поживні рештки кукурудзи (8-12 т/га) + P ₃₀ K ₃₀	під культивування N ₃₀	-
3	Промислова	P ₆₀ K ₆₀	під культивування N ₆₀	-

Ґрунт дослідного поля, де були закладені короткоротаційні сівозміни, – це чорнозем типовий, глибокий, малогумусний, крупнопилувато середньо суглинковий: вміст гумусу – 3,5 %, загального азоту – 0,31 %; гідролітична кислотність – 2,41 мг-екв., кислотність близька до нейтральної, вміст легкогідролізованого азоту (N) – 13,4 мг/100 г ґрунту, P₂₀₅ – 27,6 мг/100 г ґрунту, K_{2O} – 9,8 мг/100 г ґрунту, ступінь насиченості основами – 90 %.

Кліматичні умови в роки проведення досліджень були характерними для зони нестійкого зволоження Центрального Лісостепу України і сприятливими для вирощування усіх культур короткоротаційної сівозміни.

Відбір зразків ґрунту з дослідних ділянок короткоротаційної сівозміни проводили з шару ґрунту 0-20 см та ризосфери рослин [9].

Для оцінювання стану ґрунтової мікробіоти та перебігу основних мікробіологічних процесів використовували загальноприйняті у ґрунтовій мікробіології методи [9-12].

Для мікробіологічних аналізів відбирали по 10 г ґрунту з кожного варіанта дослідів, досліді проводили у трьох повторях. Наважки перемішували у стерильні ступки і диспергували мікроорганізми методом Д. Звягінцева. Десятикратні розведення вихідної ґрунтової суспензії використовували для висівання на селективні середовища.

Чисельність мікроорганізмів основних екологічних і таксономічних груп визначали методом висівання ґрунтової суспензії на стандартні поживні середовища: амоніфікуючі бактерії – на м'ясопептонному агарі (МПА), стрептоміцети і бактерії, що використовують мінеральний нітроген (амілолітичні) – на крохмаль-аміачному агарі (КАА), педотрофні – на ґрунтовому агарі (ГрА), мікроміцети – на середовищі Чапека, оліготрофні мікроорганізми – на голодному агарі (ГА) (компанія-виробник середовищ "TITAN BIOTECH LTD", Індія), неспорові бактерії – на капустяному агарі (КА) (виготовлено самостійно). Після засіву поживних середовищ їх інкубували при температурі 28 °C упродовж 5–14 діб (залежно від швидкості росту мікроорганізмів певних груп) [9, 11].

Колонії, що виростили на середовищах, підраховували, припускаючи, що з кожної життєздатної клітини формується одна колонія. Кількість мікроорганізмів виражали в колонієутворюючих одиницях (КУО) на 1 г абсолютно сухого ґрунту. Для цього термостатно-ваговим методом визначали вологість зразка ґрунту, взятого для дослідів, і перераховували отриману кількість колоній з урахуванням коефіцієнта вологості та розведення ґрунтової суспензії. Досліди проводили у трьох повторях. Отримані дані обробляли методами дисперсійного аналізу, розраховуючи найменшу істотну різницю по основних групах мікроорганізмів із врахуванням даних років та схеми дослідів.

Спрямованість мікробіологічних процесів у ґрунті визначали за відповідними коефіцієнтами [10, 11]:

Коефіцієнт мінералізації-імобілізації розраховували за відношенням кількості мікроорганізмів, що іммобілізують мінеральні форми нітрогену, до чисельності органотрофів.

Коефіцієнт оліготрофності розраховували за відношенням чисельності мікроорганізмів, що здатні засвоювати елементи живлення з дуже розріджених розчинів, до загальної чисельності евтрофних мікроорганізмів.

Коефіцієнт педотрофності розраховували за відношенням кількості мікроорганізмів на ґрунтовому агарі до кількості мікроорганізмів, що виростили на м'ясопептонному агарі.

Статистичний аналіз результатів досліджень виконували методом дисперсійного аналізу в комп'ютерних програмах Excel та Statistica-6.0 [13].

Результати досліджень та їх обговорення. Як показали результати обліку агрономічно корисних груп мікроорганізмів, їх чисельність змінювалась залежно від системи удобрення досліджуваних нами сільськогосподарських культур. Установлено, що застосування елементів біологізації удобрення за вирощування сої обумовлювало зростання чисельності мікробіоти, задіяної у циклі біотрансформації органічної речовини (табл. 2).

Таблиця 2. Динаміка чисельності ґрунтових мікроорганізмів у агрофітогеоценозах сої за різних систем удобрення, середнє за 2016-2019 рр. (чисельність мікроорганізмів, млн КУО/г ґрунту)

Фази росту сої	Групи мікроорганізмів (середовище)	Система удобрення			НІР _{0,05}
		промислова (контроль)	екологічна	біологічна	
Сходи	Амоніфікуючі (МПА)	3,77	5,25	4,64	0,23
	Амілолітичні (КАА)	5,73	4,36	2,80	0,41
	Педотрофні (ПА)	4,73	5,39	6,73	0,38
	Оліготрофні (ГА)	6,06	5,99	7,32	0,40
	Мікроміцети	19,72	21,20	26,24	0,87
Бутонізація	Амоніфікуючі (МПА)	5,15	8,35	7,41	0,41
	Амілолітичні (КАА)	7,07	6,04	5,23	0,39
	Педотрофні (ПА)	8,51	13,16	14,84	0,43
	Оліготрофні (ГА)	5,22	4,53	3,86	0,51
	Мікроміцети	34,31	40,41	50,01	0,92
Побуріння бобів	Амоніфікуючі (МПА)	8,39	8,01	8,79	0,32
	Амілолітичні (КАА)	13,02	11,16	8,70	0,87
	Педотрофні (ПА)	6,70	9,35	9,51	0,55
	Оліготрофні (ГА)	7,92	6,75	4,19	0,63
	Мікроміцети	36,94	49,96	55,9	0,94

Аналіз зміни чисельності та динаміки мікроорганізмів різних груп у ґрунті під час вегетації сої дозволяє зазначити, що максимальна їх чисельність спостерігалась у фазу побуріння бобів як таку, що є найбільш фі-

зіологічно активною з погляду особливостей росту та розвитку культури. Також варто наголосити на тому, що зареєстровані закономірності збільшення чисельності мікроорганізмів саме у цей проміжок часу визначаються

оптимальними значеннями гідротермічних умов, а особливо наявністю доступної вологи в ґрунті, оскільки у фазу бутонізації водоспоживання та поглинання елементів живлення з ґрунту у рослин сої максимальні порівняно з фазою побуріння бобів.

Перебіг мікробіологічних процесів у ґрунті характеризується передусім активністю та кількістю амоніфікаторів, що мінералізують органічні речовини ґрунту. Так, порівняно з максимально хімізованою промисловою системою удобрення у варіантах досліджу, що передбачали застосування екологічної та біологічної систем удобрення, чисельність амоніфікуючих мікроорганізмів була більшою на 39,3 та 23,1 %, відповідно. У фазу бутонізації сої чисельність амоніфікуючих мікроорганізмів була більшою на 62,1 та 43,9 %, відповідно, порівняно з промисловою системою удобрення.

За роки проведення досліджень найвища чисельність популяцій мікроорганізмів, що використовують органічний азот, була сформована за обмеження або ж відмови від застосування засобів хімізації, втілених у екологічній та біологічній системах удобрення, і у фазу побуріння бобів становила 8,35 млн КУО/г ґрунту та 7,41 млн КУО/г ґрунту, відповідно, тоді як за промисловою системою – 5,15 млн КУО/г ґрунту. Імовірною причиною може бути високий вміст легкогідролізованих органічних речовин.

У той же час варто зазначити, що у фазу побуріння бобів чисельність амоніфікуючих мікроорганізмів за екологічної системи удобрення була мінімальною (8,01 млн КУО/г ґрунту) порівняно з іншими варіантами систем удобрення, що, на нашу думку, пов'язано з комбінованою системою живлення, адже легкогідролізовані органічні речовини значною мірою були використані рослинами сої для росту та розвитку.

Загалом результатами наших досліджень підтверджено попередньо встановлені закономірності, висвітлені у працях Малиновської І. М. [14], що активне застосування добрив спричиняє зростання чисельності амоніфікуючих, амілолітичних та педотрофних бактерій.

Застосування мінеральних добрив суттєво посилює розвиток мікроорганізмів, що використовують азот мінеральних сполук. Так, встановлено, що за застосування біологічної системи удобрення у ґрунті був представлений мікробний ценоз, збіднений видами, здатними утилізувати мінеральні сполуки азоту, оскільки амілолітичні мікроорганізми гостро реагують на дефіцит мінерального азоту, що, у свою чергу, сприяє меншій концентрації вмісту нітратного та амонійного азоту у ґрунтовому середовищі.

Установлено, що за екологічної системи удобрення сої чисельність амілолітичних мікроорганізмів у фазу сходів культури була меншою на 23,9 %, у фазу бутонізації – на 14,6 % та у фазу побуріння бобів – на 14,3 % порівняно з промисловою системою удобрення. Аналогічні результати були отримані нами за застосування біологічної системи удобрення: чисельність мікроорганізмів, що засвоюють азот мінеральних сполук, була на 51,1, 26,0 та 33,2 % меншою, ніж у контролі. Як відомо, найбільш сприятливі умови для розмноження та функціонування педотрофних мікроорганізмів складаються у випадку наявності в ґрунті достатньої кількості органічних добрив. У процесі вивчення закономірностей зміни чисельності мікроорганізмів у агрофітоценозах сої нами було встановлено, що значна чисельна перевага бактерій даної еколого-трофічної групи була за екологічного та біологічного варіантів удобрення. Так, у фазу сходів сої на даних системах удобрення педотрофних мікроорганізмів було на 14,0 та 42,3 % більше, ніж на промисловій системі удобрення, у фазу бутонізації – на 54,6 та 74,4 %, а у фазу побуріння бобів – на 39,6 та 41,9 %, відповідно.

Водночас варто зазначити, що чисельність педотрофних мікроорганізмів у фазу сходів була мінімальною для всіх варіантів удобрення, а у фазу бутонізації – максимальна. У фазу побуріння бобів сої мікробне обсіменіння суттєво зменшувалось та становило 6,70-9,51 КУО/г ґрунту. Такі закономірності розвитку мікробіоти на початку вегетаційного періоду пов'язані з незначними запасами ґрунтової вологи, що особливо сильно обмежувала розвиток мікроорганізмів в окремі роки проведення досліджень. Зменшення чисельності педотрофних мікроорганізмів наприкінці періоду вегетації культури викликане збідненням вмісту органічної речовини, яка для них є субстратним джерелом живлення та енергії.

Чисельність оліготрофів визначається біологічними особливостями даної групи мікроорганізмів. Так, відомо, що вони інтенсивно розвиваються на збіднених ґрунтах, що обумовлено їх трофічною специфічністю та відсутністю конкуренції, і спроможні існувати в умовах нестачі джерел енергії та живлення. А отже, оліготрофні мікроорганізми виступають своєрідними індикаторами нестачі легкодоступних елементів живлення, адже вони задовольняють свої трофічні потреби мікрокількостями поживних речовин. З огляду на це чисельність оліготрофних мікроорганізмів найвищою була при застосуванні промислової системи удобрення. Виявлені закономірності свідчать про вичерпання запасів легкодоступних поживних елементів та посилення гуміфікаційних процесів.

Дані, отримані Грицаєнко З. М., Голодригою О. В., підкреслюють значення мікроскопічних грибів у процесах ґрунтоутворення та кругообігу азоту. Адже вони є учасниками амоніфікації та синтезу біологічно активних речовин: антибіотиків, амінокислот, полісахаридів, ферментів, вітамінів [16]. Також відомо, що загальна чисельність мікроміцетів залежить від вологості ґрунту та забезпеченості поживними речовинами [15]. А тому отримані нами дані підтверджують закономірності, установлені іншими вченими. Так, аналіз загальної кількості мікроскопічних грибів показав, що у досліджуваному нами ґрунті загалом міститься значна кількість мікроміцетів (19,72-55,9 тис. КУО/г ґрунту). В умовах застосування екологічної та біологічної систем удобрення рослин сої їх чисельність максимальна порівняно із промисловою системою. Такі закономірності можна пояснити наявністю у ґрунті рослинних решток з високим вмістом клітковини, що і стимулює розвиток грибної мікробіоти.

Дослідженнями багатьох учених доведено, що вищі рослини активно впливають на мікробіоту агроценозів за рахунок, у першу чергу, корневих виділень, а бобові культури – ще й симбіозу. Так, кореневі виділення є для мікроорганізмів джерелом енергії, що сприяє їх розвитку та накопиченню у ризосфері та ризоплані [14].

Основна кількість ризосферних бактерій належить до гетеротрофів, що потребують легкодоступних органічних сполук вуглеводів, амінокислот тощо. У роботах Tate R. L. доведено, що доступна органіка в ґрунті сильніше впливає на розвиток мікробіоти, ніж тип ґрунту [2].

Тому, зважаючи на те, що важливим фактором, який характеризує особливості впливу мікроорганізмів на ріст та розвиток рослин сої, є їх чисельність у ризосфері, наступним завданням роботи було визначення основних агрономічно корисних груп ризосферних мікроорганізмів залежно від фаз розвитку культури та систем удобрення (табл. 3).

У рослин сої на час проростання утворюються гіпокотильні корені та відбувається винесення сім'ядолей на поверхню ґрунту, тому ризосфери як такої на час сходів сої немає. Відповідно ми не ідентифікували мікроорганізми навколо гіпокотильного корінця сої, адже основні поживні речовини перебувають у сім'ядолях, а культура за доволі короткий проміжок часу не змогла сформувати мікробіоту, відмінну від загальної мікробіоти ґрунту.

Таблиця 3. Динаміка чисельності ґрунтових мікроорганізмів у ризосфері сої за різних систем удобрення, середнє за 2016-2019 рр. (чисельність мікроорганізмів, млн КУО/г ґрунту)

Фази росту сої	Групи мікроорганізмів	Система удобрення			НІР _{0,05}
		промислова (контроль)	екологічна	біологічна	
Сходи	Амоніфікуючі (МПА)	-	-	-	-
	Амілолітичні (КАА)	-	-	-	-
	Педотрофні (ПА)	-	-	-	-
	Оліготрофні (ГА)	-	-	-	-
	Мікроміцети (Чапека)	-	-	-	-
Бутонізація	Амоніфікуючі (МПА)	15,00	27,20	15,90	0,44
	Амілолітичні (КАА)	28,00	21,90	18,90	0,75
	Педотрофні (ПА)	20,10	25,80	28,30	0,64
	Оліготрофні (ГА)	28,20	22,00	18,40	0,39
	Мікроміцети (Чапека)	22,11	57,80	44,10	0,78
Побуріння бобів	Амоніфікуючі (МПА)	12,80	19,90	15,90	0,47
	Амілолітичні (КАА)	26,00	27,70	13,10	0,53
	Педотрофні (ПА)	24,00	29,20	25,90	0,55
	Оліготрофні (ГА)	9,70	3,39	3,20	0,48
	Мікроміцети (Чапека)	45,72	66,20	71,24	0,93

Слід наголосити на тому, що вивчення динамічних змін ризосферної мікробіоти сої є важливим питанням, оскільки її коренева система характеризується високою фізіологічною активністю не тільки з погляду симбіотичної азотфіксації, а й здатності до співіснування з ґрунтовими мікроорганізмами. На основі проведених досліджень можна стверджувати, що у ґрунті прикореневої зони спостерігалось суттєве зростання чисельності мікробіоти.

Загалом нами встановлено, що щільність мікробних клітин в одиниці об'єму ризосферного ґрунту сої була вищою порівняно з їх загальною чисельністю в ґрунті. Такі закономірності виявлялись стосовно всіх досліджуваних еколого-трофічних угруповань та закономірно зберігались у динаміці вегетації.

Установлено, що у варіантах досліду з екологічною та біологічною системами удобрення чисельність колоній амоніфікуючих мікроорганізмів у фазу бутонізації була більшою на 81,3 та 6,0 %, а у фазу побуріння бобів – на 55,5 та 24,2 %, відповідно, порівняно з промисловою системою удобрення. Імовірно, така інтенсивність розвитку амоніфікаторів забезпечувалась за рахунок високого вмісту легкогідролізованих органічних речовин.

Установлено, що за екологічної системи удобрення сої чисельність амілолітичних мікроорганізмів у фазу бутонізації сої була меншою на 21,8 % порівняно з промисловою системою удобрення, за біологічної системи

удобрення – на 32,5 %, а у фазу побуріння бобів – на 49,6 % порівняно з такою у контролі.

Максимальна чисельність педотрофних мікроорганізмів у ризосфері сої спостерігалась за екологічної та біологічної систем удобрення. Так, у фазу бутонізації їх чисельність була на 28,4 та 40,8 % більшою, ніж за умов промислової системи удобрення, а у фазу побуріння бобів – на 21,7 та 7,9 %, відповідно.

Установлено, що чисельність оліготрофних мікроорганізмів найвищою була при застосуванні промислової системи удобрення, що свідчить про обмеженість запасів легкодоступних елементів живлення та посилення гуміфікаційних процесів.

Аналогічно до вмісту мікроміцетів у ґрунті, у ризосфері сої за умов екологічної та біологічної систем удобрення їх чисельність була значно вищою порівняно з промисловою системою: на 161,4 та 99,5 %, відповідно, – у фазу бутонізації та на 44,8 і 55,8 % – у фазу побуріння бобів. До неспорових бактерій ґрунту належать різноманітні мікроорганізми родів *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Cytophaga*, *Mycobacterium*, що мінералізують у ґрунті рослинні рештки, целюлозу та можуть виступати у ролі патогенів рослин.

Дані динаміки чисельності неспорової мікробіоти ґрунту в агрофітоценозах і ризосфері сої за різних систем удобрення наведені в табл. 4.

Таблиця 4. Динаміка чисельності неспорової мікрофлори ґрунту в агрофітоценозах і ризосфері сої за різних систем удобрення, млн КУО в 1 г ґрунту, 2016-2019 рр.

Фази росту культури	Система удобрення					
	промислова		екологічна		біологічна	
	ґрунт	ризосфера	ґрунт	ризосфера	ґрунт	ризосфера
Сходи	0,42	-	0,40	-	0,43	-
Бутонізація	2,21	7,53	6,21	12,60	3,61	5,72
Побуріння бобів	7,38	11,50	2,21	13,60	5,02	14,50
НІР _{0,05}	0,14	0,69	0,12	0,43	0,10	0,82

Неспорові бактерії – це доволі нестійка до впливу несприятливих умов група ґрунтової мікрофлори, а тому зазвичай у ризосфері вони розвиваються більш активно, адже коренева система рослини покращує умови настільки, що допомагає неспоровим бактеріям вижити у складних екологічних умовах. За результатами досліджень спостерігалось переважання чисельності неспорових мікроорганізмів у ризосфері сої порівняно з такою у ґрунті за різних систем удобрення. Загалом максимальна чисельність неспорових мікроорганізмів спостерігалась у ризосфері сої у фазу побуріння рослин за екологічної та біологічної систем удобрення, що на 18,3 та 26,1 % вище показників контрольного варіанта.

Мікробіологічні коефіцієнти дозволяють узагальнити процеси, що відбуваються у ґрунті, та показати їх спрямованість. Так, високі значення коефіцієнта мінералізації-імобілізації азоту свідчать про переважання процесів деструкції органічної речовини над її синтезом. Зниження коефіцієнта педотрофності свідчить про зменшення активності розкладання органічної речовини ґрунту, зокрема гумусу, а коефіцієнт оліготрофності вказує на зниження вмісту в ґрунті доступних поживних речовин.

Дані мікробіологічних коефіцієнтів інтенсивності перебігу ґрунтово-біологічних процесів в агрофітоценозах сої за різних систем удобрення наведено в табл. 5.

Високі значення коефіцієнта мінералізації-імобілізації азоту (1,37-1,55) свідчать про переважання про-

цесів деструкції органічної речовини над синтезом у варіанті промислової системи удобрення за всіх досліджуваних фаз розвитку рослин сої. У варіанті екологічної системи удобрення показники коефіцієнта були значно нижчими (0,72-0,83), і лише у фазу побуріння бобів спостерігалась деструкція органічної речовини (1,39). За застосування біологічної системи удобрення показники коефіцієнта мінералізації-імобілізації азоту були найнижчим (0,60-0,99), що свідчить про зрівноваження процесів мінералізації та імобілізації.

За застосування промислової системи удобрення показники коефіцієнта педотрофності були доволі високими у фазу сходів та бутонізації (1,25 та 1,65), і лише у фазу побуріння бобів його параметри були меншими одиниці (0,80), що свідчить про збільшення інтенсивності розкладу органічної речовини ґрунту, зокрема гумусових сполук. За застосування екологічної та біологічної систем удобрення впродовж онтогенезу сої показники коефіцієнта педотрофності становили 1,03-2,00, з максимумом у період активного споживання поживних речовин рослинами – фаза бутонізації.

Таблиця 5. Мікробіологічні коефіцієнти інтенсивності перебігу ґрунтово-біологічних процесів в агрофітогеоценозах сої за різних систем удобрення, 2016-2019 рр.

Мікробіологічні коефіцієнти	Система удобрення								
	промислова (контроль)			екологічна			біологічна		
	фази росту культури								
	сходи	бутонізація	побуріння бобів	сходи	бутонізація	побуріння бобів	сходи	бутонізація	побуріння бобів
Мінералізації-імобілізації азоту (КАА/МПА)	1,52	1,37	1,55	0,83	0,72	1,39	0,60	0,71	0,99
Педотрофності (ПА/МПА)	1,25	1,65	0,80	1,03	1,58	1,17	1,45	2,00	1,08
Оліготрофності (ГА/МПА)	1,61	1,01	0,94	1,14	0,54	0,84	1,58	0,52	0,48

Максимальні значення коефіцієнта педотрофності були зафіксовані у варіанті біологічної системи удобрення у фазу бутонізації рослин – 2,00. Якщо ж більш детально розглядати закономірності зміни даного показника, то підвищення його значення свідчить про збільшення інтенсивності розкладу органічної речовини ґрунту, однак біологічна система удобрення базується виключно на органічному добриві. А отже, у даному випадку коефіцієнт педотрофності свідчить про активне розкладання мікроорганізмами органічних добрив, внесених у ґрунт для забезпечення потреб рослин в елементах живлення.

Як зазначено вище, високі значення коефіцієнта оліготрофності вказують на зниження вмісту в ґрунті поживних речовин. Варто зазначити, що у фазу сходів значення даного коефіцієнта перебували в межах 1,14-1,61 по всіх варіантах систем удобрення сої. Аналіз погодних умов початку вегетаційного періоду років проведення досліджень показав дефіцит вологи в ґрунті на час проростання сої (дані не представлено). А отже, навіть за умови застосування мінеральних елементів

живлення вони могли бути недоступними як рослинам, так і мікроорганізмам за рахунок нестачі вологи ґрунту.

Показники коефіцієнта оліготрофності екологічної та біологічної систем удобрення на етапах бутонізації та побуріння бобів (0,52-0,84) свідчать про хорошу забезпеченість ґрунтової мікробіоти легкозасвоюваними органічними речовинами та формування оптимальних умов для функціонування ґрунтового мікробного комплексу.

Аналіз мікробіологічних коефіцієнтів для ризосферної мікробіоти також виявив істотні відмінності їх значень для різних систем удобрення (табл. 6).

Подібно до ґрунту, у ризосфері сої у варіанті промислової системи удобрення нами було отримано високі значення коефіцієнта мінералізації-імобілізації (1,87-2,03), що свідчить про переважання процесів деструкції органічної речовини над синтезом за всіх досліджуваних фаз розвитку рослин сої. У варіанті екологічної системи удобрення переважання процесів деструкції над синтезом спостерігалось лише у фазу побуріння бобів, а за біологічної системи удобрення – у фазу бутонізації (1,19).

Таблиця 6. Мікробіологічні коефіцієнти інтенсивності перебігу ґрунтово-біологічних процесів у ризосфері сої за різних систем удобрення, 2016-2019 рр.

Мікробіологічні коефіцієнти	Системи удобрення					
	промислова (контроль)		екологічна		біологічна	
	фази росту культури					
	бутонізація	побуріння бобів	бутонізація	побуріння бобів	бутонізація	побуріння бобів
Мінералізації-імобілізації азоту (КАА/МПА)	1,87	2,03	0,81	1,39	1,19	0,82
Педотрофності (ПА/МПА)	1,34	1,88	0,95	1,47	1,78	1,63
Оліготрофності (ГА/МПА)	1,88	0,76	0,81	0,17	1,16	0,20

Показники коефіцієнта педотрофності були високими у ділянці ризосфери сої у фазу бутонізації на промисловій та біологічній системах (1,34 та 1,78), а у фазу бутонізації – за умов застосування всіх систем удобрення.

Установлено, що, відповідно до коефіцієнта оліготрофності, у фазу бутонізації рослин сої добре забезпечення легкозасвоюваними органічними речовинами було за екологічної системи удобрення (0,81). У фазу побуріння бобів за промислової, екологічної та біологічної систем удобрення спостерігалась хороша забезпеченість ґрунтової мікробіоти легкозасвоюваними органічними речовинами. Установлені закономірності відповідають фізіологічним вимогам рослин сої, адже у фазу побуріння бобів потреба в елементах живлення набагато менша, ніж у фазу бутонізації.

Висновки. Проведені дослідження показали, що застосування для вирощування сої в умовах короткочасних сівозмієн екологічної системи удобрення зі збалансованим поєднанням мінеральних та органічних добрив і біологічної системи удобрення із сучасними органічними добривами та гуматами сприяє збільшенню чисельних показників мікробіоти ґрунту та поліпшенню перебігу процесів трансформації органічних сполук порівняно з промисловою системою удобрення, насиченою мінеральними добривами.

Установлено, що мінеральне удобрення сої суттєво посилює розвиток мікроорганізмів, які використовують азот мінеральних сполук, а от за екологічної та біологічної систем удобрення чисельність амілолітичних мікроорганізмів була меншою порівняно з промисловою системою удобрення. У той же час чисельність оліготрофних

рофних мікроорганізмів була найвищою при застосуванні промислової системи удобрення, що свідчить про нестачу легкодоступних елементів живлення та посилення гуміфікаційних процесів. Отримані нами коефіцієнти мінералізації-імобілізації азоту, педотрофності та оліготрофності підтвердили визначені закономірності процесів мінералізації та імобілізації азоту та доступності легкозасвоюваних органічних речовин у ґрунті за різних систем удобрення.

Список використаних джерел:

1. Formation of the structure of microbiocenoses of soils of agroecosystems depending on trophic and hydrothermal factors / O. S. Demyanyuk, V. P. Patyka, O. V. Sherstoboeva, A. A. Bunas // *Biosystems Diversity*. – 2018. – 26(2). – P. 103–110. doi:10.15421/011816
2. Aislabie J. A. Soil microbes and their contribution to soil services. / J. A. Aislabie, J. Deslippe; J. R. Dymond (Ed.) // *Ecosystem services in New Zealand – condition sand trends*. – New Zealand: Manaaki Whenua Press, 2013. – P. 143–161.
3. Pandey S. N. Diversity, functions, and stress responses of soil microorganisms / S. N. Pandey, M. Abid, M. M. Khan; D. Egamberdieva, P. Ahmad (Eds.) // *Plant microbiome: Stress response. Microorganisms for Sustainability*, 5. – 2018. – 1–19. http://doi.org/10.1007/978-981-10-5514-0_1
4. Гадзало Я. М. Агробіологія ризосфери рослин: монографія / Я. М. Гадзало, Н. В. Патыка, А. С. Заришник. – К.: Аграрна наука, 2015. – 386 с.
5. Мекіч М. З. Функціональне і прикладне значення біологічної активності ґрунту. Біологічні студії / М. З. Мекіч, Н. М. Джура, О. І. Терек. – 2013. – Т. 7, № 3. – С. 247–258.
6. Москалевська Ю. П. Біологічна активність та мікробна трансформація органічної речовини чорнозему, типового за різних систем землеробства / Ю. П. Москалевська, М. В. Патыка. // Науково-практичний журнал "Збалансоване природокористування". – 2014. – № 2. – С. 68–72.
7. Танчик С. П. Екологічна система землеробства в Лісостепу України: метод. рекомендації для впровадження у виробництво / С. П. Танчик, О. А. Демидов, Ю. П. Манько. – К.: НУБІП України, 2011. – 39 с.
8. Методика агрохімічних досліджень / В. І. Філон, В. А. Казаков, Г. Ф. Ольховський, В. С. Залізівський. – Х., 2017. – 224 с.
9. Люта В. А. Практикум з мікробіології: навч. посіб. (ВНЗ І–ІІІ р. а.) / В. А. Люта, О. В. Кононов. – К.: "Медицина", 2018. – 184 с. – ISBN: 978-617-505-635-6.
10. Іутинська Г. О. Мікробні біотехнології для реалізації нової глобальної програми забезпечення сталого розвитку агроосфери України / Г. О. Іутинська // *Агроекологічний журнал*. – 2017. – № 2. – С. 149–155.
11. Титова В. И. Методы оценки функционирования микробиоценоза почвы, участвующего в трансформации органического вещества: науч.-метод. Пособие / В. И. Титова, А. В. Козлов. – Нижний Новгород: Нижегородская с.-х. академия, 2012. – 64 с.
12. Romero-Olivares A. L. Soil microbes and their response to experimental warming over time: A meta-analysis of field studies / A. L. Romero-Olivares, S. D. Allison, K. K. Treseder // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2017. – 107. – P. 32–40. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.12.026>
13. Статистичний аналіз агрономічних дослідних даних в пакеті Statistica 10.0: метод. вказівки / О. І. Присяжнюк, Г. М. Каражбей, Н. В. Лещук та ін. – К.: "Нілан-ЛТД", 2016. – 54 с.
14. Вплив агротехнічних заходів на мікробні угруповання сірого лісового ґрунту. Проблеми екологічної біотехнології [Електронне наукове видання] / І. М. Малиновська, М. А. Ткаченко, В. Г. Сачок, М. О. Скуміна. – 2014. – № 1. – Режим доступу: <http://ecobio.nau.edu.ua/index.php/ecobiotech/article/view/6741/7552>
15. Малиновська І. М. Спрямованість мікробіологічних процесів у темно-сірому опідзоленому ґрунті за різних технологій вирощування сої. Проблеми екологічної біотехнології [Електронне наукове видання] / І. М. Малиновська. – 2012. – № 1. – Режим доступу: <http://ecobio.nau.edu.ua/index.php/ecobiotech/article/view/767/744>
16. Маменко П. М. Ефективність симбіозу та продуктивність сої, інокульованої новими аналітично селекціонованими культурами *Bradyrhizobium japonicum* / П. М. Маменко, С. М. Маліченко, С. В. Омельчук

// *Вісник Харківського національного аграрного університету. Сер.: Біологія*. – 2014. – Вип. 1(31). – С. 72–78.

17. Біогенність чорноземів типових Українського степового природного заповідника (відділення "Михайлівська цілина") / К. Б. Новосад, Д. В. Гавва, А. В. Ревтьє, М. М. Фісун // *Вісник ХНАУ*. – 2010. – № 5. – С. 67–75.

References (Scopus):

1. Demyanyuk O. S., Patyka V. P., Sherstoboeva O. V., Bunas A. A. Formation of the structure of microbiocenoses of soils of agroecosystems depending on trophic and hydrothermal factors. *Biosystems Diversity*, 26(2), 2018. 103–110. doi:10.15421/011816
2. Aislabie J. A., Deslippe J. Soil microbes and their contribution to soil services. In: Dymond, J. R. (Ed.). *Ecosystem services in New Zealand – conditions and trends*. Manaaki Whenua Press, New Zealand, 2013. P. 143–161.
3. Pandey S. N., Abid M., Khan M. M. A. A. Diversity, functions, and stress responses of soil microorganisms. In: Egamberdieva, D., & Ahmad, P. (Eds.). *Plant microbiome: Stress response. Microorganisms for Sustainability*, 5, 2018. 1–19. http://doi.org/10.1007/978-981-10-5514-0_1
4. Gadzalo Y. M., Patyka N. V., Zariyshnyak A. S. Agrobiology of the plant rhizosphere: monograph. K.: Agrarian Science, 2015. 386 p.
5. Mekich M. Z., Dzhura N. M., Terek O. I. Functional and applied value of soil biological activity. *Biological studies*. 2013. T. 7. № 3. S. 247–258.
6. Moskalevska Yu. P., Patyka M. V. Biological activity and microbial transformation of organic matter of chernozem typical of various farming systems. *Scientific and practical journal "Balanced Nature Management"*. 2014. № 2. S. 68–72.
7. Tanchyk S. P., Demidov O. A., Manko Yu. P. Ecological system of agriculture in the forest-steppe of Ukraine. Guidelines for implementation in production. To: NULES of Ukraine, 2011. 39 p.
8. Filon V. I., Kazakov V. A., Olkhovskiy H. F., Zalivovskiy V. S. Methods of agrochemical research. H., 2017. 224 p.
9. Liuta V. A., Kononov O. V. Workshop on Microbiology: Textbook (Higher Education Institutes I–III RA). K.: "Medicine", 2018. 184 p. ISBN: 978-617-505-635-6.
10. Iutynska H. O. Microbial biotechnology for the implementation of the new global program for sustainable development of the Ukrainian agrosphere. *Agroecological Journal*, №2. 2017, pp. 149–155. T. 7. № 3. S. 149–155. Titova V. I., Kozlov A. V. Methods for assessing the functioning of the soil microbiocenosis involved in the transformation of organic matter: Scientific and methodological manual. Nizhny Novgorod: Nizhny Novgorod. Academy, 2012. 64 p.
12. Romero-Olivares A. L., Allison S. D., Treseder K. K. Soil microbes and their response to experimental warming over time: A meta-analysis of field studies. *Soil Biology and Biochemistry*, 107, 2017. 32–40. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.12.026>
13. Prisyazhniuk O. I., Karazhbei H. M., Leshchuk N. V., Tsyba S. V., Mazhuha K. M., Brovkin V. V., Symonenko V. A., Maslechkin V. V. Statistical analysis of agronomic research data package Statistica 10. Guidelines. Kyiv: Nilan-Ltd. 2016. 54 p.
14. Malynovska I. M., Tkachenko M. A., Sachok V. H., Skumina M. O. Influence of agrotechnical measures on microbial groups of gray forest soil. Problems of environmental biotechnology [electronic scientific publication]. 2014. № 1. Access mode: <http://ecobio.nau.edu.ua/index.php/ecobiotech/article/view/6741/7552>
15. Malynovska I. M. Orientation of microbiological processes in dark gray podzolized soil under different technologies of soybean cultivation. Problems of environmental biotechnology [electronic scientific publication]. 2012. №1. Access mode: <http://ecobio.nau.edu.ua/index.php/ecobiotech/article/view/767/744>
16. Mamenko P. M., Malichenko S. M., Omelchuk S. V. Symbiosis efficiency and soybean productivity inoculated with new analytically selected *Bradyrhizobium japonicum* cultures. Bulletin of the Kharkiv National Agrarian University. Avg.: Biology. 2014. Vol. 1 (31). Pp. 72–78.
17. Novosad K. B., Havva D. V., Revtye A. V., Fisun M. M. The biogenicity of the chernozem of the typical Ukrainian steppe nature reserve (Branch "Mykhailivka virgin soil"). *KhNAU Bulletin*. 2010. №5. P. 67–75.

Надійшла до редколегії 23.01.2019

Отримано виправлений варіант 24.02.2019

Підписано до друку 24.02.2019

Received in the editorial 23.01.2019

Received a revised version on 24.02.2019

Signed in the press on 24.02.2019

S. Hudz, Ph.D. stud.,
L. Skivka, Dr. Sc.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
O. Prisyazhniuk, Ph.D.,
Ya. Tsvei, Dr. Sc.
Institute of Bioenergy Crops and Sugar Beet NAAS, Kyiv, Ukraine

MICROBIOLOGICAL ACTIVITY OF SOILS BY SOYBEAN WITH DIFFERENT VARIANTS OF FERTILIZATION

The aim of the study was comparative evaluation of microbiological processes occurring in the soil and rhizosphere during the soybean cultivation in the conditions of short-term rotation with the use of different fertilizer systems. Methods. The content of ammoniating, amylolytic, pedotrophic, oligotrophic, asporous microorganisms, and micromycetes was determined. The soil and rhizosphere microbiological processes were characterized by mineralization – immobilization, oligotrophism, and pedotrophism coefficients. The use of ecological and biological fertilizer systems was accompanied by the increase of ammoniating microorganisms in the soybean budding phase. The use of exclusively mineral fertilizers of soybean has only significantly increased the development of microorganisms which use nitrogen of mineral compounds. The number of oligotrophic microorganisms was the highest, indicating that the stocks of readily available nutrients were depleted and that humification processes were intensified. For the ecological system of

fertilizers, the coefficient of nitrogen mineralization-immobilization was 0.72-0.83, and for the biological system was the lowest 0.60-0.99. It confirms the equilibrium of the processes of mineralization and immobilization. The oligotrophic coefficients for the ecological and biological fertilizer systems at the stages of budding and browning of beans indicate the good availability of soil microbiota with easily digestible organic substances. The use of an ecological fertilizer system with a balanced combination of mineral and organic fertilizers and a biological fertilizer system with modern organic fertilizers and humates increases the activity of soil microbiota and improves the processes of organic compound transformation of.

Keywords: microbial processes, fertilizer system, soybean, soil microbiota.

С. Гудзь, асп.,

Л. Скиска, д-р биол. наук

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина,

О. Присяжнюк, канд. с.-х. наук,

Я. Цвей, д-р с.-х. наук

Институт биоэнергетических культур и сахарной свеклы НААН Украины, Киев, Украина

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЧВЫ ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ СОИ С РАЗЛИЧНЫМИ ВАРИАНТАМИ УДОБРЕНИЯ

Целью работы была сравнительная оценка микробиологических процессов, происходящих в почве и ризосфере при выращивании сои в условиях короткороотационных севооборотов с использованием различных систем удобрения. Определяли содержание в почве и в ризосфере аммонифицирующих, амилотических, педотрофных, олиготрофных микроорганизмов, численность неспоровой микрофлоры и микромицетов. Направленность микробиологических процессов почвы и ризосферы рассчитывали с помощью коэффициентов минерализации-иммобилизации, олиготрофности и педотрофности. На вариантах экологической и биологической систем удобрения численность аммонифицирующих микроорганизмов в фазу бутонизации сои увеличивалась по сравнению с промышленной системой удобрения. Применение исключительно минерального удобрения сои только существенно усилило развитие микроорганизмов, использующих азот минеральных соединений. Установлено, что численность олиготрофных микроорганизмов была высокой, что свидетельствует об исчерпании запасов легкодоступных питательных элементов и усилении гумификационных процессов. По экологической системе удобрения коэффициент минерализации-иммобилизации азота был на уровне 0,72-0,83, а по биологической системе – самым низким, 0,60-0,99, что подтверждает уравнивание процессов минерализации и иммобилизации. Коэффициенты олиготрофности экологической и биологической систем удобрения на этапах бутонизации и побурения бобов свидетельствуют о хорошей обеспеченности почвенной микробиоты легкоусвояемыми органическими веществами. Применение экологической системы удобрения со сбалансированным сочетанием минеральных и органических удобрений и биологической системы удобрения с современными органическими удобрениями и гуматами способствует увеличению активности микробиоты почвы и улучшению процессов трансформации органических соединений.

Ключевые слова: микробные процессы, система удобрения, соя, грунтовая микробиота.

УДК 612.35:616.36

DOI: https://doi.org/10.17721/1728_2748.2020.80.63-68

Т. Лященко, канд. биол. наук,

М. Завгородній, студ.,

М. Жидик, студ.,

А. Погребна, асп.,

С. Весельський, д-р биол. наук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

П. Цапенко, наук. співроб.

Інститут фізіології імені О. О. Богомольця НАН України, Київ, Україна

ВПЛИВ ЕНДОГЕННИХ ПРОСТАНОЇДІВ НА ЖОВЧОСЕКРЕТОРНУ ФУНКЦІЮ У ЩУРІВ РІЗНИХ ВІКОВИХ ГРУП

Жовчосекреторну функцію в умовах блокади природного активатора синтезу простагландинів циклооксигенази введенням ацетилсаліцилової кислоти (100 мг/кг маси тіла тварини, внутрішньопортально) досліджували на 30 нелінійних білих щурах-самцях трьох вікових груп: ювенільної (маса 130–175 г), зрілої (маса 200–250 г) і старої (маса більше 300 г) в умовах гострого експерименту. Досліджено зміни об'ємної швидкості жовчоутворення в гострих експериментах та біохімічного складу жовчі методом тонкошарової хроматографії.

Хроматографічно з наступною денситометрією визначався відносний вміст холевої, хенодезоксихолевої, тауро-холевої та глікохолевої жовчних кислот у секреті печінки щурів. Дебіт жовчних кислот розраховували як множину концентрації жовчних кислот, помноженої на об'єм секретованої жовчі в одній відповідній тридцятихвилинній пробі. Коефіцієнти кон'югації розраховували для кожної тридцятихвилинної проби.

Установлено, що, імовірно, ендogenous простанойди пригнічують жовчосекреторну функцію печінки, оскільки блокада їх синтезу спричиняла підвищення холерезу на 42,2–112,5 % у щурів усіх дослідних вікових груп відносно контролю. У жовчі щурів зрілої та ювенільної вікових груп ендogenous простагландини, імовірно, пригнічують процеси кон'югації на 117–189,1 % порівняно з контролем, тоді як у старій віковій групі ці регулятори впливають на процеси з'єднання жовчних кислот із гліцином протилежним чином. Аналіз співвідношення кон'югованих і вільних жовчних кислот у секреті щурів зазначених груп показав, що зміни якісного складу жовчі у щурів за умов блокади циклооксигенази відбуваються переважно за рахунок посилення синтезу вільних жовчних кислот *de novo*. Відповідно ендogenous простанойди спричиняють протилежний вплив. Отже, ендogenous простагландини чинять різноспрямований вплив на жовчосекреторну функцію щурів різних вікових груп, що дає змогу говорити про неоднозначну роль цих біологічно активних сполук у регуляції холерезу на різних стадіях онтогенетичного розвитку.

Ключові слова: холерез; простагландини; печінка; холева, хенодезоксихолева, глікохолева, таурохолева жовчні кислоти; вік; щури.

Вступ. Ейкозаноїди у різних співвідношеннях були виявлені практично у всіх тканинах і органах ссавців. Тонкі механізми регуляції синтезу та широка розповсюдженість в організмі дозволяє цим біологічно активним речовинам здійснювати різноспрямований вплив на регуляторні процеси у клітинах. За літературними даними дослідів *in vivo*, *in situ* та *in vitro* показували неодноразові результати щодо ефектів простанойдів [1].

Живий організм має свої особливості життєдіяльності на різних етапах онтогенетичного розвитку. Це, безумовно, стосується внутрішньоклітинної, внутрішньотканинної

та системної регуляції біологічних процесів. З віком змінюється кількісне співвідношення пулу простагландинів, рівень експресії рецепторів до них та активність ферментних систем, які відповідають за синтез простагландинів в усіх тканинах організму [1–4]. Вплив простагландинів на жовчосекреторну функцію печінки та біохімічний склад жовчі на сьогодні є недостатньо дослідженими [5, 6]. Особливо випускаються з уваги вікові особливості ефектів простанойдів на метаболічні процеси у печінці. Крім того, вибір тематики даного дослідження спонукало все ширше

застосування протизапальних речовин нестероїдної групи в сучасній фармацевтичній промисловості.

Метою нашої роботи стало дослідження впливу ендогенних простагландинів на жовчосекреторну функцію у щурів різних вікових груп.

Методи та матеріали. Жовчосекреторну функцію в умовах блокади природного активатора синтезу простагландинів циклооксигенази введенням ацетилсаліцилової кислоти досліджували на 30 нелінійних білих щурах-самцях трьох вікових груп: ювенільної (маса 130–175 г), зрілої (маса 200–250 г) і старої (маса більше 300 г) в умовах гострого експерименту [7]. Усі експерименти над тваринами виконували з дотриманням вимог Європейської конвенції із захисту хребетних тварин та Закону України № 3447 IV "Про захист тварин від жорстокого поводження".

За добу до початку експерименту тварини знаходились в умовах харчової депривації, доступ до води був вільним. Кожну вікову групу розділили на дві однакові: одна була контрольною ($n = 5$), а інша – дослідною ($n = 5$). Ацетилсаліцилову кислоту вводили у ворітну вену дозою 100 мг/кг маси тіла тварини. Через тонку пластикову канюлю збирали жовч із відпрепарованої жовчної протоки. Під час експерименту канюля була прив'язаною до протоки. Жовч збирали кожні тридцять хвилин, реєструючи об'ємну швидкість холесекреції (мкл/г маси тіла/хв). Тваринам кожної дослідної групи через 30 хв після початку експерименту внутрішньопортально вводили ацетилсаліцилову кислоту ("Sigma", США) дозою 25 мг/100 г маси тіла. Контрольним групам через 30 хв після початку експерименту вводили внутрішньопортально 0,9 % розчин NaCl у об'ємі 0,1 мл на 100 г маси тіла тварини. Далі впродовж 2,5 год визначали об'єм секретованої жовчі у кожній тридцятихвилинній пробі.

У кожній тридцятихвилинній пробі визначали концентрацію та вміст жовчних кислот методом тонкошарової хроматографії [5]: 0,1 мл жовчі додавали до 1,8 мл охолодженої екстрагуючої суміші етанол – ацетон – вода у співвідношенні 1 : 3 : 1. Проби охолоджували впродовж 30 хв, після чого центрифугували 10-12 хв при 3000-4000 об./хв. Екстракт висушували при температурі 37 °C до сухого залишку. Сухий залишок розчиняли у 50-100 мкл суміші етанол-вода (6 : 4). 5 мкл пробами наносили 15–20 мкл на попередньо розмічені хроматографічні аркуші. Хроматографічний розподіл вільних і кон'югованих жовчних кислот здійснювали у суміші аліловий ефір оцтової кислоти – толуол – бутанол – оцто-

ва кислота – вода у співвідношенні 3 : 1 : 1 : 3 : 1 на платівках "Silufol" (Чехія). Визначення окремих фракцій жовчних кислот проводили за допомогою стандарт-титрів і різнокольорової флуоресценції в УФ-діапазоні при активації платівок сірчаною кислотою. Жовчні кислоти розподілялися так: таурохолева (ТХК), суміш таурохоленедезоксихолевої та тауродезоксихолевої (ТХДХК + ТДХК), глікохолева (ГХК), суміш глікохоленедезоксихолевої та глікодезоксихолевої (ГХДХК + ГДХК), холева (ХК), суміш хенодезоксихолевої та дезоксихолевої (ХДХК + ДХК). Для кількісного визначення вмісту жовчних кислот хроматографи попередньо обприскували барвниками: 15 мл льодяної оцтової кислоти, 1 г фосфорномолібденової кислоти, 1 мл сірчаної кислоти. Проявляли хроматографи при температурі 60–70 °C впродовж 5 хв, після чого визначали вміст жовчних кислот на денситометрі ДО–1м ($\lambda = 620$ нм).

Дебіт жовчних кислот розраховували як множину концентрації жовчних кислот, отриманої методом тонкошарової хроматографії окремо для кожної жовчної кислоти, помноженої на об'єм секретованої жовчі в одній відповідній тридцятихвилинній пробі. Коефіцієнти кон'югації розраховували для кожної тридцятихвилинної проби.

Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали за допомогою пакету прикладних програм STATISTICA 10.0 ("Stat Soft", США). Вибірки перевіряли на нормальність за тестом Шапіро – Уїлка, нормально розподілені дані обраховували з використанням критерію t Стюдента. Значущими вважали зміни між контролем і дослідом при $P < 0,05$ [8, 9].

Результати та їх обговорення. Наші дослідження показали, що застосування блокатора синтезу ендогенних простагландинів у щурів ювенільної вікової групи викликало значуще збільшення (у середньому на 112,5 %) об'ємної швидкості жовчовиділення ($P < 0,05$) в усіх тридцятихвилинних періодах після введення блокатора (рис. 1 а). Можна припустити, що гіперхолеретичний ефект за умов блокади синтезу ендогенних простагландинів відображає пригнічуючий вплив останніх на жовчосекреторну функцію печінки у ювенільних щурів. У зрілої дослідної групи спостерігалось значуще збільшення об'ємної швидкості холерезу (у середньому на 52,3 %) з 1 по 5 тридцятихвилинний період включно ($P < 0,05$) після внутрішньопортального введення ацетилсаліцилової кислоти (рис. 1 б).

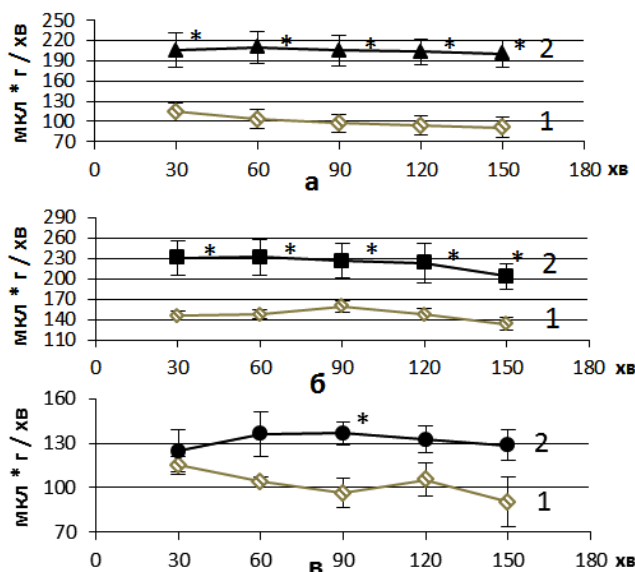


Рис. 1. Об'ємна швидкість жовчовиділення у щурів ювенільної (а), зрілої (б) та старої (в) вікових груп: (М ± m, n = 10): 1 – контроль, 2 – дослід. * $P < 0,05$ порівняно з контролем

Внутрішньопортальне введення блокатора синтезу простаноідів у зрілих щурів викликає достовірний гіперхолеретичний ефект упродовж усього експерименту. Простагландини, імовірно, впливають на об'ємну швидкість жовчовиділення опосередковано – як вазоконстриктор: знижується рівень кровопостачання печінкових часточок і, відповідно, знижується рівень холесекреції. Ці дані узгоджуються з іншими джерелами [1, 11], у яких стверджується, що ендogenous простагландини мають гіпохолеретичний вплив на печінку, тоді як блокада циклооксигенази викликає значуще збільшення рівня холерезу. У старій дослідній групі ми спостерігали тенденцію до зростання рівня холерезу після введення універсального блокатора циклооксигенази, значуще збільшення на 42,2 % було лише у третьому тридцятихвилинному періоді ($P < 0,05$) (рис. 1 в). Відповідно у старих щурів ендogenous простаноїди можуть викликати зниження об'ємної швидкості холерезу, але не

в такому ступені, як у ювенільних і статевозрілих. Отже, виходячи з отриманих нами результатів, можна стверджувати, що ендogenous простаноїди, імовірно, у різному ступені пригнічують холерез у щурів усіх вікових груп, оскільки застосування ацетилсаліцилової кислоти викликає гіперхолеретичний ефект.

Було проведено біохімічний аналіз жовчі з метою визначення впливу ендogenous простаноідів на синтез і обмін жовчних кислот, які є важливими агентами жовчі з огляду на їх емульгуючі та регуляторні щодо холерезу властивості. Наші дослідження показали, що дебіт жовчних кислот після введення блокатора циклооксигенази у ювенільній дослідній групі мав переважно тенденції до зростання. Так у таурохолевої та глікохолевої жовчних кислот дебіт значуще зростає (у середньому на 84,6 і 94,9 %), починаючи з першого для таурокон'югатів і третього тридцятихвилинного періоду для глікокон'югатів і до кінця досліді ($P < 0,05$) (рис. 2 а, б).

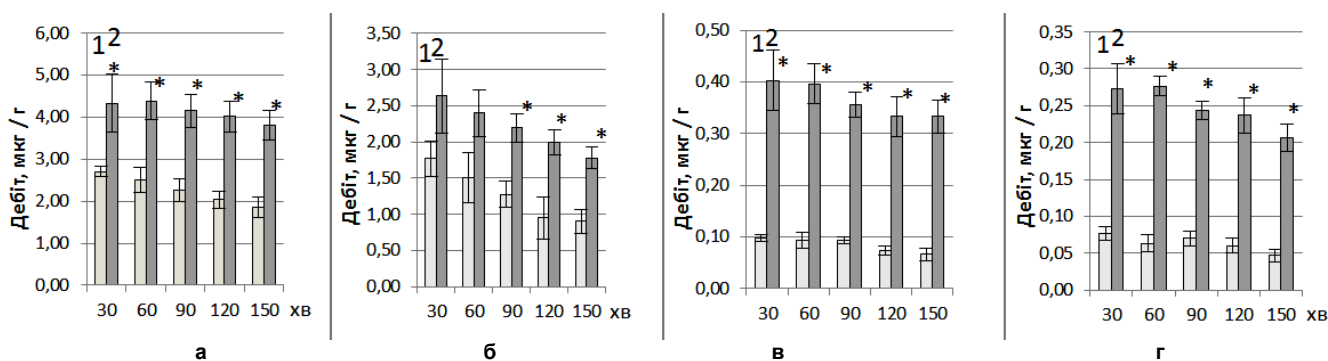


Рис. 2. Дебіт таурохолевої (а), глікохолевої (б), холевої (в) та суміші хенодезоксихолевої і дезоксихолевої (г) кислот у жовчі щурів ювенільної дослідної групи порівняно з контролем ($M \pm m$, $n = 10$): 1 – контроль, 2 – дослід

* $P < 0,05$ порівняно з контролем

Отже, можна зробити припущення, що ендogenous простагландини пригнічують процеси кон'югації жовчних кислот із таурином і гліцином у жовчі ювенільних щурів. Це узгоджується з літературними даними, які свідчать про те, що простагландини змінюють біохімічний склад жовчі [10, 11]. Проте, імовірно, що це не єдиний ефект ендogenous простаноідів у даній віковій групі, оскільки дебіт вільних холатів теж значуще зростає (холевої кислоти – в середньому на 334,4 %, хенодезоксихолевої кислоти – на 295,2 %, відповідно) у всіх тридцятихвилинних періодах ($P < 0,05$) (рис. 2 в, г). Це нашо вхує нас на думку, що ендogenous простагландини пригнічують синтез вільних жовчних кислот у ювенільних щурів. Підсумовуючи всі результати, які стосуються ювенільної групи щурів, можна виділити такі можливі особливості впливу ендogenous простаноідів на жовчосекреторну функцію: дані біологічно активні речовини

можуть впливати на синтез жовчних кислот як прямо, так і, імовірно, опосередковано через зменшення інтенсивності кровопостачання печінкової часточки. У зв'язку з цим може змінюватися не лише кількість синтезованих жовчних кислот, але й співвідношення між ними, що за літературними даними не є сталою величиною за різного рівня кровопостачання печінки [4, 12].

Дебіт жовчних кислот у зрілій дослідній групі щурів змінювався після введення блокади циклооксигенази подібно до ювенільної дослідної групи. Зокрема, дебіт таурохолевої кислоти значуще зростає у середньому на 51,1 % ($P < 0,05$) для першої, третьої, четвертої та п'ятої тридцятихвилинних проб досліді (рис. 3 а). При цьому дебіт суміші глікокон'югатів теж значуще зростає (у середньому на 188,3 %) у всіх тридцятихвилинних періодах після внутрішньопортального введення ацетилсаліцилової кислоти ($P < 0,05$) (рис. 3 б).

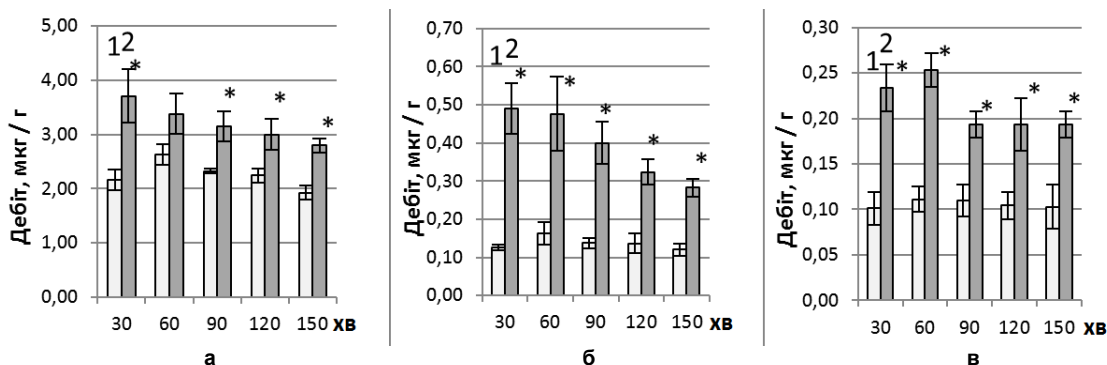


Рис. 3. Зміни дебіту таурохолевої кислоти (а), суміші глікокон'югатів (б) і суміші вільних жовчних кислот (в) у жовчі щурів зрілої дослідної групи порівняно з контролем ($M \pm m$, $n = 10$): 1 – контроль, 2 – дослід

* $P < 0,05$ порівняно з контролем

Отже, ендogenous простаноїди у зрілих щурів, імовірно, пригнічують процеси кон'югації жовчних кислот із амінокислотами, оскільки ми виявили зростання дебіту суміші гліко- та таурокон'югатів після блокади синтезу ейкозаноїдів, що теж є аргументом на користь цього припущення. Але дебіт глікохолової кислоти мав деяку тенденцію до зниження впродовж експерименту, що підтверджує висунуте нами припущення щодо впливу ендogenous простаноїдів на співвідношення між фракціями жовчних кислот – як кон'югатами, так і вільними, що ми спостерігали й у ювенільній дослідній групі. Щодо дебіту вільних холатів, то такий значуще зростає у середньому на 103,4 % у суміші хенодезоксихолової та дезоксихолової кислот ($P < 0,05$) (рис. 3 в) і мав тенденції до зростання у холової кислоти. Отже, можна припустити, що у зрілих щурів ендogenous простаноїди пригнічують як синтез вільних холатів, так і їх процеси кон'

югації з амінокислотами у зрілої дослідної групи, що було показано також на ювенільних щурах.

Процеси старіння організму і печінки зокрема позначаються на функціях її клітинних елементів. Ми дослідили вплив блокатора ендogenous простагландинів на біохімічний склад жовчі у щурів старої вікової групи й отримали такі результати. Зміни дебіту жовчних кислот у старої дослідної групи після блокади ЦОГ мали інший характер, аніж такі у ювенільної та зрілої дослідних груп. Зокрема, дебіт суміші глікокон'югатів мав тенденцію до зменшення, тоді як дебіт таурохолевої суміші таурохолатів незначуще збільшувався. Значущі зміни ($P < 0,05$) було виявлено у вмісті глікохолової кислоти: її дебіт знижувався в середньому на 50,9 % у перших двох тридцятихвилинних періодах (рис. 4 а).

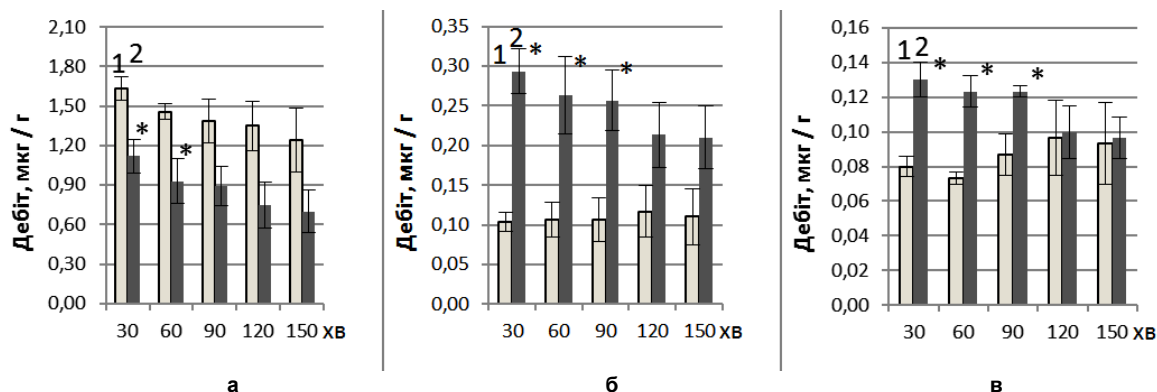


Рис. 4. Дебіт глікохолової (а), таурохолевої (б) і суміші вільних жовчних кислот (в) у старій дослідній групі порівняно з контролем ($M \pm m$, $n = 10$): 1 – контроль, 2 – дослід.

* $P < 0,05$ порівняно з контролем

Справджуються наші припущення про неоднозначний вплив ендogenous простаноїдів на співвідношення між фракціями жовчних кислот і для старої дослідної групи. При цьому ендogenous простагландини у старих щурів посилюють процеси кон'югації, зокрема із гліцином. Дебіт вільних жовчних кислот у старій дослідній групі за дії блокатора синтезу ендogenous простаноїдів зростає ($P < 0,05$) як у холової (у середньому на 157,3 %), так і у суміші хенодезоксихолової та дезоксихолової кислот – у середньому на 57,1 % (рис. 4 б, в). Підсумовуючи отримані результати, можна припустити, що у старій віковій групі ендogenous простагландини

сприяють утворенню кон'югованих із гліцином жовчних кислот і/або пригнічують синтез вільних холатів та їх кон'югацію із таурином.

За літературними даними, із віком у щурів погіршуються процеси кон'югації, тому ланка простаноїдів може регулювати концентрацію кон'югованих жовчних кислот у секреті [13]. Тому нами було вираховано коефіцієнт кон'югації для кожної вікової групи. У ювенільної дослідної групи за дії блокатора циклооксигенази спостерігалось значуще зниження ($P < 0,05$) коефіцієнта кон'югації під час усього дослідження, у середньому на 190,2 % (табл. 1).

Таблиця 1. Коефіцієнт кон'югації за дії блокатора циклооксигенази у щурів різних вікових груп

Час, хв	Ювенільні щури		Зрілі щури		Старі щури	
	контроль	дослід	контроль	дослід	контроль	дослід
10	43,47±2,01	13,55±0,56*	10,91±0,80	11,65±0,73	26,86±0,53	10,63±0,61*
20	43,32±2,69	13,88±0,41*	10,82±0,78	10,53±0,30	24,74±1,57	10,11±0,69*
30	37,56±3,61	14,65±0,38*	11,09±0,81	12,14±0,36	22,01±1,28	10,09±0,80*
40	40,06±3,93	14,91±0,59*	11,90±1,12	10,71±0,25	19,57±1,87	10,19±0,31*
50	42,81±2,16	14,60±0,12*	11,14±1,19	9,60±0,56	18,45±1,30	10,43±0,61*

* $P < 0,05$ порівняно з контролем

Це може свідчити про те, що у ювенільних щурів ланка ендogenous простаноїдів, імовірно, посилює процеси кон'югації. У зрілої дослідної групи змін коефіцієнта кон'югації виявлено не було (табл. 1), тоді як у старої дослідної групи за дії ацетилсаліцилової кислоти спостерігалось значуще зниження ($P < 0,05$) коефіцієнта кон'югації впродовж усіх тридцятихви-

линних періодів у середньому на 123 % (табл. 1). Імовірно, що похідні арахідонової кислоти у старих щурів відчутно посилюють процеси кон'югації, як і у щурів ювенільного віку. Проте дане питання не може бути остаточно закритим, оскільки є літературні дані, які свідчать, що з віком у жовчі збільшується вміст вільного холестеролу внаслідок зниження активності

7- α -гідроксилази, яка залучає холестерол у синтез жовчних кислот – а це може позначитися на вмісті кон'югатів жовчних кислот у жовчі, секретованій старими щурами [15]. Щодо практично незмінного співвідношення між вільними та пов'язаними із гліцином і таурином у жовчі щурів зрілої групи, можна зробити припущення про достатньо досконалу і лабільну компенсаторну здатність регуляторних ланок нейрогуморальної регуляції холерезу у тварин даної вікової групи, котра є ще недорозвиненою у ювенільних і "виробленою" у старих щурів. Дуже цікавим і значимим є той факт, що щури впливають на всі ланки жовчосекреторної функції печінки, змінюючи не тільки рівень об'ємної швидкості холесекреції, а й впливаючи на процеси синтезу вільних жовчних кислот та їх кон'югацію з амінокислотами, що не може не відзеркалитися на емульгаційній та літогенній властивостях секрету, тобто ейкозаноїди змінюють холерез як функцію.

З усього вищеописаного варто зазначити, що на сьогодні немає літературних даних, які свідчать про регуляцію простагландінами співвідношення між групами вільних і кон'югованих жовчних кислот. Тому це питання потребує подальшого з'ясування. Загалом можна зробити висновок, що різноспрямований вплив ендогенних простагландінів на жовчосекреторну функцію у різних вікових групах потребує більш поглиблених досліджень. Необхідно оцінити, як корелюють зі змінами біохімічного складу жовчі зміни пулу різних груп простагландінів у різних клітинних елементах печінки і гепатоцитах зокрема, дослідити вікові особливості впливу окремих груп простагландінів на жовчосекреторну функцію. Це дасть змогу створення і застосування у клініці препаратів на основі цих регуляторів.

Список використаних джерел:

1. Varfolomeev S. Prostaglandins – new type of biological regulators / S. Varfolomeev // *Sorov oboz zh.* – 1996. – 1(1): 42-7. [Russian].
2. Fennekohl A. Differential expression of prostanoid receptors in hepatocytes / A. Fennekohl, G. Puschel // *J. Hepatol.* – 1999. – 30: 38-47.
3. Prostaglandin E1 protects human liver sinusoidal endothelial cells from apoptosis induced by hypoxia reoxygenation / H. Yang, P. Majno, P. Morel et al. // *J. Gastr and Liv Physiol.* – 2002. – 456: 364-452.
4. Callery M. P. Kupffer cell prostaglandin-E production is amplified during hepatic regeneration / M. P. Callery, M. J. Mangino, M. W. Lye // *Hepatol.* – 1991. – 14(2): 368-72.
5. Bile secretion changes by prostaglandin F₂ α influence in rat liver / O. A. Mozheytova, P. K. Tsapenko, T. P. Lyaschenko et al. // *Naukov. Visn. Volin. Derzh. Univ. im. L. Ukr.* – 2006. – 6: 33-6. [Ukrainian].
6. Fuchs M. Regulation of bile acid synthesis: past progress and future challenges / M. Fuchs // *Am. J. Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2008. – 284: 43-9.
7. Zapadnjuk I. P. Laboratory animals. Breeding, maintenance, using in experiments / I. P. Zapadnjuk. – Kiev : Vyshha shkola. – 1983. [Russian].
8. Filimonova N. B. Statistical analysis of the data according to the principles of science-based medicine. Initial analysis of quantitative data, experimental results presentation / N. B. Filimonova, I. O. Fil. T. S. Mykhailova // *Med. Railw. Transp. Ukr.* – 2004. – 4: 30-8. [Ukrainian].
9. Filimonova N. B. Statistical analysis of the data according to the principles of science-based medicine. Comparison groups in quantitative terms / N. B. Filimonova, I. O. Fil // *Med. Transp. Ukr.* – 2005. – 4: 86-93. [Ukrainian].
10. Tolman K. G. Eicosanoids and the liver / K. G. Tolman // *Prostagl. and oth. Lipid Mediat.* – 2000. – 61: 163-74.
11. Morita I. Prostaglandin-synthesizing system in rat liver / I. Morita, S. Murota // *Eur. J. Biochem.* – 1978. – 90: 441-9.
12. Ganitkevich J. V. Role of bile and bile acids in organism physiology and pathology / J. V. Ganitkevich. – Kiev : Naukova dumka, 1980. [Russian].
13. Boyer J. L. Bile formation and secretion / J. L. Boyer // *Compr. Physiol.* – 2013. – 3(3): 1035-78.
14. Hardison W. Micellar theory of biliary cholesterol excretion / W. Hardison, J. T. Apter // *Amer. J. Physiol.* – 1972. – 222(1): 61-7.
15. Distribution of constitutive (COX-1) and inducible (COX-2) cyclooxygenase in postviral human liver cirrhosis: a possible role for COX-2 in the pathogenesis of liver cirrhosis / N. A. Mohammed, S. A. El-Aleem, H. A. El-Hafiz, R. T. McMahon // *J. Clinic. Pathol.* – 2009. – 57(10): 350-4.
16. Vane J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs / J. R. Vane // *Nature – New Biol.* – 1977. – 25: 232-5.
17. Reduction of bile secretion by prostaglandins in the rat in vivo / H. Weidenbach, J. Scheibner, E. F. Stange et al. // *Life Sc.* – 2006. – 58(18): 1531-8.
18. Influence of cholesterol feeding on bile acid metabolism in young and aged germ-free rats / K. Uchida, T. Satoh, T. Chikai et al. // *Jpn J. Pharmacol.* – 1996. – 71: 113-8.

Reference (Scopus):

1. Varfolomeev S. Prostaglandins – new type of biological regulators. *Sorov oboz zh.* 1996; 1(1): 42–7. [Russian].
2. Fennekohl A., Puschel G. Differential expression of prostanoid receptors in hepatocytes. *J. Hepatol.* 1999; 30: 38–47.
3. Yang H., Majno P., Morel P., Toso C., Triponez F., Oberholzer J., Mentha G., Lou J. Prostaglandin E1 protects human liver sinusoidal endothelial cells from apoptosis induced by hypoxia reoxygenation. *J Gastr and Liv Physiol.* 2002; 456: 364–452.
4. Callery M. P., Mangino M. J., Lye M. W. Kupffer cell prostaglandin-E production is amplified during hepatic regeneration. *Hepatol.* 1991; 14(2): 368–72.
5. Mozheytova O. A., Tsapenko P. K., Lyaschenko T. P., Veselsky S. P., Makarchuk M. Y. Bile secretion changes by prostaglandin F₂ α influence in rat liver. *Naukov. Visn. Volin. Derzh. Univ. im. L. Ukr.* 2006; 6: 33–6. [Ukrainian].
6. Fuchs M. Regulation of bile acid synthesis: past progress and future challenges. *Am. J. Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008; 284: 43–9.
7. Zapadnjuk I. P., Zapadnjuk V. I., Zaharija E. A., Zapadnjuk B. V. Laboratory animals. Breeding, maintenance, using in experiments. *Kiev: Vyshha shkola.* 1983. [Russian].
8. Filimonova N. B., Fil I. O., Mykhailova T. S. Statistical analysis of the data according to the principles of science-based medicine. Initial analysis of quantitative data, experimental results presentation. *Med. Railw. Transp. Ukr.* 2004; 4: 30–8. [Ukrainian].
9. Filimonova N. B., Fil I. O. Statistical analysis of the data according to the principles of science-based medicine. Comparison groups in quantitative terms. *Med. Transp. Ukr.* 2005; 4: 86–93. [Ukrainian].
10. Tolman K. G. Eicosanoids and the liver. *Prostagl. and oth. Lipid Mediat.* 2000; 61: 163–74.
11. Morita I., Murota S. Prostaglandin-synthesizing system in rat liver. *Eur J Biochem.* 1978; 90: 441–9.
12. Ganitkevich J. V. Role of bile and bile acids in organism physiology and pathology. *Kiev: Naukova dumka.* 1980. [Russian].
13. Boyer J. L. Bile formation and secretion. *Compr. Physiol.* 2013; 3(3): 1035–78.
14. Hardison W., Apter J. T. Micellar theory of biliary cholesterol excretion. *Amer J Physiol.* 1972; 222(1): 61–7.
15. Mohammed N. A., El-Aleem S. A., El-Hafiz H. A., McMahon R. T. Distribution of constitutive (COX-1) and inducible (COX-2) cyclooxygenase in postviral human liver cirrhosis: a possible role for COX-2 in the pathogenesis of liver cirrhosis. *J Clinic. Pathol.* 2009; 57(10): 350–4.
16. Vane J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature – New Biol.* 1977; 25: 232–5.
17. Weidenbach H., Scheibner J., Stange E. F., Adler G., Beckh K. Reduction of bile secretion by prostaglandins in the rat in vivo. *Life Sc.* 2006; 58(18): 1531–8.
18. Uchida K., Satoh T., Chikai T., Takase H., Nomura Y., Nakao H., Takeuchi N. Influence of cholesterol feeding on bile acid metabolism in young and aged germ-free rats. *Jpn J Pharmacol.* 1996; 71: 113–8.

Надійшла до редколегії 23.01.2019

Отримано виправлений варіант 24.02.2019

Підписано до друку 24.02.2019

Received in the editorial 23.01.2019

Received a revised version on 24.02.2019

Signed in the press on 24.02.2019

Т. Лященко, канд. біол. наук,
Н. Завгородний, студ.,
М. Жидык, студ.,
А. Погребна, асп.,
С. Весельский, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина
П. Цапенко, науч. сотр.
Институт физиологии имени О. О. Богомольца НАН Украины, Киев, Украина

ВЛИЯНИЕ ЭНДОГЕННЫХ ПРОСТАНОИДОВ НА ЖЕЛЧЕСЕКРЕТОРНУЮ ФУНКЦИЮ У КРЫС РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП

Желчсекреторную функцию в условиях блокады активатора синтеза простагландинов циклооксигеназы введением ацетилсалициловой кислоты (100 мкг/кг массы тела животного) изучали на 30 белых крысах-самцах трех возрастных групп: ювенильной (масса 130-175 г), зрелой (масса 200-250 г) и старой (масса более 300 г) в условиях острого эксперимента. Изучены изменения уровня холереза *in vivo* и биохимического состава желчи методом тонкослойной хроматографии. Хроматографически с последующей денситометрией изучалось относительное количество холевой, хенодезоксихолевой, таурохолевой и гликохолевой желчных кислот в секрете печени крыс. Дебит желчных кислот пересчитывали, умножая их концентрацию на объем секретированной желчи в одной тридцатиминутной пробе. Коэффициенты конъюгации пересчитывали для каждой пробы.

В острых экспериментах на нелинейных белых крысах трех возрастных групп изучали изменения объемной скорости секреции желчи при внутривенном введении блокатора фермента синтеза простагландинов циклооксигеназы – ацетилсалициловой кислоты. Исследованы изменения уровня холереза *in vivo* в условиях острого эксперимента и биохимического состава желчи методом тонкослойной хроматографии. Установлено, что, вероятно, эндогенные простаиноиды угнетают желчсекреторную функцию печени, так как блокирование их синтеза вызывало повышение холереза на 42–112,5 % у крыс всех возрастных групп относительно контроля. В желчи крыс зрелой и ювенильной возрастных групп эндогенные простагландины, вероятно, угнетают конъюгацию на 117–189,1 % относительно контроля в отличие от животных старой возрастной группы, где эти регуляторы влияют на процессы соединения желчных кислот с глицином противоположным образом. Связывание эндогенных простагландин, вероятно, усилило процессы конъюгации у несовременных крыс, тогда как в старой экспериментальной группе ацетилсалициловая кислота была значительно снижена в среднем на 123 %. Анализ соотношения свободных и конъюгированных желчных кислот в секрете печени крыс разных возрастных групп показал, что изменения качественного состава желчи у крыс при блокаде циклооксигеназы происходят в основном за счет усиления синтеза свободных желчных кислот *de novo*. Следовательно, эндогенные простаиноиды действуют противоположным образом. Эндогенные простагландины оказывают разностороннее влияние на желчсекреторную функцию крыс разных возрастных групп, что может свидетельствовать о неоднозначной роли этих биологически активных веществ в регуляции холереза на различных стадиях онтогенеза.

Ключевые слова: холерез; простагландины; печень; холевая, хенодезоксихолевая, таурохолевая, гликохолевая желчные кислоты; возраст; крысы.

T. Lyaschenko, stud.,
M. Zavorodnii, stud.,
M. Zhydyk, stud.,
A. Pohrebna, Ph.D. stud.,
S. Veselsky, Dr. Sc.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
P. Tsapenko, Researcher
Bohomolets Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

ENDOGENOUS PROSTANOIDS INFLUENCE ON BILE SECRETION IN DIFFERENT GROUPS OF RATS

In acute experiments on different age group of 30 white wild-type rats: juvenile (weight 130–175 g), mature (weight 200–250 g) and old (weight 300 g and more) we were investigated the changes in the volume rate of bile secretion with cyclooxygenase inhibition by acetylsalicylic acid (100 mg/kg weight of animal) which is a blocker of the prostaglandin synthesis enzyme.

We were explored the changes of the level of cholerisis and bile biochemical components by thin-layer chromatography *In vivo*. The relative abundances of cholecycle, chenodeoxycholic, taurocholic and glycocholic bile acids in the liver of rats were determined by chromatography, with the subsequent densitometry. The biliary acid flow rate was calculated as the sum of the bile acid concentration multiplied by the volume of secreted biliary in one relevant thirty-minute sample. The conjugation coefficients were calculated for each thirty minute sample.

Reduction of bile secretion by endogenous prostanoids was shown, because inhibition of prostaglandins synthesis caused the hypercholerisis on 42–112,5% in different rat age groups, compared to control. Endogenous prostaglandins suppressed the processes of conjugation in old and juvenile age group on 117–189,1 %, in contrast these regulators have no significant effect on bile acids association with glycine and taurine in mature rats. The binding of endogenous prostanoids probably increased the conjugation processes in juvenile rats, whereas in the old experimental group acetylsalicylic acid was significantly reduced by 123 % on average. Analysis of changes in free and conjugated bile acids in the rats of different age groups showed that the ratio of qualitative changes in structure of the liver bile in rats with the cyclooxygenase blockade is mainly due to enhanced synthesis of free bile acids *de novo*. Therefore, endogenous prostanoids affect in the opposite way. There are have multi-directional impact on bile secretion in different age groups of rat that means ambiguous role of these drugs in liver function regulation at different stages of ontogenesis.

Keywords: cholerisis; prostaglandins; liver; cholic, chenodeoxycholic, taurocholic, glycocholic bile acids; age; rats.

Наукове видання



ВІСНИК

КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

БІОЛОГІЯ

Випуск 1(80)

Оригінал-макет виготовлено ВПЦ "Київський університет"

Автори опублікованих матеріалів несуть повну відповідальність за підбір, точність наведених фактів, цитат, статистичних даних, відповідної галузевої термінології, імен власних та інших відомостей. Редколегія залишає за собою право скорочувати та редагувати подані матеріали.



Формат 60x84^{1/8}. Ум. друк. арк. 8,02. Наклад 300. Зам. № 220-9657.
Гарнітура Arial. Папір офсетний. Друк офсетний. Вид. № Б 1.
Підписано до друку 10.03.20

Видавець і виготовлювач
ВПЦ "Київський університет"

Б-р Тараса Шевченка, 14, м. Київ, 01030

☎ (38044) 239 32 22; (38044) 239 31 72; тел./факс (38044) 239 31 28
e-mail: vpc_div.chief@univ.net.ua; redaktor@univ.net.ua
<http://vpc.univ.kiev.ua>

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 1103 від 31.10.02