

УДК 00.57

DOI 10.17721/1728.2748.2023.94.1-54

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

Для викладачів, наукових співробітників, аспірантів і студентів.

|                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ГОЛОВНИЙ РЕДАКТОР</b><br><b>РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ</b> | Остапченко Людмила, д-р біол. наук, проф. (Україна)<br><br>Берегова Тетяна, д-р біол. наук, проф. (Україна); Бубріак Іван, канд. мед. наук (Велика Британія); Гапоненко Вадим, канд. техн. наук, проф. (США); Джаган Вероніка, канд. біол. наук, доц. (Україна); Держинський Микола, д-р біол. наук, проф. (Україна); Жолос Олександр, д-р біол. наук, проф. (Україна); Козирицька Кет, канд. техн. наук (США); Лугонія Ніколета, канд. хім. наук (Сербія); Людовіко Абенаволі, д-р мед. наук (Італія); Макай Шандор, д-р біол. наук, проф. (Угорщина); Макарчук Микола, д-р біол. наук, проф. (Україна); Мандрик Юрій, канд. мед. наук (Німеччина); Мартинюк Віктор, д-р біол. наук, проф. (Україна); Мневесь Руслан, лікар (Україна); Сиволоб Андрій, д-р біол. наук, проф. (Україна); Таран Наталія, д-р біол. наук, проф. (Україна); Торгало Єлизавета, канд. біол. наук (заст. голов. ред.) (Україна); Фагуні Шарміла, канд. біол. наук (Італія); Хоперія Вікторія, д-р мед. наук, проф. (Україна) |
| <b>Адреса редколегії</b>                              | Навчально-науковий центр "Інститут біології та медицини"<br>просп. акад. Глушкова, 2 а, м. Київ, 03127, Україна<br>☎ (38044) 521 35 98<br>e-mail: biovisnyk@knu.ua<br>web: <a href="https://bio.visnyk.knu.ua/">https://bio.visnyk.knu.ua/</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| <b>Затверджено</b>                                    | вченою радою ННЦ "Інститут біології та медицини"<br>10.10.23 (протокол № 4)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| <b>Зареєстровано</b>                                  | Міністерством юстиції України<br>Свідоцтво про державну реєстрацію<br>KB № 25415-15355 ПР від 03.02.23                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>Атестовано</b>                                     | Міністерством освіти і науки України (категорія Б)<br>Наказ № 1412 від 18.12.18                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <b>Індексування</b>                                   | DOAJ, Hinari, Open Academic Journal Index (OAJI),<br>Quality Open Access Market (QOAM), Research Bib, Index Copernicus,<br>Ulrich's Periodicals, CrossRef                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <b>Засновник<br/>та видавець</b>                      | Київський національний університет імені Тараса Шевченка<br>Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет"<br>Свідоцтво про внесення до Державного реєстру<br>ДК № 1103 від 31.10.02                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| <b>Адреса видавця</b>                                 | ВПЦ "Київський університет"<br>6-р Тараса Шевченка, 14, м. Київ, 01601<br>☎ (38044) 239 32 22, 239 31 58, 239 31 28<br>e-mail: vpc@knu.ua                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |

UDC 00.57

DOI 10.17721/1728.2748.2023.94.1-54

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.

|                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>EDITOR-IN-CHIEF</b>       | Ostapchenko Lyudmila, DSc (Biol.), Prof. (Ukraine)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>EDITORIAL BOARD</b>       | Abenavoli Ludovico, DSc (Med.) (Italy); Beregova Tetyana, DSc (Biol.), Prof. (Ukraine); Boubriak Ivan, PhD (Med.) (United Kingdom); Dzerzhynsky Mykola, DSc (Biol.), Prof. (Ukraine); Dzhagan Veronika, PhD (Biol.), Assoc. Prof. (Ukraine); Fagoonee Sharmila, PhD (Biol.) (Italy); Gaponenko Vadim, PhD (Engin.), Prof. (United States); Hoperia Viktoriya, DSc (Med.), Prof. (Ukraine); Kozyrytska Kat, PhD (Engin.) (United States); Lugonja Nikoleta, PhD (Chem.) (Republic of Serbia); Makarchuk Mykola, DSc (Biol.), Prof. (Ukraine); Makai Sandor, DSc (Biol.), Prof. (Hungary); Mandryk Yuriy, PhD (Med.) (Germany); Martynyuk Viktor, DSc (Biol.), Prof. (Ukraine); Mnevets Ruslan, Dr. (technical secretary) (Ukraine); Syvolob Andriy, DSc (Biol.), Prof. (Ukraine); Taran Nataliya, DSc (Biol.), Prof. (Ukraine); Torgalo Elizabeth, PhD (Biol.) (deputy editor) (Ukraine); Zholos Oleksandr, DSc (Biol.), Prof. (Ukraine) |
| <b>Address</b>               | Educational and scientific center "Institute of Biology and Medicine"<br>2a, acad. Glushkova av., Kyiv, 03127, Ukraine<br>☎ (38044) 521 35 98<br>e-mail: biovisnyk@knu.ua<br>web: <a href="https://bio.visnyk.knu.ua/">https://bio.visnyk.knu.ua/</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <b>Approved by</b>           | the Academic Council of the ESC "Institute of Biology and Medicine"<br>10.10.23 (protokol № 4)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| <b>Registered by</b>         | the Ministry of Justice of Ukraine<br>Certificate of state registration<br>KB № 25415-15355 ПП dated 03.02.23                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <b>Certified by</b>          | the Ministry of Education and Science of Ukraine (category B)<br>Order №1412 dated 18.12.18                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| <b>Indexing</b>              | DOAJ, Hinari, Open Academic Journal Index (OAJI),<br>Quality Open Access Market (QOAM), Research Bib, Index Copernicus,<br>Ulrich's Periodicals, CrossRef                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <b>Founded and published</b> | Taras Shevchenko National University of Kyiv<br>Publishing and Polygraphic Center "Kyiv University"<br>Certificate of entry into the State Register<br>ДК № 1103 dated 31.10.02                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <b>Address</b>               | PPC "Kyiv University"<br>14, Taras Shevchenko blvd., Kyiv, 01601<br>☎ (38044) 239 32 22, 239 31 58, 239 31 28<br>e-mail: vpc@knu.ua                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

---

## ЗМІСТ

---

### **АТАМАНЧУК Аліса, БІСЬКО Ніна**

Вплив розчинників для екстракції на вміст фенолів та антиоксидантну здатність біомаси штамів *Xylaria polymorpha* та *Xylaria longipes*..... 5

### **БОРОДІН Сергій, ЮЕТ Алевтина, ДВОРЩЕНКО Катерина**

Експресія генів *PTGS2* та *NOS2* у синовіальній рідині хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції..... 10

### **ВІРИЧ Павло, СМОКАЛ Віталій, ХАРЧЕНКО Оксана, КУЦЕВОЛ Наталія, ВІРИЧ Петро**

Хелатування двовалентних катіонів та антиракова активність похідних 8-гідроксихінолінів *in vitro*..... 15

### **НУЖИНА Наталія, ІВАНОВА Ірина**

Моніторинг посухостійкості інтродукованих видів високорослих дерев після зміни кліматичних умов урбопросторів..... 23

### **НЕФЬОДОВА Анастасія, РУДИК Марія, ДОВГИЙ Роман, СКІВКА Лариса**

Популяційний склад лейкоцитів периферичної крові у щурів з різними моделями хвороби Альцгеймера ..... 28

### **ТУГАРОВ Юрій, ЮЕТ Алевтина, ДВОРЩЕНКО Катерина**

Експресія генів *LRP1* та *OLR1* у крові хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції..... 35

### **КАЛАШНІКОВА Марина, САВЧУК Олексій, КАРБОВСЬКИЙ Віталій**

Оптимізація методу ензим-електрофорезу для використання як субстрат колагену ..... 41

### **ЧЕРНИХ Марія, ЗИМА Ігор**

Сприйняття видозмінених облич: дослідження потенціалів, пов'язаних з подією, під час обробки емоційного виразу..... 46

---

## CONTENTS

---

### **ATAMANCHUK Alisa, BSKO Nina**

- Effect of extraction solvents on the phenolic content and antioxidant capacity  
in *Xylaria polymorpha* and *Xylaria longipes* strains..... 5

### **BORODIN Sergiy, HUET Alevtyna, DVORSHCHENKO Kateryna**

- Expression of *PTGS2* and *NOS2* genes in the synovial fluid of patients with osteoarthritis  
after SARS-CoV2 infection ..... 10

### **VIRYCH Pavlo, SMOKAL Vitaliy, KHARCHENKO Oksana, KUTCEVOL Natalia, VIRYCH Petro**

- Chelation of divalent cations and anti-cancer activity of 8-hydroxyquinoline derivatives *in vitro* ..... 15

### **NUZHYNA Nataliia, IVANOVA Iryna**

- Drought resistance monitoring of introduced tall trees species under changed  
urban climatic conditions..... 23

### **NEFEDOVA Anastasia, RUDYK Maria, DOVHYI Roman, SKIVKA Larysa**

- Composition of peripheral blood leukocyte subsets in rats with different models of Alzheimer's disease..... 28

### **TUGAROV Yuriy, HUET Alevtyna, DVORSHCHENKO Kateryna**

- Expression of *LRP1* and *OLR1* genes in the blood of patients with osteoarthritis  
after SARS-CoV2 infection ..... 35

### **KALASHNIKOVA Maryna, SAVCHUK Olexiy, KARBOVSKIY Vitaliy**

- Optimization of enzyme electrophoresis method for using collagen as a substrate..... 41

### **CHERNYKH Maria, ZYMA Igor**

- Distorted face perception: an EPR study of emotional expression processing ..... 46

## EFFECT OF EXTRACTION SOLVENTS ON THE PHENOLIC CONTENT AND ANTIOXIDANT CAPACITY IN *XYLARIA POLYMORPHA* AND *XYLARIA LONGIPES* STRAINS

**Background.** Fungi of the genus *Xylaria* are known for their wide range of secondary metabolites, including antioxidant polyphenolic compounds. Due to their critical role as chain-breaking antioxidants, phenolic compounds have been studied extensively in plants and fungi. The objective of this study was to assess and compare the total phenolic content and antioxidant capacities of the biomass of different strains of two common representatives of this genus in Ukraine – *Xylaria polymorpha* and *Xylaria longipes* – by applying various solvents for extraction.

**Methods.** A vegetative mycelium was cultivated in submerged conditions and extracted with ethanol, methanol, and ethyl acetate. Total phenolic content in extracts was determined using the Folin–Ciocalteu method with gallic acid as the standard. Antioxidant activity was assessed by determining the DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical scavenging spectrophotometric assay. The correlation between the total phenolic content and antioxidant capacity of the extracts was assessed using the Pearson correlation coefficient for each organic solvent.

**Results.** Methanol was the most effective solvent in yielding the highest quantities of phenolic compounds. Among all the strains studied, *X. polymorpha* IBK 2736 exhibited the maximum yield of phenolic compounds at  $21,64 \pm 0,03$  mg GAE/g. Conversely, when ethyl acetate was used as the solvent, the phenolic yield from the biomass of the same strain was significantly lower at  $0,68 \pm 0,14$  mg GAE/g, as well as for other strains in our investigation. Furthermore, the methanol extract of *X. longipes* IBK 2726 demonstrated the highest antioxidant activity, reaching  $88,99 \pm 0,07$  %, while the ethyl acetate extract of *X. longipes* IBK 2718 exhibited the lowest antioxidant activity with a value of  $41,28 \pm 0,33$  %.

**Conclusions.** The results indicated that the amount of extracted phenolic compounds was greatly influenced by the choice of solvent. Methanol was found to be the most effective solvent for extracting these compounds from studied strains, outperforming ethanol and ethyl acetate. Moreover, methanol extracts displayed a strong antioxidant capacity, and the correlation analysis confirmed the relationship between it and the phenolic content present in them. Overall, all the strains investigated showed significant antioxidant potential, highlighting the importance of further studies of the chemical properties of their antioxidant components.

**Keywords:** polyphenols, antioxidant activity, *Xylaria*, Ascomycota, submerged cultivation, biomass.

### Background

The worldwide exploration of fungi as a source of novel active bioproducts is ongoing and remains relevant because of their potential in biotechnological applications. Fungi of the genus *Xylaria* Hill ex Schrank are among those that researchers are continuously screening for new bioactive compounds since these produce a range of secondary metabolites with different properties (Chen et al., 2018; Song et al., 2014). Among them, phenolic constituents are of particular interest because of their remarkable potential for free radicals scavenging and thus reducing oxidative stress (Mathew, Abraham, & Zakaria, 2015). Phenolic derivatives obtained from the fruiting bodies of xylariaceous species include tyrosol from *Xylaria longipes* Nitschke (Schneider, Anke, & Sterner, 1996), xylarinols from *Xylaria polymorpha* (Pers.) Grev. (Lee et al., 2009), globoscin from *Xylaria globosa* (Pers.) Mont. (Adeboya et al., 2010) etc.

Moreover, it has been reported that the content of polysaccharides and phenolic compounds in plants and fungi correlates with antioxidant activity (Cheung, Cheung, & Ooi, 2003; Guo et al., 2012; Kaur, & Kapoor, 2002). Fungi proved to be essential among sources of various natural antioxidants. Extracts prepared from the fruiting bodies and mycelium of medicinal mushroom species, such as *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst, *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers, *Inonotus obliquus* (Fr.) Pilát exhibited significant scavenging activity against the ABTS radical cation, DPPH, and superoxide radical anion (Lee et al., 2008; Mustafin et al.,

2022). Thus, it is important to consider the effect of the total phenolic content on the antioxidant activity of fungal extracts. To broaden the spectrum of such compounds, a comprehensive screening of new productive fungal species and strains remains relevant.

**The aim of our study** was to determine and compare the content of phenolic compounds in different strains of two widespread representatives of the genus *Xylaria* in Ukraine – *X. polymorpha* and *X. longipes*. The strains for this study were selected as promising for biomass accumulation based on preliminary culture and morphological investigation (Atamanchuk, & Bisko, 2022; Atamanchuk, 2023). In addition, the free radicals scavenging potential of studied strains was of particular focus. To ensure a more extensive screening of strains for total phenolic content and antioxidant activity, different solvents were used for the extraction.

### Methods

**Fungal strains, inoculum preparation and cultivating conditions.** All the strains were isolated into pure culture from the entostromatal tissue of fruiting bodies of *X. polymorpha* and *X. longipes*, collected in different regions of Ukraine and preserved in the IBK Mushroom Culture Collection (Bisko et al., 2023). For the experiments, fungal strains were first grown in Petri dishes for 7 days at  $25 \pm 1$  °C on a glucose-yeast-peptone agar medium (GYPA), containing (g/l): glucose, 25; peptone, 3; yeast extract, 3; MgSO<sub>4</sub>, 0,25; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1; agar-agar, 21. The obtained mycelium was homogenized and sterilely

inoculated in 250 ml Erlenmeyer flasks (in 6 duplicates), containing 100 ml of GYP medium (10 % v/v). Incubation was carried out for 9 days in submerged conditions on a laboratory shaker with the agitation speed of 120 rpm, at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , in darkness. Finally, mycelial biomass was harvested by filtration and dried at  $60^\circ\text{C}$  until constant weight.

**Extracts preparation.** Extraction was carried out using three types of solvents: ethyl acetate (98 %), ethanol (96 %) and methanol (98 %). For the extraction, previously powdered mycelial biomass was poured with each of the solvents in a ratio of 1:5 (w/v), stirred, and stored for 24 h at room temperature ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Then, the extracts were centrifuged for 15 min at 3000 g, afterwards the supernatant was separated and evaporated using a vacuum rotary evaporator at  $40^\circ\text{C}$ . The residues were dissolved in the same solvent in a ratio of 1:1 (w/v) and then stored at  $4^\circ\text{C}$  before further analysis.

**Determination of antioxidant activity.** The antioxidant capacity of studied extracts was determined by 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging assay (Liu et al., 2007). A volume of 0,1 ml of the extract was mixed with 2,9 ml of 120  $\mu\text{M}$  DPPH (Alfa aesar®) solution in methanol. The mixture was incubated for 30 min in the dark at  $37^\circ\text{C}$ . The absorbance was measured at 517 nm using UV-Visible spectrophotometer (Jenway® 6850). The DPPH radical scavenging activities were expressed as the percentage inhibition of free radical production or antioxidant index (AI %) using the following formula:

$$\text{AI}(\%) = ((A_0 - A_1)/A_0) \times 100,$$

where  $A_0$  is the absorbance of the control reaction (containing all reagents except the test compound),  $A_1$  is the absorbance of the test compound.

**Determination of total phenol content (TPC).** Total phenol content was estimated using Folin-Ciocalteu (FC) reagent-based assay (Elfahri et al., 2016). A volume of 0,5 ml extract and 0,5 ml of FC (Sigma-Aldrich®) reagent was mixed. After 3 min, 10 ml of 7,5 % sodium carbonate solution and 5 ml of distilled water was added. The final mixture was shaken and incubated in the dark at room temperature for 30 minutes. The absorbance was recorded at 750 nm, using a UV-Visible spectrophotometer (Jenway® 6850). This procedure was also repeated with aliquots of 1–500  $\mu\text{g/ml}$  gallic acid solutions which were used as a standard for the calibration curve. The total phenolic value of the samples was obtained from the regression equation  $y = 0,0025x + 0,0982$  with  $R^2 = 0,9852$ . The content of total phenolics was estimated as gallic acid equivalents (GAE) and then converted into mg/g of dry weight.

**Statistical Analysis.** All experiments (apart from cultivation) were performed in triplicate. The data were recorded as means  $\pm$  SD (standard deviation) and analyzed with Excel statistical functions using the Microsoft Office XP software. Correlations were obtained by Pearson correlation coefficient in bivariate correlations. Differences at  $p \leq 0,05$  were considered to be significant.

## Results

**Total phenolic content (TPC).** The concentration of phenolic compounds in the extracts, measured in milligrams of gallic acid equivalent per gram of dry weight of biomass (mg GAE/ g dw), varied depending on the extraction solvent used. Among the solvents tested, methanol extracts of both fungi exhibited the highest content of total phenolic compounds (TPC), followed by ethanol extracts. Ethyl acetate extraction, on the other hand, resulted in a significantly lower amount of phenols. The methanol extract

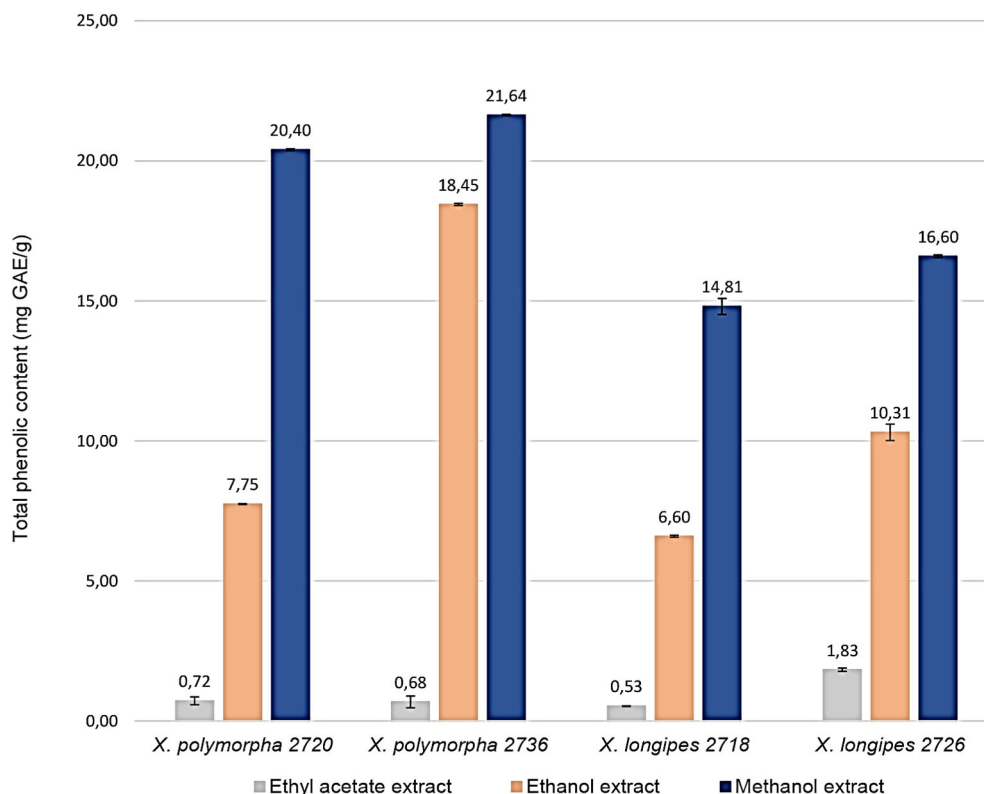
of *X. polymorpha* IBK 2736 had the highest TPC value among all the studied strains, reaching  $21,64 \pm 0,03$  mg GAE/g dw. A similar TPC value of  $20,40 \pm 0,02$  mg GAE/g dw was obtained when using methanol to extract biomass from another *X. polymorpha* strain – IBK 2720. In comparison, the TPC values for *X. longipes* were lower, with strain IBK 2718 and IBK 2726 yielding  $14,81 \pm 0,29$  mg GAE/g dw and  $16,60 \pm 0,04$  mg GAE/g dw, respectively.

As shown in Fig. 1, with ethanol the TPC values for *X. polymorpha* IBK 2720 and *X. longipes* IBK 2718 were approximately two and a half times lower than those obtained through methanol extraction. For the other two studied strains, TPC values were also lower than in methanol extraction, but the reduction was not as significant. Among the solvents tested, ethyl acetate performed the least effectively in extracting phenolic compounds. The amount of TPC in the extracts from *X. longipes* IBK 2726 was the highest –  $1,83 \pm 0,06$  mg GAE/g dw. Following closely were *X. polymorpha* IBK 2720 and IBK 2726, with similar values of  $0,72 \pm 0,21$  and  $0,68 \pm 0,14$  mg GAE/g dw, respectively (Fig. 1). The higher ( $p < 0,05$ ) yield of TPC with methanol extraction can be explained by solubility principle, suggesting that the polarity of the phenolic compounds in biomass of studied strains is similar to those in methanol.

The findings indicated that the methanol and ethanol extracts of the studied strains contain phenolic compounds comparable to those found in certain medicinal plants and mushrooms, known for their antioxidant properties. In the research conducted by (Proestos et al., 2006), authors observed a range of total phenolic content varying from 2,9 mg/g (for *Humulus lupulus* L. leaves) to 28,2 mg/g (for *Geranium purpureum* Vill. leaves) in greek aromatic plants. Other researchers have also reported similar values to ours but expressed in terms of 100 g of dry matter. Specifically, the phenolic content ranged from 34,5 mg/100 g in *Praecitrullus vulgaris* var. *fistulosus* (Stocks) Pangalo to 253,5 mg/100 g in *Chenopodium album* L. (Kaur, & Kapoor, 2002). When comparing the results obtained from similar studies on other fungi, it was observed that the choice of solvent had varying effects on the extraction of phenolic compounds depending on the species. For instance, in case of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm, using ethanol resulted in the extraction of 102,78 mg/100 g phenols, while using methanol yielded 100,45 mg/100 g (Garcia, Ontero, Arellano, 2020). In contrast, for *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, the total phenol content obtained by these authors was 81,83 mg/100 g with ethanol and 78,92 mg/100 g with methanol.

To evaluate our findings concerning the phenolic compounds present in representatives of the genus *Xylaria*, we made a comparison with the research conducted by (Liu et al., 2007). Their study focused on the antioxidant activity and phenolic content of an endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba* L. The authors reported phenol values ranging from 9,71 to 54,51 mg GAE/g of dry weight. They also found that methanol extraction yielded the highest phenolic values, while hexane extraction resulted in the lowest values. The results of  $18,36 \pm 0,4$  mg/g were obtained by other researchers, who used methanol to extract phenols from *Xylaria feejeensis* (Berk.) Fr. (Rebbapragada, & Kalyanaraman, 2016). However, it's worth noting that our extraction method and experimental approach for determining the total phenol content differed from the mentioned studies. Additionally, we investigated distinct species and strains, which could account for the variations in the obtained results.





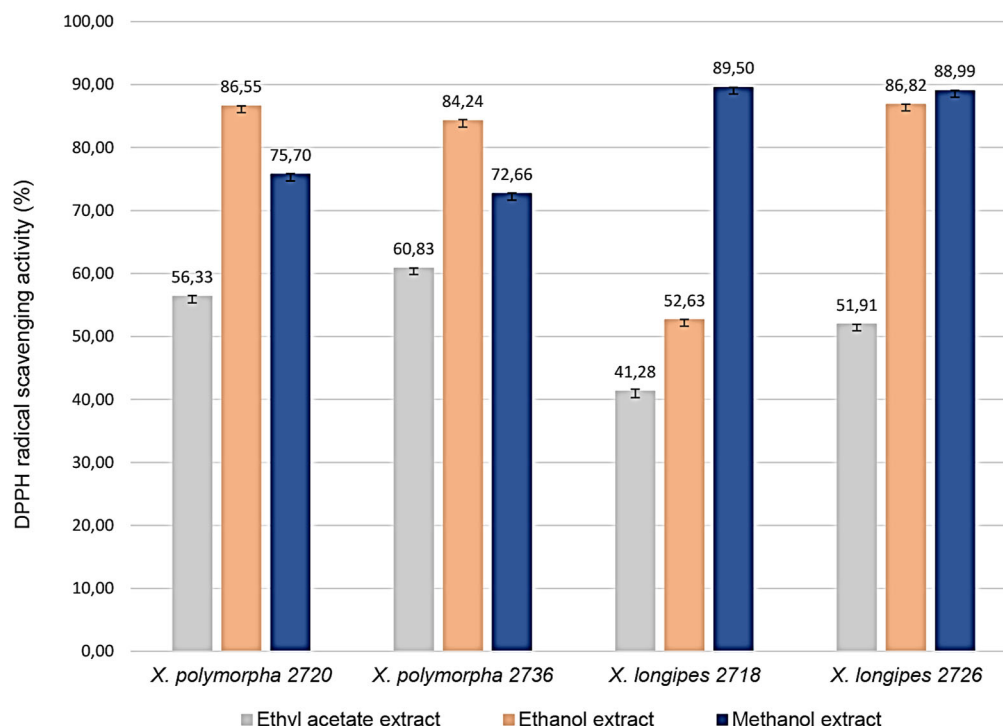
**Fig. 1. Total phenolic content of the extracts of biomass of *X. polymorpha* and *X. longipes* strains obtained with different solvents. The results are the mean of triplicate, expressed as mg GAE/g dry weight and error bars indicate standard deviation**

**Scavenging activity of DPPH radical.** Nowadays there is considerable progress in understanding and researching free radicals, especially reactive oxygen species (ROS), and the development of antioxidants. Different types of free radical scavengers, including natural, sem-synthetic, and synthetic, have received significant attention as a chain-breaking antioxidants that safeguard aerobic organisms from oxidative stress (Villaño et al., 2007). Polyphenolic compounds are of particular interest as free radical scavengers, because these antioxidants are effective in preventing lipid peroxidation due to the presence of a hydroxyl group, which enables them to donate hydrogen and provide a protective effect (Ali Al-Mamary, & Moussa, 2021). The DPPH method applied in this study is based on scavenging of a 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl through the addition of a radical species or antioxidant leading to the decolorization of DPPH solution. The extent of color change directly corresponds to the concentration and potency of the antioxidants. A significant decrease in the absorbance of the reaction mixture indicates that the tested compound has a strong free radical scavenging activity.

Figure 2 presents the scavenging activity of DPPH radicals for different extracts in our study. Methanol extracts of *X. longipes* strains, possessing high phenolic contents, exhibited strong DPPH radical scavenging activity. On the other hand, *X. polymorpha* strains showed higher activity in ethanol extracts, reaching  $84,24 \pm 0,07 \%$  and  $86,55 \pm 0,20 \%$  for strains IBK 2736 and IBK 2720, respectively. The lowest values were recorded for ethyl acetate extracts: from  $41,28 \pm 0,33$  to  $60,83 \pm 0,17 \%$  (Fig. 2).

The extracts derived from the investigated *X. polymorpha* and *X. longipes* strains demonstrated higher free radical-scavenging capacity when compared to numerous plants and fungi studied by the same method. For example, out of 36 studied plants, 22 ethanol extracts exhibited free radical-scavenging activity ranging from 12,8 % to 69,5 %, with only 3 extracts showing up to 80 % and higher (Kaur, & Kapoor, 2002). In the study conducted by (Liu et al., 2007) mentioned above, even though the extracts of the endophytic *Xylaria* sp. had a substantially higher phenol content, their antioxidant activity was notably lower compared to the results obtained in our research. The authors reported values of 66,29 % for the methanol extract and 29,66 % for the ethanol extract, which were lower than the values observed in our study for analogical solvents. The methanolic and ethyl acetate extracts of *X. feejeensis* HMJAU22039 demonstrated antioxidant activity of 73,86 % and 69,24 %, respectively (Rebbapragada, & Kalyanaraman, 2016), which are similar to our findings for *X. polymorpha* strains.

It is known that the antioxidant activity is well correlated with the content of phenolic compounds, so it was decided to determine the interconnection between the obtained values of phenolic compounds with the DPPH scavenging activity in obtained fungal extracts. For this purpose, the Pearson correlation coefficient was calculated for each organic solvent. The results revealed a highly significant negative correlation (Pearson coefficient -0,97) for methanol extracts, suggesting that phenolic compounds may play a crucial role in their antioxidant activity.



**Fig. 2. Free radical–scavenging capacity of the extracts of biomass of *X. polymorpha* and *X. longipes* strains obtained with different solvents, measured in DPPH assay.**

The results are the mean of triplicate and error bars indicate standard deviation

On the other hand, in the ethanol and ethyl acetate extracts, there was no significant correlation between free radical scavenging activity and total phenolic content, with correlation coefficients of 0,46 and 0,07, respectively. This lack of correlation could be attributed to the presence of other chemical components in these extracts, such as sugars or ascorbic acid. The presence of compounds with a high hydrogen–donating capacity to scavenge DPPH radicals might influence the antioxidant capacity independently of phenolic content (Saeed, Khan, & Shabbir, 2012).

Moreover, it is important to note that the Folin–Ciocalteu method may yield different responses depending on the specific phenolic compounds present, as different phenols can have distinct reactions in this method. This implies a possible variation in the antioxidant response of phenolic compounds based on their chemical structures. Nevertheless, these techniques allow us to assess and compare the potential of fungal species and strains and select the most productive strains for further detailed analyses.

#### Discussion and conclusions

The current study provided useful and efficient quantitative analysis of total phenol contents in *X. polymorpha* and *X. longipes* strains from the IBK Mushroom Culture Collection under submerged liquid cultivation conditions. The results demonstrated that depending on the solvent for the biomass extraction, different yields of phenolic compounds were recovered. From each studied strain the highest amount of phenols was yielded using methanol, proving it is an optimal solvent for their extraction compared to ethanol and ethyl acetate. Moreover, methanol extracts were more effective in antioxidant capacity, and the correlation analysis supported the connection between these properties and the phenolic content present in them. Having revealed a high antioxidant potential in the studied fungal strains, further detailed study

of the chemical characteristics of their antioxidant components remains relevant.

**Authors' contribution:** Alisa Atamanchuk – conceptualization, methodology, data validation, formal analysis, writing – original draft preparation; Nina Bisko – conceptualization, writing – review and editing, supervision.

**Acknowledgments, sources of funding.** The authors would like to acknowledge K. O. Romanenko, PhD (Department of Phytohormonology, M.G. Kholodny Institute of Botany) for essential technical support and access to the laboratory equipment.

#### References

- Adeboya, M., Edwards, R. L., Laessoe, T., Maitland, D. J., & Whalley, A. S. J. (2010). Cheminform abstract: metabolites of the higher fungi. Part 28. Globoscinic acid and globoscin, a labile acid-lactone system from *Xylaria globosa* and *Xylaria obovata*. *ChemInform*, 26(51), 2067–2072. <https://doi.org/10.1002/chin.199551281>
- Ali Al-Mamary, M., & Moussa, Z. (2021). Antioxidant activity: the presence and impact of hydroxyl groups in small molecules of natural and synthetic origin. *Antioxidants – Benefits, Sources, Mechanisms of Action*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.95616>
- Atamanchuk, A. R. & Bisko, N. A. (2022). Cultural and morphological characteristics of wood-inhabiting *Xylaria* species from Ukraine. *Plant & Fungal Research*, 5(2), 11–19. <https://doi.org/10.30546/2664–5297.2022.2.11>
- Atamanchuk, A. R. (2023). Antioxidant activity of biomass extracts of *Xylaria longipes* Nitschke strains under submerged conditions. In S. Kostyk, D. Kolyshcheva, O. Syroid, & D. Farfolameieva (Eds.), *Biotechnology of the 21st century: materials of the 17th International scientific and practical conference: 19 May 2023. Industrial, food, agricultural and medical biotechnology* (pp. 32–34). Igor Sikorsky KPI. <https://conf.biotech.kpi.ua/issue/view/16697>
- Bisko, N. A., Lomberg, M. L., Mykchaylova, O. B., & Mytropolska, N. Yu. (2022). IBK Mushroom Culture Collection. Version 1.5. The IBK Mushroom Culture Collection of the M.G. Kholodny Institute of Botany. Occurrence dataset. <https://doi.org/10.15468/dzdsqu> accessed via GBIF.org on 2023–07–27
- Chen, R., Tang, J.-W., Li, X.-R., Liu, M., Ding, W.-P., Zhou, Y.-F., Wang, W.-G., Du, X., Sun, H.-D., & Puno, P.-T. (2018). Secondary metabolites from the endophytic fungus *Xylaria* sp. hg1009. *Natural Products and Bioprospecting*, 8(2), 121–129. <https://doi.org/10.1007/s13659-018-0158-x>



Cheung, L.M., Cheung, P. C. K., & Ooi, V. E. C. (2003). Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry*, 81(2), 249–255. [https://doi.org/10.1016/s0308-8146\(02\)00419-3](https://doi.org/10.1016/s0308-8146(02)00419-3)

Elfahri, K. R., Vasiljevic, T., Yeager, T., & Donkor, O. N. (2016). Anticancer and antioxidant activities of bovine skim milk fermented by selected *Lactobacillus helveticus* strains. *Journal of Dairy Science*, 99(1), 31–40. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10160>

Garcia, I. M., S. A. R., Montero, D., & Arellano, M. (2020). Evaluation of total polyphenols and antioxidant capacity in mushroom extracts *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes*. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 12(2), 96–99. <https://doi.org/10.22159/ijcpr.2020v12i2.37499>

Guo, Y.-J., Deng, G.-F., Xu, X.-R., Wu, S., Li, S., Xia, E.-Q., Li, F., Chen, F., Ling, W.-H., & Li, H.-B. (2012). Antioxidant capacities, phenolic compounds and polysaccharide contents of 49 edible macro-fungi. *Food & Function*, 3(11), 1195–1205. <https://doi.org/10.1039/c2fo30110e>

Kaur, C., & Kapoor, H. C. (2002). Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*, 37(2), 153–161. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00552.x>

Lee, I.-K., Jang, Y.-W., Kim, Y.-S., Yu, S. H., Lee, K. J., Park, S.-M., Oh, B.-T., Chae, J.-C., & Yun, B.-S. (2009). ChemInform Abstract: Xylarinols A and B, Two New 2-Benzoxepin Derivatives from the Fruiting Bodies of *Xylaria polymorpha*. *ChemInform*, 40(33), 163. <https://doi.org/10.1002/chin.200933215>

Lee, I.-K., Kim, Y.-S., Jang, Y.-W., Jung, J.-Y., & Yun, B.-S. (2008). ChemInformabstract: new antioxidant polyphenols from the medicinal mushroom *Inonotus obliquus*. *ChemInform*, 39(15). <https://doi.org/10.1002/chin.200815206>

Liu, X., Dong, M., Chen, X., Jiang, M., Lv, X., & Yan, G. (2007). Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba*. *Food Chemistry*, 105(2), 548–554. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.008>

Mathew, S., Abraham, T. E., & Zakaria, Z. A. (2015). Reactivity of phenolic compounds towards free radicals under in vitro conditions. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 5790–5798. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1704-0>

Mustafin, K., Bisko, N., Blieva, R., Al-Maali, G., Krupodorova, T., Narmuratova, Z., Saduyeva, Z., & Zhakipbekova, A. (2022). Antioxidant and antimicrobial potential of *Ganoderma lucidum* and *Trametes versicolor*. *Turkish Journal of Biochemistry*, 47(4), 483–489. <https://doi.org/10.1515/tjb-2021-0141>

Proestos, C., Boziaris, I. S., Nychas, G.-J. E., & Komaitis, M. (2006). Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 95(4), 664–671. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.049>

Rebbapragada, D. P., & Kalyanaraman, R. (2016). Evaluation and optimization of antioxidant potentiality of *Xylaria feejeensis* HMJAU22039. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(2), 269–273. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2016.v9s2.13734>

Saeed, N., Khan, M. R., & Shabbir, M. (2012). Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-221>

Song, F., Wu, S.-H., Zhai, Y.-Z., Xuan, Q.-C., & Wang, T. (2014). ChemInformabstract: secondary metabolites from the genus *Xylaria* and their bioactivities. *ChemInform*, 45(30), 673–694. <https://doi.org/10.1002/chin.201430235>

Schneider, G., Anke, H., & Sterner, O. (1996). Xylaramide, a new antifungal compound, and other secondary metabolites from *Xylaria longipes*. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 51(11-12), 802–806. <https://doi.org/10.1515/znc-1996-11-1206>

Villano, D., Fernández-Pachón, M. S., Moyá, M. L., Troncoso, A. M., & García-Parrilla, M. C. (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71(1), 230–235. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.03.050>

Отримано редакцією журналу / Received: 28.08.23  
Прорецензовано / Revised: 28.08.23  
Схвалено до друку / Accepted: 29.09.23

Аліса АТАМАНЧУК, асп.  
ORCID ID: 0000-0001-7701-7466  
e-mail: atamalyssa@gmail.com

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного Національної академії наук України, Київ, Україна

Ніна БІСЬКО, д-р біол. наук, проф., пров. наук. співроб.  
ORCID ID: 0000-0003-1894-0896  
e-mail: bisko\_nina@ukr.net

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного Національної академії наук України, Київ, Україна

## ВПЛИВ РОЗЧИННИКІВ ДЛЯ ЕКСТРАКЦІЇ НА ВМІСТ ФЕНОЛІВ ТА АНТИОКСИДАНТНУ ЗДАТНІСТЬ БІОМАСИ ШТАМІВ *XYLARIA POLYMORPHA* ТА *XYLARIA LONGIPES*

**Вступ.** Гриби роду *Xylaria* є відомими продуцентами широкого спектра вторинних метаболітів, включаючи поліфенольні сполуки з антиоксидантними властивостями. Дослідження актуальні, оскільки зосереджені на одержанні фенольних сполук із грибів та рослин, зважаючи на важливі захисні функції антиоксидантів проти окиснювального стресу. Мета роботи – оцінити і порівняти загальний вміст фенолів та антиоксидантну активність у біомасі різних штамів двох поширених в Україні представників роду *Xylaria* – *Xylaria polymorpha* та *Xylaria longipes*, використовуючи різні розчинники для екстракції.

**Методи.** Вегетативний міцелій досліджуваних штамів культивували за глибинних умов та екстрагували етанолом, метанолом та етилацетатом. Загальний вміст фенольних сполук у екстрактах визначали за методом Фоліна-Чокальтеу з використанням галлової кислоти як стандарту. Антиоксидантну активність оцінювали за допомогою спектрофотометричного аналізу поглинання вільних радикалів DPPH (2,2-діфеніл-1-пікрилгідразилу). Кореляцію між загальним вмістом фенолів та антиоксидантною активністю екстрактів оцінювали за допомогою коефіцієнта кореляції Пірсона для кожного органічного розчинника.

**Результати.** Під час екстракції біомаси метанолом було зафіксовано найвищий вміст фенольних сполук серед усіх штамів, із максимальним значенням  $21,64 \pm 0,03$  мг еквівалента галлової кислоти/г сухої ваги (мг ГКЕ/г) для штаму *X. polymorpha* IBK 2736. Використання етилацетату призвело до значно нижчого виходу фенольних сполук із біомаси цього ж штаму –  $0,68 \pm 0,14$  мг ГКЕ/г, а також усіх інших штамів у проведеному дослідженні. Аналогічно, значно вищі показники антиоксидантної активності спостерігались під час екстракції біомаси метанолом, найнижчі – етилацетатом. Найвища антиоксидантна активність була виявлена в метанольному екстракті *X. longipes* IBK 2726 –  $88,99 \pm 0,07$  %, тоді як найнижча була зафіксована в етилацетатному екстракті *X. longipes* IBK 2718, зі значенням  $41,28 \pm 0,33$  %.

**Висновки.** Вибір розчинника істотно вплинув на кількість екстрагованих фенольних сполук. Метанол виявився найбільш ефективним для екстракції фенолів із біомаси досліджуваних штамів видів *Xylaria* порівняно з етанолом та етилацетатом. Метанольні екстракти також проявили високу антиоксидантну активність, кореляційний аналіз підтвердив зв'язок між антиоксидантною здатністю та вмістом фенольних сполук. Усі досліджені штами проявили значний антиоксидантний потенціал, що вказує на важливість подальших досліджень хімічних характеристик їхніх антиоксидантних компонентів.

**Ключові слова:** фенольні сполуки, антиоксидантна активність, *Xylaria*, Ascomycota, глибинне культивування, біомаса.

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів. Спонсори не брали участі в розробленні дослідження; у зборі, аналізі чи інтерпретації даних; у написанні рукопису; в рішенні про публікацію результатів.

The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; in the decision to publish the results.

УДК 616.72-002: 616-002.2  
DOI: 10.17721/1728.2748.2023.94.10-14

Сергій БОРОДІН, асп.  
ORCID ID: 0000-0002-7146-6874  
e-mail: borodindoc@gmail.com  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

Алевтина ЮЕТ, канд. біол. наук  
ORCID ID: 0000-0002-6511-2201  
e-mail: alevtina.dranitsina@gmail.com  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

Катерина ДВОРЩЕНКО, д-р біол. наук  
ORCID ID: 0000-0003-3118-9355  
e-mail: katernyna.dvorshchenko@knu.ua  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

## ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ *PTGS2* ТА *NOS2* У СИНОВІАЛЬНІЙ РІДИНІ ХВОРИХ НА ОСТЕОАРТРИТ ПІСЛЯ SARS-CoV2-ІНФЕКЦІЇ

**Вступ.** Поява нового коронавірусу *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2* (SARS-CoV-2) створила серйозну глобальну загрозу здоров'ю людей різних країн. Коронавірусна хвороба 2019 р. (*Coronavirus disease 2019, COVID-19*) спричинила розвиток багатьох ускладнень у населення більшості країн світу. Багато людей відчули на собі неприємні наслідки коронавірусної інфекції. Серед них особливу групу становлять хворі на хронічні захворювання, зокрема остеоартрити. Розвиток запалення та інтенсифікація вільнорадикальних процесів є провідною ланкою у патогенезі остеоартритів. Запальні та дегенеративні процеси, що розвиваються при остеоартриті, викликають модифікацію молекулярного та клітинного складу синовіальної рідини. Мета роботи – визначити експресію генів *PTGS2* (*Prostaglandin-endoperoxide synthase 2*) та *NOS2* (*Nitric Oxide Synthase 2*) у клітинах синовіальної рідини хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції.

**Методи.** Усі учасники дослідження були поділені на дві групи: 1-ша група ( $n = 22$ ) – пацієнти з остеоартритом колінних суглобів II–III ступеня; 2-га група ( $n = 14$ ) – пацієнти з остеоартритом колінних суглобів II–III ступеня, які перенесли легку та середньотяжку форму COVID-19 6–9 міс. тому. У ядерних клітинах синовіальної рідини визначали експресію генів *PTGS2* та *NOS2*. РНК отримували за методом *Chomczynski*. Синтез кДНК і кількісну полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі (*Real-time PCR*, кПЛР) за допомогою комерційного набору "Thermo Scientific Verso SYBR Green 1-Step qRT-PCR ROX Mix" ("Thermo Scientific", Литва). Обробку результатів дослідження проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики.

**Результати.** У хворих на остеоартрит колінних суглобів після SARS-CoV2-інфекції, у ядерних клітинах синовіальної рідини збільшується експресія генів *PTGS2* та *NOS2* порівняно з пацієнтами, у яких діагностовано остеоартрит.

**Висновки.** Отримані результати свідчать, що у хворих на остеоартрит після інфікування COVID-19 можливий розвиток більш тяжкого перебігу синовіального запалення.

**Ключові слова:** SARS-CoV-2, остеоартрит, синовіальна рідина, запалення, експресія генів *NOS2*, *PTGS2*.

### Вступ

Починаючи з 2002 року, було зареєстровано три великі спалахи зоонозного вірусу – коронавірусу, який, як відомо, викликає респіраторні захворювання. Захворюваність на SARS-CoV (*Severe Acute Respiratory Syndrome-coronavirus*, коронавірус тяжкого гострого респіраторного синдрому) у 2002 і 2003 рр. і MERS-CoV (*Middle East Respiratory Syndrome-coronavirus*, коронавірус Близькосхідного респіраторного синдрому) у 2012 р. продемонструвала можливість передачі нових коронавірусів від тварини до людини та від людини до людини. У грудні 2019 року було повідомлено про новий коронавірус (nCoV) під назвою "SARS-CoV-2" (*Severe Acute Respiratory Syndrome-related coronavirus 2*), який Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) оголосила відповідальним за спалах пандемії коронавірусної хвороби 2019 року (*Coronavirus disease 2019, COVID-19*). Таким чином, за останні кілька десятиліть коронавірус за рахунок мутацій та адаптації подолав міжвидовий бар'єр, що призвело до його поширення серед людей. Отже, поява нового коронавірусу створила серйозну глобальну загрозу здоров'ю населення в усіх країнах світу (Gupta et al., 2022; Mohamadian et al., 2021).

Нещодавній спалах COVID-19 у Китаї, який почався у місті Ухань, провінція Хубей, спричинив зараження близько 771 млн осіб і забрав майже 7 млн життів у всьому світі (World Health Organization, 2023). Дослідники

повідомили, що вірус постійно розвивається та поширюється через безсимптомних носіїв, що свідчить про високу глобальну загрозу здоров'ю популяції людей.

SARS-CoV-2 вражає епітеліальні клітини дихальної системи людини. Це призводить до розвитку таких клінічних симптомів, як респіраторні: сухий кашель, задишка, втрата або порушення смаку та запаху, а також системні симптоми: лихоманка, головний біль, підвищена втомлюваність та інші ознаки. Подальший розвиток коронавірусної хвороби може призвести до тяжких ускладнень: пневмонії, гострого респіраторного дистрес-синдрому та сепсису. Крім респіраторних та системних симптомів, у пацієнтів можуть розвиватися ураження опорно-рухового апарату, що симптоматично буде проявлятися болями в м'язах і суглобах, набряканням та зменшенням рухливості суглобів. У таких пацієнтів перебіг захворювання стає більш тяжким та ускладненим (Campos et al., 2022; Farisogullari, Pinto, & Machado, 2022; Ono et al., 2020; Yüce, Filiztekin, & Özkaya, 2021).

Недостатньо вивченим залишається питання причинно-наслідкових зв'язків між вірусом SARS-CoV-2 та ураженням опорно-рухової системи організму людини. Цей новий потенційний зв'язок потребує детального дослідження. Завдяки сучасним молекулярно-генетичним методам стало можливим вивчення молекулярних механізмів захворювань, що є одним із ключових завдань сучасних біомедичних досліджень. У роботі було

досліджено взаємозв'язок між розвитком коронавірусної хвороби у пацієнтів з остеоартритом та експресією генів, пов'язаних із запаленням та окисним стресом. У роботі проведено дослідження експресії генів *PTGS2* (Prostaglandin-endoperoxide synthase 2) та *NOS2* (Nitric Oxide Synthase 2) у клітинах синовіальної рідини хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції.

Синовіальна рідина є фізіологічною рідиною суглоба, вона має гелеподібну структуру та заповнює суглобову щілину. Для суглобового хряща синовіальна рідина виконує ряд важливих функцій: змащування суглоба, джерело поживних речовин та захист суглоба від ушкоджуючих агентів. Окрім того синовіальна рідина опосередковує молекулярну комунікацію за допомогою розчинних факторів між різними популяціями клітин у суглобі. Синовіальна рідина складається з ультрафільтрату плазми крові, який дифундує в суглобову щілину з субінтимальної судинної мережі, а також гіалуронової кислоти та лубрицину, що виділяються синовіоцитами типу В, які походять із фібробластів. Гіалуронова кислота підтримує в'язкість синовіальної рідини та запобігає втраті рідини з суглобової порожнини. Лубрицин наявний на поверхні суглобового хряща і необхідний для змащування суглобів і підтримки їхнього здорового стану. Ядерні клітини, які часто виявляються в синовіальній рідині, включають нейтрофіли, лімфоцити, моноцити та макрофаги (Gupta et al., 2019; Oliviero, & Mandell, 2023). Зміни об'єму та вмісту компонентів синовіальної рідини відбуваються у відповідь на травму, запалення та проникнення бактерій, грибків або вірусів. Коли пацієнти звертаються з гострим болем у суглобах із підозрою на інфекцію, запалення або незапальні причини випоту, аспірація та аналіз синовіальної рідини є обов'язковими, щоб допомогти в діагностиці та виборі безпосереднього методу лікування.

Запальні та дегенеративні процеси, що розвиваються при остеоартриті, викликають модифікацію молекулярного та клітинного складу синовіальної рідини. За таких умов вона стає менш в'язкою і втрачає свої унікальні в'язкопружні властивості через зменшення молекулярної маси та концентрації гіалуронової кислоти, зміни в профілях ферментів і появи прозапальних елементів (цитокінів, лейкоцитів тощо). Зокрема, при остеоартриті у синовіальній рідині підвищується вміст медіаторів запалення (простагландин Е2, лейкотрієн В4), цитокінів (інтерлейкін (ІЛ)-1 $\beta$ , ІЛ-6, фактор некрозу пухлин  $\alpha$ ), оксиду азоту (NO) та активних форм кисню (АФК), які вивільняються з хондроцитів, синовіоцитів і лейкоцитів, що сприяє деградації суглобового хряща (Linehan et al., 2022; Liu, Xiao, & Li, 2023). Також надзвичайно важливий підрахунок загальної кількості ядерних клітин у синовіальній рідині для розділення запальних і незапальних артропатій і диференціювання різних причин запального артрити. Зокрема, запальні та септичні синовіальні рідини характеризуються збільшенням кількості лейкоцитів (Girón, & Torre, 2020). Отже, артроцентез і дослідження синовіальної рідини є важливим діагностичним параметром, який може підтвердити наявність артрити, охарактеризувати реакцію як запальний або незапальний і, за деяких обставин, виявити етіологічний агент.

Для розуміння молекулярних механізмів розвитку остеоартритів ми проаналізували та порівняли отримані дані експресії генів *PTGS2* (циклооксигеназа 2) та *NOS2* (індуцибельна NO-синтаза) у клітинах синовіальної рідини пацієнтів, які страждають на остеоартрит, та хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції. *PTGS2* кодує простагландин-ендопероксидсинтазу 2 (PTGS2), також відому як циклооксигеназу 2 (cyclooxygenase-2,

COX2), яка є основним ферментом у біосинтезі простагландинів і бере участь у розвитку запалення. За фізіологічних умов циклооксигеназа 2 у більшості тканин та рідин організму не виявляється, але її рівень істотно збільшується на тлі розвитку запалення. Цей фермент є мішенню дії нестероїдних протизапальних препаратів, які використовують як консервативну терапію запальних захворювань суглобів (Ferrer et al., 2019; Su et al., 2022). *NOS2* кодує індукцибельну синтазу оксиду азоту (iNOS), що є одним із ферментів, який бере участь у синтезі оксиду азоту (NO), і відіграє роль в опосередкуванні клітинної проліферації, апоптозу, окисного стресу та запалення. Накопичені дані свідчать про те, що NO вважається одним із головних медіаторів запалення при остеоартриті та викликає багато патологічних змін під час його розвитку та прогресування. Надмірне вироблення NO в хондроцитах сприяє руйнуванню хряща та пошкодженню клітин. Синтез NO в хондроцитах каталізується індукцибельною синтазою оксиду азоту, тому цей показник є важливим параметром оцінювання вільнорадикальних і запальних процесів у хрящі, а також привабливою терапевтичною мішенню для лікування остеоартритів (Ahmad, Ansari, & Haqqi, 2020; Ostojic et al., 2021).

**Метою** роботи було визначити експресію генів *PTGS2* та *NOS2* у клітинах синовіальної рідини хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції.

#### Методи

У дослідженні брали участь 36 пацієнтів у віці від 39 до 70 років, які перебували на стаціонарному або амбулаторному лікуванні в ортопедичному спеціалізованому медичному центрі "Ортоклініка" (Тернопіль, Україна) з приводу остеоартрити. Пацієнтам був встановлений діагноз "остеоартрит колінних суглобів II–III ступеня" на підставі клінічних та рентгенологічних критеріїв. На етапі відбору всім хворим проводилася рентгенографія колінних суглобів у прямій (передньозадній) та боковій проєкціях. Оцінювання інтенсивності болю та функціонального стану колінних суглобів хворих проводилася за допомогою обчислення індексу WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index), який визначають у результаті самостійного проходження пацієнтом тесту, який містить 24 запитання, що відображають вираженість больових відчуттів (5 запитань), скутості (2 запитання) та функціональної активності (17 запитань) (McConnell, Kolopack, & Davis, 2001).

Усі учасники дослідження надалі були поділені на дві групи. Перша група ( $n = 22$ ) – пацієнти з остеоартритом колінних суглобів II–III ступеня. В обстежуваній групі включали можливу супутню наявність коронавірусної інфекції шляхом проведення епідеміологічного анамнезу кожного пацієнта та відсутності їхнього контакту з хворими на COVID-19. Друга група ( $n = 14$ ) – пацієнти з остеоартритом колінних суглобів II–III ступеня, які перенесли легку та середньотяжку форму COVID-19 6–9 міс. тому. Діагноз COVID-19 був підтверджений молекулярним аналізом (RT-PCR) мазка з носоглотки. Усі учасники, що добровільно погодились взяти участь у цьому дослідженні, ознайомилися та підписали відповідну форму інформованої згоди. Дослідження виконані з дотриманням основних положень "Правил етичних принципів проведення наукових медичних досліджень за участю людини", затверджених Гельсінською декларацією (1964–2013 pp.), ICH GCP (1996 p.), Директиви ЄЕС № 609 (від 24.11.1986 p.), наказів МОЗ України № 690 від 23.09.2009 p., № 944 від 14.12.2009 p., № 616 від 03.08.2012 p. та схвалені Комітетом з етики медичного



центру "Ортоклініка" (Тернопіль, Україна). Вжиті всі заходи для забезпечення анонімності пацієнтів.

Забір біологічного матеріалу проводився на базі спеціалізованого медичного центру "Ортоклініка", місто Тернопіль, Україна. Синовіальну рідину збирали в стерильні пробірки з гепарином шляхом артроцентезу колінного суглоба відповідно до стандартних протоколів обробки. Зважаючи на те, що найбільші порожнини колінного та кульшового суглобів мають максимальний об'єм синовіальної рідини до 3,5 мл, забір біологічного матеріалу в умовно здорових людей небезпечно і може призвести до порушення структурно-функціонального стану суглоба. У зв'язку із цим у наших дослідженнях група умовно здорових людей відсутня.

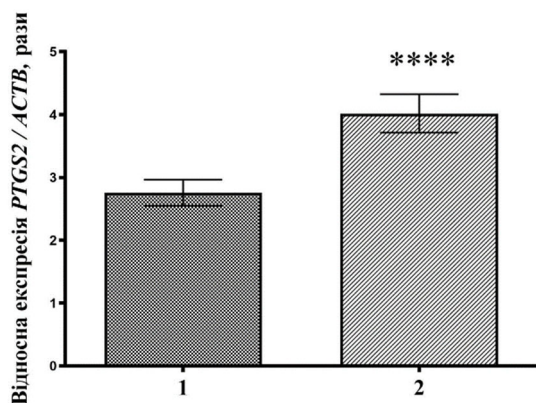
У клітинах синовіальної рідини визначали експресію генів *PTGS2* та *NOS2*. РНК отримували за методом Хомчинського (Chomczynski, & Sacchi, 1987) із синовіальної рідини, використовуючи наявні в ній лейкоцити і мультипотентні стромальні клітини синовіальної мембрани (Sanjurjo-Rodriguez et al., 2020; Walters et al., 2021). Синтез кДНК та кількісну полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі (Real-time PCR, кПЛР) здійснювали за допомогою комерційного набору "Thermo Scientific Verso SYBR Green 1-Step qRT-PCR ROX Mix" ("Thermo Scientific", Литва), використовуючи по 0,3 мкмоль/л кожного праймера. Експеримент проводили за таких рекомендованих фірмою-виробником температурних умов: синтез кДНК 50 °C – 30 хв; ініціююча денатурація 95 °C – 15 хв; далі 40 циклів: денатурація ДНК 95 °C – 15 с; гібридизація праймерів 50 °C – 35 с; добування ланцюга 72 °C – 30 с.; елонгація ампліфікатів 72 °C – 5 хв.

У реакціях було використано такі послідовності праймерів: для *PTGS2* – прямий – CAAATTGCTGGCAGGGTTGCT і зворотний – GCTTCAGCATAAAGCGTTTGC; для *NOS2* – прямий – CGTGCAAACCTTCAAGGCAG і зворотний – CTGAGGTCCAAAGGCTGTGA; для *ACTB* (ген β-актину, що використовується як внутрішній контроль реакції завдяки конститутивній експресії): прямий – CTTCCAGCTCCTCCCTGGAG і зворотний – CCACAGGACTCCATGCCCGAG. Відтворюваність результатів ампліфікації було перевірено в паралельних експериментах шляхом повторення кПЛР на зразках РНК усіх добровольців, із кожним праймером не менше трьох разів. Відносну кількість мРНК визначали порівняльним  $\Delta\Delta C_t$  методом (Livak, & Schmittgen, 2001), ефективність ПЛР була однаковою ( $E_x = (10^{-1/\text{slope}}) - 1$ ), де slope – коефіцієнт нахилу, який становив 3,8, а ефективність кПЛР дорівнювала 83 %. Відносний рівень експресії зазначених генів нормалізували до рівня експресії *ACTB*.

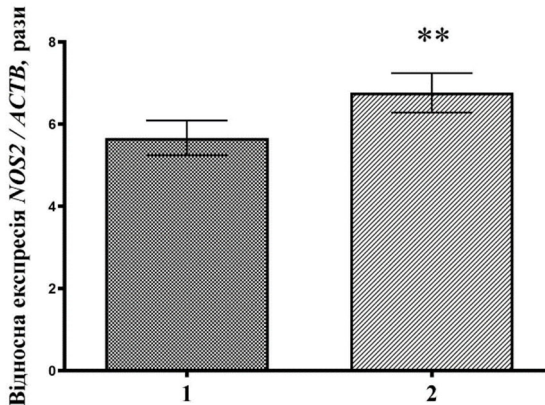
Отримані дані тестували на нормальне розподілення за допомогою тесту Шапіро-Вілкі з використанням програмного пакета "GraphPad Prism 8.4.3" ("GraphPad Software Inc.", США). Подальше обчислення відбувалося за допомогою непарного параметричного  $t$  тесту. Отримані результати наведено у вигляді середнього арифметичного  $\pm$  стандартне відхилення – SD. Результати вважали значущими, коли  $p \leq 0,05$ .

#### Результати

У ході проведених експериментальних досліджень встановлено, що у хворих на остеоартрит, які перехворіли COVID-19, рівень експресії гена *PTGS2* у клітинах синовіальної рідини збільшувався в 1,4 раза ( $p \leq 0,0001$ ) порівняно з групою хворих на остеоартрит (рис. 1, а).



а)



б)

Рис. 1. Рівень експресії генів *PTGS2* (а) та *NOS2* (б) у клітинах синовіальної оболонки хворих на остеоартрит: 1 – остеоартрит; 2 – остеоартрит + COVID-19; \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\*\* $p \leq 0,0001$  щодо групи людей з остеоартритом

Виявлено, що у клітинах синовіальної рідини суглобів пацієнтів з остеоартритом, які перенесли легку та середньотяжку форму COVID-19, рівень експресії гена *NOS2* збільшувався в 1,2 раза ( $p \leq 0,01$ ) порівняно з групою хворих на остеоартрит (рис. 1, б).

У ході проведених експериментальних досліджень показано, що в групі пацієнтів, хворих на остеоартрит після перенесеної коронавірусної інфекції, у ядерних клітинах синовіальної рідини зростає експресія генів, що відповідають за розвиток запальних та вільнорадикальних процесів порівняно з цими показниками у синовіальній рідині суглобів пацієнтів з остеоартритом. Виявлене збільшення рівня експресії гена *PTGS2* у клітинах синовіальної рідини вказує на активацію біосинтезу проста-

гландинів, які беруть участь у розвитку запалення. Експресія *PTGS2*, який кодує циклооксигеназу 2 (ЦОГ-2), може бути індукована за допомогою різноманітних прозапальних стимулів. ЦОГ-2 каталізує перетворення арахідонової кислоти на простагландин H2, який є лімітуючою стадією утворення простагландинів і тромбосану A2. ЦОГ-2 є потужним медіатором запалення і бере участь у передачі сигналів простаноїдів. Зокрема, для лікування остеоартритів та ревматоїдного артриту використовують селективні інгібітори ЦОГ-2, які більш ефективні, ніж стандартні дози неселективних нестероїдних протизапальних засобів (Ferrer et al., 2019; Nakata et al., 2018). Отримані результати зростання рівня експресії гена *NOS2* свідчать про порушення окисно-

антиоксидантної рівноваги в бік інтенсифікації вільнорадикальних процесів та розвитку окисного стресу безпосередньо в самому суглобі. Це підтверджується отриманими нами раніше результатами стосовно накопичення активних форм кисню та збільшення концентрації продуктів окиснення ліпідів і білків у синовіальній рідині (Бородин, 2022; Бородин, & Дворщенко, 2023; Borodin, 2022).

#### Дискусія і висновки

У хворих на остеоартрит колінних суглобів після SARS-CoV2-інфекції в ядерних клітинах синовіальної рідини збільшується експресія генів *PTGS2* та *NOS2* порівняно з пацієнтами з остеоартритом, що не хворіли на COVID-19. Це свідчить про розвиток більш сильного запалення в суглобах пацієнтів з остеоартритом після інфікування SARS-CoV-2. Група пацієнтів, що мають хронічні хвороби, потребують особливого контролю за перебігом остеоартриту та персоналізованого лікування після перенесеної коронавірусної хвороби.

**Внесок авторів:** Сергій Бородин – пошук та опрацювання фахової літератури за темою дослідження, аналіз сучасного стану проблеми, участь у проведенні експериментів, теоретичне обґрунтування результатів дослідження; Алевтина Юет – участь у проведенні експериментів, статистична обробка результатів дослідження; Катерина Дворщенко – формування ідеї та мети роботи, постановка завдань, моделювання експерименту, планування методичних підходів, узагальнення результатів дослідження.

**Подяки, джерела фінансування.** Робота виконана на кафедрі біохімії Навчально-наукового центру "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка у рамках науково-дослідної теми "Патології суглобів різного генезу в постковідний період" (№ д/р 0122U001909, 2022–2024 рр.).

#### Список використаних джерел

- Borodin, S., & Dvorshchenko, K. (2023). Окисна модифікація білків у синовіальній рідині хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія "Біологія"*, 93(2), 12–16.
- Borodin, S., Korotkiy, O., Yuet, A., & Dvorshchenko, K. (2022). Перекисне окиснення ліпідів у синовіальній рідині хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія "Біологія"*, 3(90), 10–14.
- Ahmad, N., Ansari, M.Y., & Haqqi, T.M. (2020). Role of iNOS in osteoarthritis: Pathological and therapeutic aspects. *J Cell Physiol.*, 235(10), 6366–6376. <https://doi.org/10.1002/jcp.29607>
- Borodin, S., Ostapchenko, D., Korotkiy, O., & Dvorshchenko, K. (2022). Indicators of the oxidant-antioxidant system in the synovial fluid of patients with osteoarthritis after SARS-CoV2 infection. *Bulletin of problems biology and medicine*, 4(167), 125–130.
- Campos, M.C., Nery, T., Starke, A.C., de Bem Alves A.C., Speck A.E., & Aguiar A.S. (2022). Post-viral fatigue in COVID-19: A review of symptom assessment methods, mental, cognitive, and physical impairment. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, 142, 104902. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2022.104902>
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162(1), 156–159. <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>
- Farisogullari, B., Pinto, A.S., & Machado, P.M. (2022). COVID-19-associated arthritis: an emerging new entity? *RMD Open*, 8(2), e002026. <https://doi.org/10.1136/rmdopen-2021-002026>
- Ferrer, M.D., Busquets-Cortés, C., Capó, X., Tejada, S., Tur, J.A., Pons, A., & Sureda, A. (2019). Cyclooxygenase-2 Inhibitors as a Therapeutic Target in Inflammatory Diseases. *Curr Med Chem.*, 26(18), 3225–3241. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180514112124>
- Girón, M., R., & Torre, M., S. (2020). Synovial fluid cytodiagnosis. *Rev Esp Patol.*, 53(2), 100–112. <https://doi.org/10.1016/j.patol.2019.01.004>
- Gupta, K., Kaur, G., Pathak, T., & Banerjee, I. (2022). Systematic review and meta-analysis of human genetic variants contributing to COVID-19 susceptibility and severity. *Gene*, 844, 146790. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146790>
- Gupta, R., C., Lall, R., Srivastava, A., & Sinha, A. (2019). Hyaluronic Acid: Molecular Mechanisms and Therapeutic Trajectory. *Front Vet Sci.*, 25(6), 192. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00192>
- Lineham, B., Altaie, A., Harwood, P., McGonagle, D., Pandit, H., & Jones, E. (2022). A systematic review on the potential value of synovial fluid

biomarkers to predict clinical outcomes in cartilage repair treatments. *Osteoarthritis Cartilage*, 30(8), 1035–1049. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2022.05.007>

Liu, D., Xiao, W.F., & Li, Y.S. (2023). The Diagnostic and Prognostic Value of Synovial Fluid Analysis in Joint Diseases. *Methods Mol. Biol.*, 2695, 295–308. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3346-5\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3346-5_20)

Livak, K., & Schmittgen, T. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

McConnell, S., Kolopack, P., & Davis, A.M. (2001). The Western Ontario and McMaster universities osteoarthritis index (WOMAC): a review of its utility and measurement properties. *Arthritis Care Res.*, 45(5), 453–461. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200110\)45:5<453::aid-art365>3.0.co;2-w](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200110)45:5<453::aid-art365>3.0.co;2-w)

Mohamadian, M., Chiti, H., Shoghli, A., Biglari, S., Parsamanesh, N., & Esmailzadeh, A. (2021). COVID-19: Virology, biology and novel laboratory diagnosis. *J. Gene Med.*, 23(2), e3303. <https://doi.org/10.1002/jgm.3303>

Nakata, K., Hanai, T., Take, Y., Osada, T., Tsuchiya, T., Shima, D., & Fujimoto, Y. (2018). Disease-modifying effects of COX-2 selective inhibitors and non-selective NSAIDs in osteoarthritis: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage*, 26(10), 1263–1273. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2018.05.021>

Oliviero, F., & Mandell, B., F. (2023). Synovial fluid analysis: Relevance for daily clinical practice. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 8, 101848. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2023.101848>

Ono, K., Kishimoto, M., Shimasaki, T., Uchida, H., Kurai, D., Deshpande, G.A., Komagata, Y., & Kaname, S. (2020). Reactive arthritis after COVID-19 infection. *RMD Open*, 6(2), e001350. <https://doi.org/10.1136/rmdopen-2020-001350>

Ostojic, M., Zevrnja, A., Vukojevic, K., & Soljic, V. (2021). Immunofluorescence Analysis of NF-κB and iNOS Expression in Different Cell Populations during Early and Advanced Knee Osteoarthritis. *Int. J. Mol. Sci.*, 16, 22(12), 6461. <https://doi.org/10.3390/ijms22126461>

Sanjurjo-Rodriguez C., Altaie, A., Mastbergen, S., Baboolal, T., Welting, T., Lafaber, F., Pandit, H., McGonagle, D., & Jones, E. (2020). Gene Expression Signatures of Synovial Fluid Multipotent Stromal Cells in Advanced Knee Osteoarthritis and Following Knee Joint Distraction. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 579751. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.579751>

Su, W., Liu, G., Mohajer, B., Wang, J., Shen, A., Zhang, W., Liu, B., Guermazi, A., Gao, P., Cao, X., Demehri, S., & Wan, M. (2022). Senescent preosteoclast secretome promotes metabolic syndrome associated osteoarthritis through cyclooxygenase 2. *Elife*, 26(11), e79773. <https://doi.org/10.7554/eLife.79773>

Walters, M., Skovgaard, K., Andersen, P.H., Heegaard, P.M.H., & Jacobsen, S. (2021). Dynamics of local gene regulations in synovial fluid leukocytes from horses with lipopolysaccharide-induced arthritis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 241, 110325. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2021.110325>

World Health Organization (2023). <https://covid19.who.int/>

Yüce, M., Filiztekin, E., & Özkaya, K.G. (2021). COVID-19 diagnosis – A review of current methods. *Biosens Bioelectron.*, 172, 112752. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112752>

#### References

- Ahmad, N., Ansari, M.Y., & Haqqi, T.M. (2020). Role of iNOS in osteoarthritis: Pathological and therapeutic aspects. *Journal Cell Physiology*, 235(10), 6366–6376. <https://doi.org/10.1002/jcp.29607>
- Borodin, S., Dvorshchenko, K. (2023). Oxidative modification of proteins in the synovial fluid of patients with osteoarthritis after SARS-CoV2 infection. *Bulletin of Taras Shevchenko Kyiv National University. Series "Biology"*, 93(2), 12–16 [in Ukrainian].
- Borodin, S., Korotkiy, O., Huet, A., & Dvorshchenko, K. (2022). Lipid peroxidation in the synovial fluid of patients with osteoarthritis after SARS-CoV2 infection. *Bulletin of Taras Shevchenko Kyiv National University. Series "Biology"*, 3(90), 10–14 [in Ukrainian].
- Borodin, S., Ostapchenko, D., Korotkiy, O., & Dvorshchenko, K. (2022). Indicators of the oxidant-antioxidant system in the synovial fluid of patients with osteoarthritis after SARS-CoV2 infection. *Bulletin of problems biology and medicine*, 4(167), 125–130.
- Campos, M.C., Nery, T., Starke, A.C. de Bem Alves A.C., Speck A.E., & Aguiar A.S. (2022). Post-viral fatigue in COVID-19: A review of symptom assessment methods, mental, cognitive, and physical impairment. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, 142, 104902. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2022.104902>
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162(1), 156–159. <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>
- Farisogullari, B., Pinto, A., S., Machado, P., M. (2022). COVID-19-associated arthritis: an emerging new entity? *RMD Open*, 8(2), e002026. <https://doi.org/10.1136/rmdopen-2021-002026>
- Ferrer, M.D., Busquets-Cortés, C., Capó, X., Tejada, S., Tur, J.A., Pons, A., & Sureda, A. (2019). Cyclooxygenase-2 Inhibitors as a Therapeutic Target in Inflammatory Diseases. *Curr Med Chem.*, 26(18), 3225–3241. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180514112124>

- Girón, M.R., & Torre, M.S. (2020). Synovial fluid cytodiagnosis. *Rev. Esp. Patol.*, 53(2), 100–112. <https://doi.org/10.1016/j.patol.2019.01.004>
- Gupta, K., Kaur, G., Pathak, T., & Banerjee, I. (2022). Systematic review and meta-analysis of human genetic variants contributing to COVID-19 susceptibility and severity. *Gene*, 844, 146790. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146790>
- Gupta, R.C., Lall, R., Srivastava, A., & Sinha, A. (2019). Hyaluronic Acid: Molecular Mechanisms and Therapeutic Trajectory. *Front Vet Sci.*, 25(6), 192. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00192>
- Lineham, B., Altaie, A., Harwood, P., McGonagle, D., Pandit, H., & Jones, E. (2022). A systematic review on the potential value of synovial fluid biomarkers to predict clinical outcomes in cartilage repair treatments. *Osteoarthritis Cartilage*, 30(8), 1035–1049. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2022.05.007>
- Liu, D., Xiao, W.F., & Li, Y.S. (2023). The Diagnostic and Prognostic Value of Synovial Fluid Analysis in Joint Diseases. *Methods Mol. Biol.*, 2695, 295–308. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3346-5\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3346-5_20)
- Livak, K., & Schmittgen, T. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)). *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- McConnell, S., Kolopack, P., Davis, A.M. (2001). The Western Ontario and McMaster universities osteoarthritis index (WOMAC): a review of its utility and measurement properties. *Arthritis Care Res.*, 45(5), 453–461. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200110\)45:5<453::aid-art365>3.0.co;2-w](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200110)45:5<453::aid-art365>3.0.co;2-w)
- Mohamadian, M., Chiti, H., Shoghli, A., Biglari, S., Parsamanesh, N., & Esmaeilzadeh, A. (2021). COVID-19: Virology, biology and novel laboratory diagnosis. *Journal of Gene Medicine*, 23(2), e3303. <https://doi.org/10.1002/jgm.3303>
- Nakata, K., Hanai, T., Take, Y., Osada, T., Tsuchiya, T., Shima, D., & Fujimoto, Y. (2018). Disease-modifying effects of COX-2 selective inhibitors and non-selective NSAIDs in osteoarthritis: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage*, 26(10), 1263–1273. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2018.05.021>
- Oliviero, F., & Mandell, B.F. (2023). Synovial fluid analysis: Relevance for daily clinical practice. *Best Pract Res Clin Rheumatol.*, 8, 101848. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2023.101848>
- Ono, K., Kishimoto, M., Shimasaki, T., Uchida, H., Kurai, D., Deshpande, G.A., Komagata, Y., & Kaname, S. (2020). Reactive arthritis after COVID-19 infection. *RMD Open*, 6(2), e001350. <https://doi.org/10.1136/rmdopen-2020-001350>
- Ostojic, M., Zevrnja, A., Vukojevic, K., & Soljic, V. (2021). Immunofluorescence Analysis of NF-κB and iNOS Expression in Different Cell Populations during Early and Advanced Knee Osteoarthritis. *Internat. Journal Mol. Sci.*, 16, 22(12), 6461. <https://doi.org/10.3390/ijms22126461>
- Sanjurjo-Rodríguez C., Altaie, A., Mastbergen, S., Baboolal, T., Welting, T., Lafeber, F., Pandit, H., McGonagle, D., & Jones, E. (2020). Gene Expression Signatures of Synovial Fluid Multipotent Stromal Cells in Advanced Knee Osteoarthritis and Following Knee Joint Distraction. *Front Bioeng Biotechnol.*, 14, 8, 579751. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.579751>
- Su, W., Liu, G., Mohajer, B., Wang, J., Shen, A., Zhang, W., Liu, B., Guermazi, A., Gao, P., Cao, X., Demehri, S., & Wan, M. (2022). Senescent preosteoclast secretome promotes metabolic syndrome associated osteoarthritis through cyclooxygenase 2. *Elife*, 26, 11, e79773. <https://doi.org/10.7554/eLife.79773>
- Walters, M., Skovgaard, K., Andersen, P.H., Heegaard, P.M.H., & Jacobsen, S. (2021). Dynamics of local gene regulations in synovial fluid leukocytes from horses with lipopolysaccharide-induced arthritis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 241, 110325. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2021.110325>
- World Health Organization (2023). <https://covid19.who.int/>
- Yüce, M., Filiztekin, E., Özkaya, K. G. (2021). COVID-19 diagnosis – A review of current methods. *Biosens Bioelectron.*, 172:112752. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112752>

Отримано редакцією журналу / Received: 29.08.23  
Прорецензовано / Revised: 29.08.23  
Схвалено до друку / Accepted: 29.09.23

Sergiy BORODIN, PhD Student  
ORCID ID: 0000-0002-7146-6874  
e-mail: borodindoc@gmail.com  
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

Alevtyna HUET, PhD (Biol.)  
ORCID ID: 0000-0002-6511-2201  
e-mail: alevtina.dranitsina@gmail.com  
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

Kateryna DVORSHCHENKO, DSc (Biol.)  
ORCID ID: 0000-0003-3118-9355  
e-mail: kateryna.dvorshchenko@knu.ua  
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

## EXPRESSION OF PTGS2 AND NOS2 GENES IN THE SYNOVIAL FLUID OF PATIENTS WITH OSTEOARTHRITIS AFTER SARS-CoV2 INFECTION

**Background.** The emergence of a new severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has created a serious global threat to the health of people in various countries. The 2019 coronavirus disease (Coronavirus disease 2019, COVID-19) has caused the development of many complications in the population of most countries of the world. Currently, many people have felt the unpleasant consequences of the coronavirus infection. Among them, a special group consists of patients with chronic diseases, particularly osteoarthritis. The development of inflammation and intensification of free radical processes is a leading link in the pathogenesis of osteoarthritis. Inflammatory and degenerative processes that develop in osteoarthritis cause modification of the molecular and cellular composition of the synovial fluid.

**Methods.** The aim of the work was to determine the expression of (Prostaglandin-endoperoxide synthase 2) and NOS2 (Nitric Oxide Synthase 2) genes in synovial fluid cells of patients with osteoarthritis after SARS-CoV2 infection. All study participants were divided into two groups. The first group (n = 22) is patients with osteoarthritis of the knee joints II-III degree. The second group (n = 14) is patients with osteoarthritis of the knee joints II-III degree, who suffered a mild and moderate form of COVID-19 6–9 months ago. Expression of PTGS2 and NOS2 genes was determined in nuclear cells of synovial fluid. RNA was obtained by the Chomczynski method. Synthesis of cDNA and quantitative polymerase chain reaction in real time (Real-time PCR, qPCR) using the commercial kit "Thermo Scientific Verso SYBR Green 1-Step qRT-PCR ROX Mix" ("Thermo Scientific, Lithuania). Processing of research results was carried out using generally accepted methods of variational statistics.

**Results.** In patients with osteoarthritis of the knee joints after SARS-CoV2 infection, the expression of PTGS2 and NOS2 genes increases in nuclear cells of the synovial fluid compared to patients diagnosed with osteoarthritis.

**Conclusions.** Our results indicate that patients with osteoarthritis may develop a more severe course of synovial inflammation after infection with COVID-19.

**Keywords:** SARS-CoV-2, osteoarthritis, synovial fluid, inflammation, NOS2, PTGS2 gene expression.

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів. Спонсори не брали участі в розробленні дослідження; у зборі, аналізі чи інтерпретації даних; у написанні рукопису; в рішенні про публікацію результатів.

The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; in the decision to publish the results.



УДК 576.08;616-006.6;547.831  
DOI: 10.17721/1728.2748.2023.94.15-22

Павло ВІРИЧ<sup>1</sup>, канд. біол. наук, наук. співроб.  
ORCID ID: 0000-0002-1463-1992  
e-mail: pavlo.virych@knu.ua

Віталій СМОКАЛ<sup>1</sup>, канд. хім. наук, ст. наук. співроб.  
ORCID ID: 0000-0001-6832-8625  
e-mail: vitalii.smokal@knu.ua

Оксана ХАРЧЕНКО<sup>1</sup>, канд. хім. наук, наук. співроб.  
ORCID ID: 0000-0001-6900-514X  
e-mail: oksana\_kharchenko@ukr.net

Наталія КУЦЕВОЛ<sup>1</sup>, д-р хім. наук, пров. наук. співроб.  
ORCID ID: 0000-0002-1468-4111  
e-mail: nataliya.kutsevol@knu.ua

Петро ВІРИЧ<sup>2</sup>, асп.  
ORCID ID: 0000-0001-6201-3892  
e-mail: anabenas@gmail.com

<sup>1</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна  
<sup>2</sup>Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького, Київ, Україна

## ХЕЛАТУВАННЯ ДВОВАЛЕНТНИХ КАТІОНІВ ТА АНТИРАКОВА АКТИВНІСТЬ ПОХІДНИХ 8-ГІДРОКСИСТИРИЛХІНОЛІНІВ *IN VITRO*

**Вступ.** У зв'язку зі швидким набуттям резистентності до традиційних хіміопрепаратів та їхньою токсичністю пошук нових методів лікування та діагностики раку залишається актуальним. Похідні 8-гідроксихінолінів мають широкий спектр біологічної активності та необхідні властивості для флуоресцентної діагностики раку. Метою дослідження було визначити хелатування катіонів кальцію, магнію та цинку похідними 8-гідроксистирилхіноліну (8HQ), 2-[2-(4-хлорофеніл)етеніл]хінолін-8-олом (STQ-Cl) та 2-[2-(4-нітрофеніл)етеніл]хінолін-8-олом (STQ-NO<sub>2</sub>) у фізіологічному розчині; дослідити стабільність утворених комплексів і токсичність сполук щодо ліній клітин раку передміхурової та молочної залози *in vitro*. Об'єкт дослідження – похідні 8-гідроксистирилхінолінів, 2-[2-(4-хлорофеніл)етеніл]хінолін-8-ол та 2-[2-(4-нітрофеніл)етеніл]хінолін-8-ол.

**Методи.** Використано похідні 8HQ, STQ-Cl та STQ-NO<sub>2</sub>. Готували розчини катіонів Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> методом двократних розведень у діапазоні концентрацій 0,5–0,0078125 мМ на основі 0,9 % NaCl. Використано як окремі розчини кожного катіона, так і суміш у еквівалентному молярному співвідношенні. Концентрації похідних 8HQ – 0,05 мМ. Реєстрували оптичне поглинання у діапазоні довжин хвиль 200–700 нм. Цитотоксичність досліджували на лініях клітин раку молочної (MDA-MB-231) та передміхурової залози (DU-145). До інкубаційного розчину додавали похідні STQ-Cl та STQ-NO<sub>2</sub> у ДМСО методом чотирикратних розведень (0,125–0,00003 мМ). Для люмінесцентних досліджень клітини MDA-MB-231 та DU-145 вирощували на покривних скельцях. Кінцева концентрація похідних 8HQ – 5 мМ. Клітини витримували протягом 5, 10, 20 та 30 хв. Реєстрували люмінесценцію за однакових умов для всіх зразків, час експозиції 10 мс.

**Результати.** Mg<sup>2+</sup> та Ca<sup>2+</sup> (0,03125 мМ) сприяє зниженню інтенсивності максимумів оптичного поглинання STQ-Cl у 1,6 та 1,3 рази, відповідно. Ефект найбільш виражений за концентрації Zn<sup>2+</sup> 0,015625 мМ. Слабкі відмінності оптичного поглинання розчинів спостерігаються під час інкубування STQ-NO<sub>2</sub> з різними концентраціями катіонів кальцію та магнію. Інтенсивність поглинання водного розчину STQ-NO<sub>2</sub> збільшувалася за концентрації Zn<sup>2+</sup> 0,015625 та 0,03125 мМ. Максимальна цитотоксичність щодо клітин MDA-MB-231 для STQ-Cl – близько 80 %, а STQ-NO<sub>2</sub> – 60 % за концентрації 0,04 мМ. Клітини DU-145 виявилися більш чутливими до STQ-NO<sub>2</sub> (EC<sub>50</sub> = 0,011 мМ), але слабо чутливими до STQ-Cl (50 % за 0,125 мМ). Максимальна інтенсивність люмінесценції досягається через 20 хв інкубування клітин обох ліній з STQ-Cl та STQ-NO<sub>2</sub> (5 мМ) і не змінюється із часом.

**Висновки.** Зниження максимумів оптичного поглинання водних розчинів STQ-Cl за наявності катіонів магнію, кальцію, цинку є наслідком агрегаційних процесів. Це явище ймовірно є причиною різної цитотоксичності сполук STQ-Cl та STQ-NO<sub>2</sub>, а також дії інших механізмів на ракові клітини. Отримані результати є наслідком різної спорідненості похідних 8-гідроксихінолінів до катіонів магнію, кальцію та цинку, розчинності у воді, стабільності, схильності до агрегації утворених комплексів та вільних речовин.

**Ключові слова:** 8-гідроксистирилхіноліни, цинк, кальцій, магній, ракові клітини, цитотоксичність.

### Вступ

Рак є однією з головних причин смертності у світі і розробка ефективних та малотоксичних методів лікування має велике значення. Висока ефективність цисплатину значно підвищила інтерес до протипухлинних металопрепаратів. Але їхнє застосування обмежується високою токсичністю та швидкою адаптацією ракових клітин, що призводить до резистентності. Сполуки на основі 8-гідроксихінолінів (8HQ) мають широкий спектр біологічної активності, яка включає антибактеріальну, протиракову, противірусну та антигрибкову. Молекула зберігає властивості піримідину і бензолу та здатна

хелатувати ряд катіонів: Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Mn<sup>2+</sup> тощо. (Shoji et al., 2003). Похідні 8-гідроксихінолінів розчиняються в ацетоні, хлороформі, бензолі та водних розчинах мінеральних кислот. Прищеплення різних замісників до основної молекули забезпечує створення фармакологічно активних сполук із заданими властивостями, низькою токсичністю та високою селективністю. Хелатування металів є одним із механізмів дії похідних 8-гідроксихінолінів під час лікування нейродегенеративних розладів. Взаємодія нітросоліну з раковими клітинами ініціює виробництво активних форм кисню (АФК). 8HQ та їхні комплекси з металами інтеркалюють у ДНК,

що є причиною антибактеріальної, фунгіцидної та протиракової активності (Gupta, Luxami, & Paul, 2021). Сполуки на основі 8-гідроксистирилхінолінів можуть бути інгібіторами протеаз та потенційними кандидатами під час лікування СНІДу (Zheng et al., 2005; Jacobsen et al., 2011).

Іони металів є важливим компонентом біологічних систем і беруть участь у підтримці клітинного гомеостазу, регуляції метаболізму, синтезі речовин, передачі сигналів тощо. Порушення обміну катіонів металів впливає на фізіологічні функції клітин та може призвести до смерті (Liu et al., 2021; Gumienka-Konteska et al., 2013). Це вказує, що катіони металів мають специфічні механізми індукції загибелі клітин і можуть бути корисними у ході розробки методів лікування раку. Не менш важливою є діагностика раку. Технології біовізуалізації передбачають використання контрастуючих агентів. Недоліками таких сполук є недостатній час циркуляції *in vivo*, короткий період напіврозпаду радіоактивних ізотопів та висока токсичність. У зв'язку з цим інтенсивно проводиться пошук нових нанозондів з більш специфічними фізичними та хімічними характеристиками (Hu et al., 2022). 8-гідроксистирилхіноліни та їхні похідні використовуються для синтезу високочутливих флуоресцентних хемосенсорів, які можуть бути індикаторами наявності біологічно важливих катіонів металів (Heiskanen et al., 2007; Rohini, Paul, & Luxami, 2020).

**Метою** дослідження було визначити здатність до хелатування катіонів кальцію, магнію та цинку гідрофобними похідними 8-гідроксистирилхінолінів STQ-Cl і STQ-NO<sub>2</sub> у фізіологічному розчині, стабільність утворених комплексів та токсичність сполук щодо ліній клітин раку передміхурової та молочної залози *in vitro*.

**Об'єкт дослідження.** Похідні 8-гідроксистирилхінолінів, 2-[2-(4-хлорофеніл)етеніл]хінолін-8-ол та 2-[2-(4-нітрофеніл)етеніл]хінолін-8-ол.

#### Методи

**Хелатування катіонів похідними 8-гідроксистирилхінолінів.** Використано похідні 8HQ STQ-Cl та STQ-NO<sub>2</sub>. Готували розчини катіонів Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> методом двократних розведень у діапазоні концентрацій 0,5–0,0078125 мМ. Використано як окремі розчини кожного катіона, так і суміш в еквівалентному молярному співвідношенні. У кожну пробірку додавали тестову сполуку до досягнення концентрації 0,05 мМ. Оптичне поглинання вимірювали на спектрофотометрі Perkin Elmer Lambda 365 UV (США) у діапазоні довжин хвиль 200–700 нм через 5, 20, 40 і 60 хв. Повторність дослідів трикратна.

**Цитотоксичність для ракових клітин *in vitro*.** Дослідження проведено на лініях клітин раку молочної залози MDA-MB-231 та передміхурової залози DU-145. Клітини отримано з банку клітинних ліній тканин людини і тварин Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р.Є. Кавецького. Клітини інкубували в середовищі DMEM з 10 % фетальної сироватки теляти, 40 мкг/мл гентаміцину в атмосфері 5 % CO<sub>2</sub> за 37 °С. До інкубаційного розчину додавали похідні 8HQ у ДМСО методом чотирикратних розведень у діапазоні концентрацій 0,125–0,00003 мМ. Кінцева концентрація ДМСО у розчині інкубації не перевищувала 0,25 %. У контрольні лунки додавали еквівалентну кількість розчинника та проводили аналогічні маніпуляції але без тестових сполук.

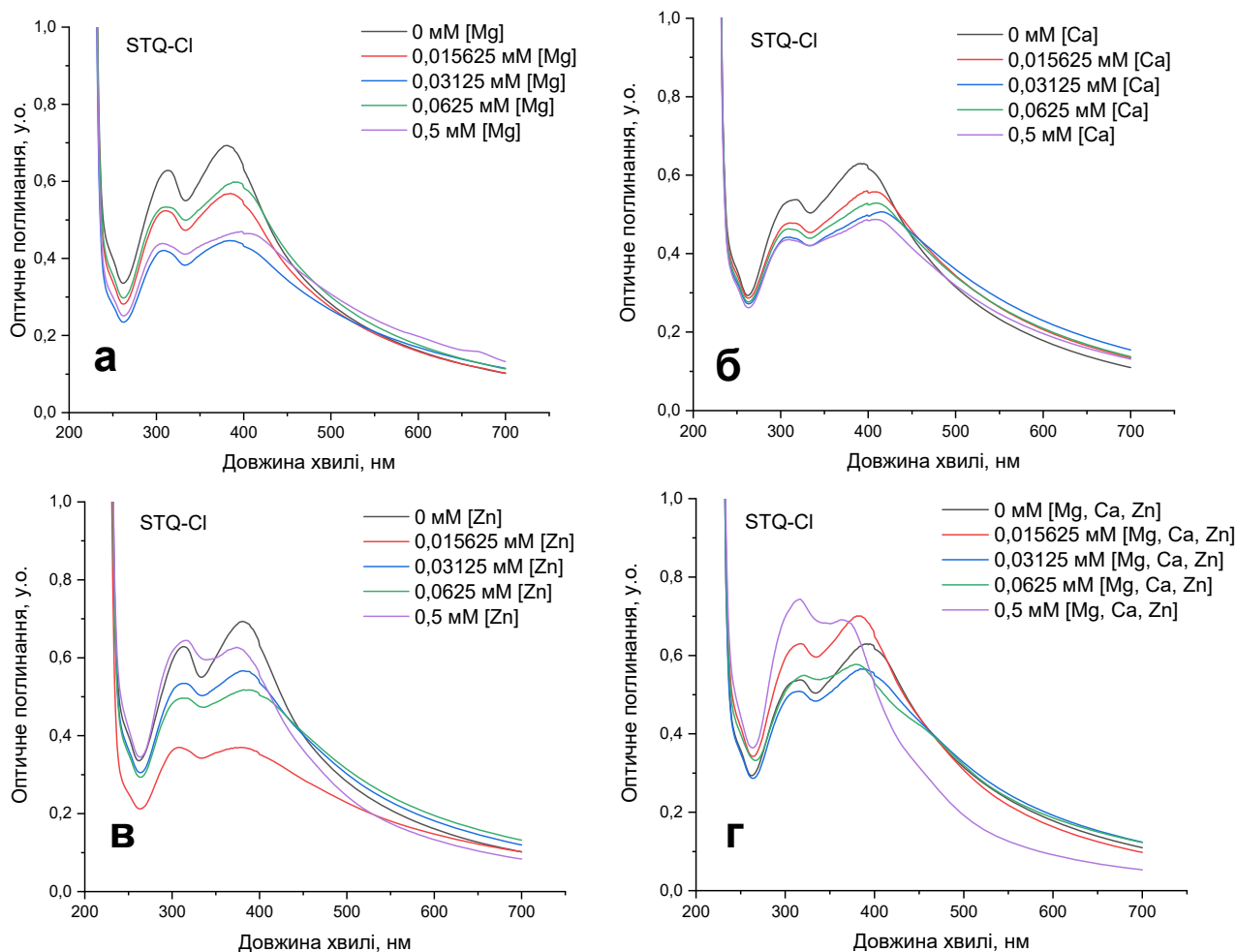
Через 48 год середовище видаляли. У кожну лунку додавали 50 мкл 0,5 % розчину кристалічного фіолетового в 70 % метанолі. Барвник видаляли через 10 хв. Лунки тричі промивали дистильованою водою. Кількість клітин визначали фотометрично за допомогою планшетного спектрофотометра на довжині хвилі 540 нм. Будували криві "доза-ефект" та розраховували EC50 за рівнянням Хілла (Pulukuri et al., 2020). Обробку даних проводили за допомогою програмного забезпечення OriginLab 8. Повторність досліджень трикратна.

**Люмінесцентні дослідження.** Лінії клітин молочної залози MDA-MB-231 та передміхурової залози DU-145 інкубували на покривних скельцях у середовищі DMEM з підвищеною концентрацією глюкози та пірвату, 10 % фетальної сироватки теляти, 40 мкг/мл гентаміцину в атмосфері 5 % CO<sub>2</sub> за 37 °С. Інкубаційне середовище видаляли та додавали тестові похідні 8HQ у фізіологічному розчині. Кінцева концентрація 5 мМ. Клітини фарбували протягом 5, 10, 20 та 30 хв, промивали 1 хв фізіологічним розчином. Люмінесценцію досліджували на мікроскопі Carl Zeiss з камерою AxioCam ICs5 та люмінесцентним блоком HXP 120 V. Для збудження люмінесценції використовували широкопалубовий ультрафіолетовий світлофільтр 330–380 нм. Усі зразки фотографували в однакових умовах, час експозиції 10 мс. Люмінесценцію клітин аналізували за допомогою програмного забезпечення ImageJ. Визначали ділянки з високою яскравістю люмінесценції за шкалою градації сірого. Дані представлено у вигляді медіани та кuartилів. Кількість вимірювань для кожного зразка – 50. Обробку даних проводили за допомогою програмного забезпечення OriginLab 8. Дослідження повторювали 10 разів.

#### Результати

Похідні 8-гідроксистирилхінолінів застосовуються як оптичні перемикачі, засоби збереження даних, нелінійні оптичні пристрої, флуоресцентні зонди тощо. Такі властивості, у комплексі з хелатуючою здатністю, можуть виявитися корисними для визначення вмісту катіонів у клітинах та тканинах. Перешкодою їхнього застосування є низька розчинність у воді та схильність до агрегації. Переважна більшість досліджень хелатування катіонів металів похідними 8HQ проведено в умовах повної розчинності тестових сполук у гідрофобних розчинниках чи їхніх сумішах (Monzon, Burke, & Coey, 2011). У водних розчинах властивості втрачаються. У зв'язку з цим існує потреба модифікації молекули з метою підвищення гідрофільності. Пошук оптимальної конструкції кінцевої молекули має важливе значення для прикладного її застосування в біологічних системах, у тому числі тераностики раку.

Перевірено можливість хелатування похідними 8-гідроксистирилхінолінів STQ-Cl та STQ-NO<sub>2</sub> катіонів Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> та Zn<sup>2+</sup> у фізіологічному розчині. Наявність Mg<sup>2+</sup> та Ca<sup>2+</sup> сприяє зниженню інтенсивності максимумів оптичного поглинання STQ-Cl у 1,6 та 1,3 раза відповідно за концентрації катіонів у середовищі 0,03125 мМ (рис. 1, а, б). Зважаючи на погану розчинність STQ-Cl у воді, припускаємо, що відбувається осадження утворених комплексів. Ефект найбільш виражений за концентрації Zn<sup>2+</sup> 0,015625 мМ (рис. 1, в).



**Рис. 1. Оптичне поглинання похідного 8-гідроксистирилхіноліну STQ-Cl (0,05 мМ) у фізіологічному розчині за наявності катіонів  $Mg^{2+}$  (а),  $Ca^{2+}$  (б),  $Zn^{2+}$  (в) та їхньої суміші в однаковому молярному співвідношенні (г). Тривалість інкубації STQ-NO<sub>2</sub> з катіонами 5 хв**

Виявлено збільшення максимумів 320 і 380 нм STQ-Cl за концентрації  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  та  $Zn^{2+}$  0,5 мМ і 0,015625 мМ (рис. 1, г). Ми припускаємо складні конкурентні взаємодії між катіонами за сайт зв'язування хінолінової структури, можливого формування перехідних станів за участі різних катіонів та декількох молекул похідних 8-гідроксистирилхінолінів, які виражаються у зміні форми спектра оптичного поглинання водного розчину STQ-Cl. Не виключено, що отримані ефекти є наслідком утворення агрегатів.

Слабкі відмінності оптичного поглинання розчинів спостерігаються під час інкубування STQ-NO<sub>2</sub> з різними концентраціями катіонів кальцію та магнію (рис. 2, а, б). Інтенсивність поглинання водного розчину STQ-NO<sub>2</sub> збільшувалася за концентрації  $Zn^{2+}$  0,015625 та 0,03125 мМ (рис. 2, в), що відповідає молярному співвідношенню катіон : хелатор менше 1:1. Зі збільшенням цього співвідношення спостерігається зниження оптичного поглинання щодо початкового розчину STQ-NO<sub>2</sub>. У суміші  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  та  $Zn^{2+}$  суттєвих змін інтенсивності

оптичного поглинання STQ-NO<sub>2</sub> не виявлено. Варто вказати лише на незначне збільшення максимумів за концентрації катіонів 0,0625 мМ. Припускаємо, що зареєстровані зміни інтенсивності оптичного поглинання є проявом відмінностей розчинності утворених комплексів у воді та їхньої схильності до агрегації.

Отримані результати дуже важливі для розуміння взаємодії похідних 8-гідроксистирилхінолінів з найпоширенішими двовалентними катіонами в біологічних системах.

Цитотоксичність похідних 8-гідроксистирилхінолінів STQ-Cl та STQ-NO<sub>2</sub> перевіряли на культурах клітин раку молочної (MDA-MB-231) та передміхурової залози (DU-145). Відомо, що розвиток раку цих органів часто супроводжується порушенням метаболізму цинку, кальцію та магнію (Zhao et al., 2016; Cui et al., 2007; Dai et al., 2011). Ці елементи є важливими регуляторами біохімічних процесів та внутрішньоклітинного сигналіngu. Клітини раку молочної залози схильні до акумуляції цинку (Rusch et al., 2021), для передміхурової залози спостерігається протилежний ефект (Xue et al., 2019).

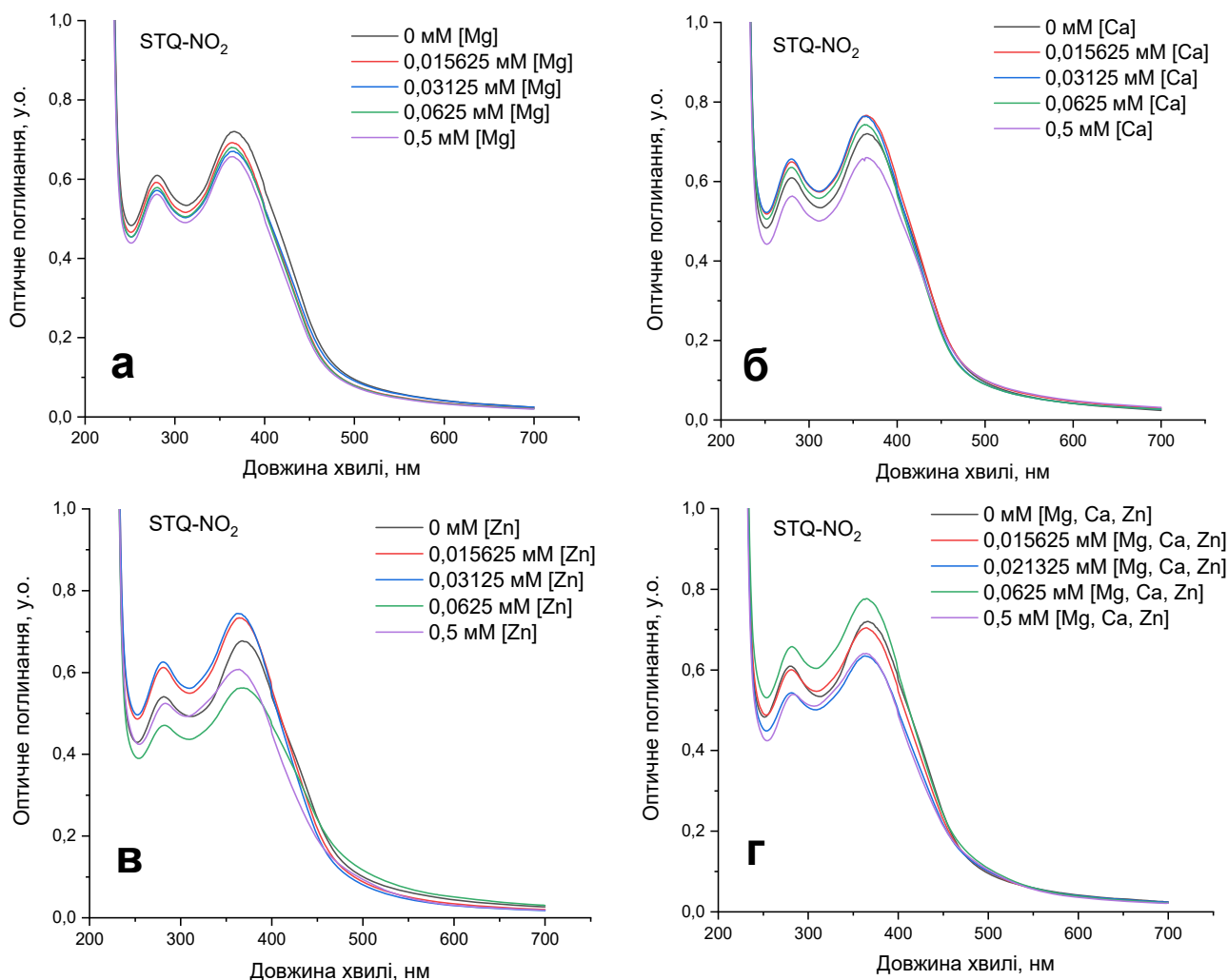


Рис. 2. Оптичне поглинання похідного 8-гідроксистирилхіноліну STQ-NO<sub>2</sub> (0,05 мМ) у фізіологічному розчині за наявності катіонів Mg<sup>2+</sup> (а), Ca<sup>2+</sup> (б), Zn<sup>2+</sup> (в) та їхньої суміші в однаковому молярному співвідношенні (г). Тривалість інкубації STQ-NO<sub>2</sub> з катіонами 5 хв

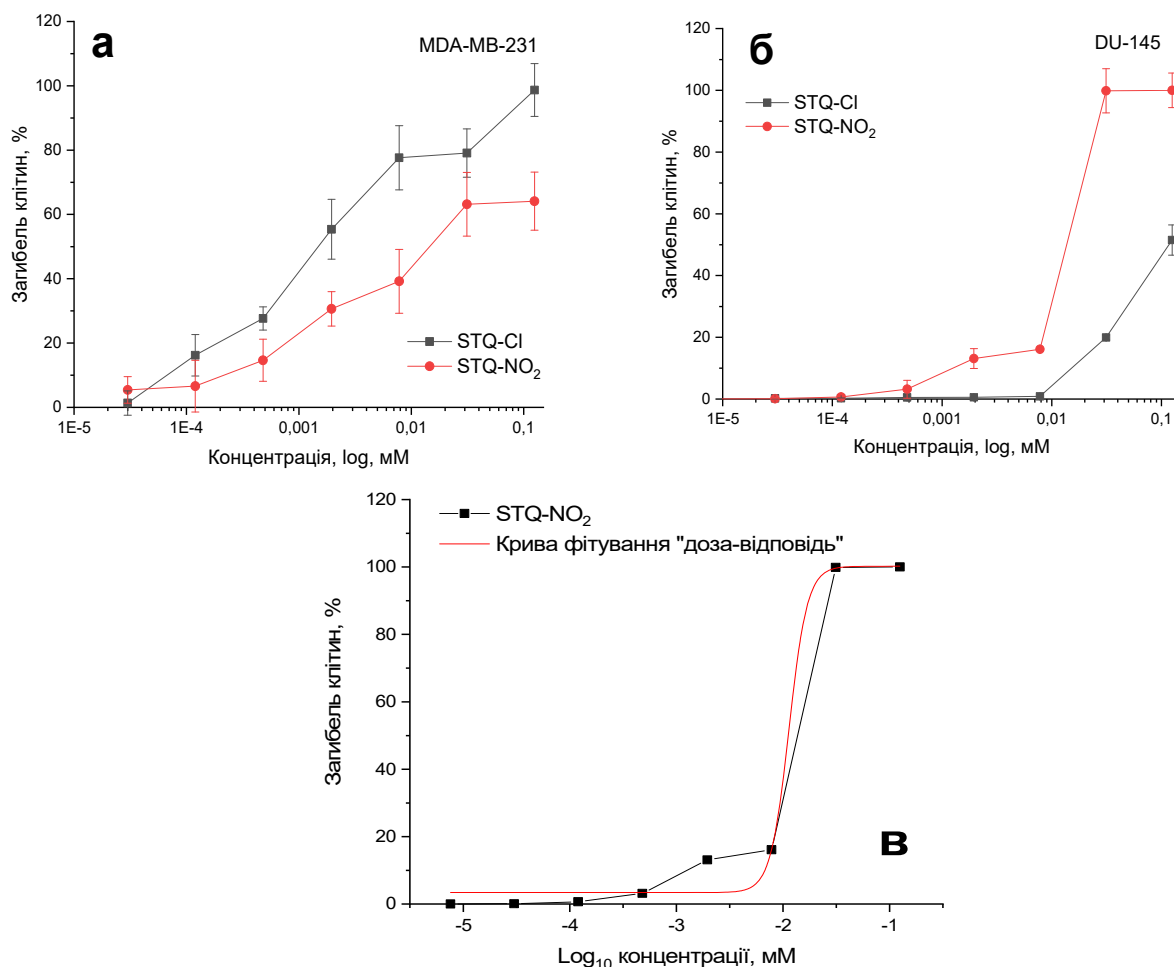
Виявлено відмінності цитотоксичності похідних 8-гідроксистирилхінолінів STQ-Cl та STQ-NO<sub>2</sub> щодо лінії клітин раку молочної залози MDA-MB-231 (рис. 3, а). Максимальний ефект близько 80 % досягається за концентрації STQ-Cl у середовищі інкубації 0,04 мМ, а STQ-NO<sub>2</sub> – 60 %.

Клітини раку передміхурової залози DU-145 виявилися більш чутливими до STQ-NO<sub>2</sub> (EC<sub>50</sub> = 0,011 мМ). Максимальна цитотоксичність (близько 100 %) досягається за концентрації вище 0,02 мМ (рис. 2, б). Ця лінія клітин виявилася слабо чутливою до STQ-Cl. Виявлено максимальну цитотоксичність 50 % за концентрації 0,125 мМ.

Отже, виявлено різну цитотоксичність похідних 8НҚ щодо ліній клітин передміхурової та молочної залоз. Вважаємо, що одним з основних механізмів дії 8НҚ є зв'язування катіонів металів у цитоплазмі клітин. У зв'язку з цим можна припустити їхню різну важливість для проліферації клітин. Рак передміхурової залози характери-

зується зниженою концентрацією цинку в клітинах (Хуе et al., 2019). Підвищення вмісту елемента може інгібувати поділ клітини та ініціювати апоптоз (То et al., 2020). У зв'язку з неселективним хелатуванням Zn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> та Mg<sup>2+</sup> похідні 8-гідроксистирилхінолінів можуть знижувати концентрацію кальцію і магнію в цитоплазмі, а також перешкоджати протіканню магнієзалежних біохімічних процесів. Припускаємо, що слабку чутливість цих клітин до дії STQ-Cl можна пояснити значно гіршою розчинністю сполуки у водних розчинах та швидкою інактивацією через агрегаційні процеси та осадження під час утворення комплексів з кальцієм або магнієм, як було показано попередньо. Крім того, існують інші механізми цитотоксичності похідних 8-гідроксихінолінів, які пов'язані з порушенням функціонування ензимів з катіонами металів як кофакторами (Chen et al., 2019; Conan et al., 2022). Блокування активних центрів порушує нормальний перебіг біохімічних реакцій та призводить до загибелі клітин.





**Рис. 3.** Цитотоксичність похідних 8-гідроксистирилхінолінів STQ-Cl, STQ-NO<sub>2</sub> щодо раку молочної залози MDA-MB-231 (а) і передміхурової залози DU-145 (б); крива фітування даних цитотоксичності STQ-NO<sub>2</sub> (в) щодо лінії клітин DU-145 (pEC50 = -1,94, коефіцієнт Хілла = 5,03); (M ± SD, n = 3)

Фізіологічні особливості клітин раку молочної залози щодо акумуляції цинку протилежні до раку передміхурової залози (Rusch et al., 2021). Спостерігається значне накопичення Zn<sup>2+</sup> у цитоплазмі ракових клітин щодо нормальних оточуючих тканин. Процес важливий для швидкої проліферації клітин та росту пухлини. Наявність хелатора зв'язує певну частку іонів цинку, що уповільнює швидкість розмноження. На це вказує зниження відносної кількості клітин за мінімальної наявності похідних 8-гідроксистирилхінолінів (рис. 3, а). Відмінності в цитотоксичності STQ-Cl та STQ-NO<sub>2</sub> щодо MDA-MB-231 можливо пов'язані з різною розчинністю сполук у воді та наявністю інших клітинних мішеней.

Похідні 8-гідроксистирилхінолінів є флуороогенними лігандами під час хелатування іонів металів. Завдяки таким властивостям вони використовуються як флуоресцентні детектори та засоби кількісного аналізу катіонів металів. Безпосередньо молекула 8HQ є слабким флуорофором з коротким часом життя. Надшвидке протонування та депротонування є причиною ультракороткої флуоресценції вільного хелатора, тоді як зв'язування катіона металу

перешкоджає цьому процесу. Як наслідок, тривалість флуоресценції значно зростає (Park et al., 2016). Ми використали цю властивість для визначення акумуляції та хелатування двовалентних катіонів у цитоплазмі ліній клітин раку молочної (MDA-MB-231) та передміхурової залози (DU-145). У зв'язку з відносно низькою концентрацією катіонів металів у цитоплазмі клітин інтенсивність виявленої флуоресценції була слабка. Проте через 20 хв інкубування клітин обох ліній з STQ-Cl (5 мМ) досягається максимальний рівень флуоресценції та не змінюється з часом (рис. 4, а, в). Аналогічні результати отримано після додавання STQ-NO<sub>2</sub> (рис. 4, б, г).

Отже, похідні 8HQ STQ-Cl та STQ-NO<sub>2</sub> проникають у ракові клітини молочної та передміхурової залози за короткий проміжок часу (до 30 хв). Враховуючи швидкість агрегації STQ-Cl, сполука малоприсадна для визначення вмісту катіонів металів у цитоплазмі клітин, але механізми її цитотоксичності потребують подальших досліджень.

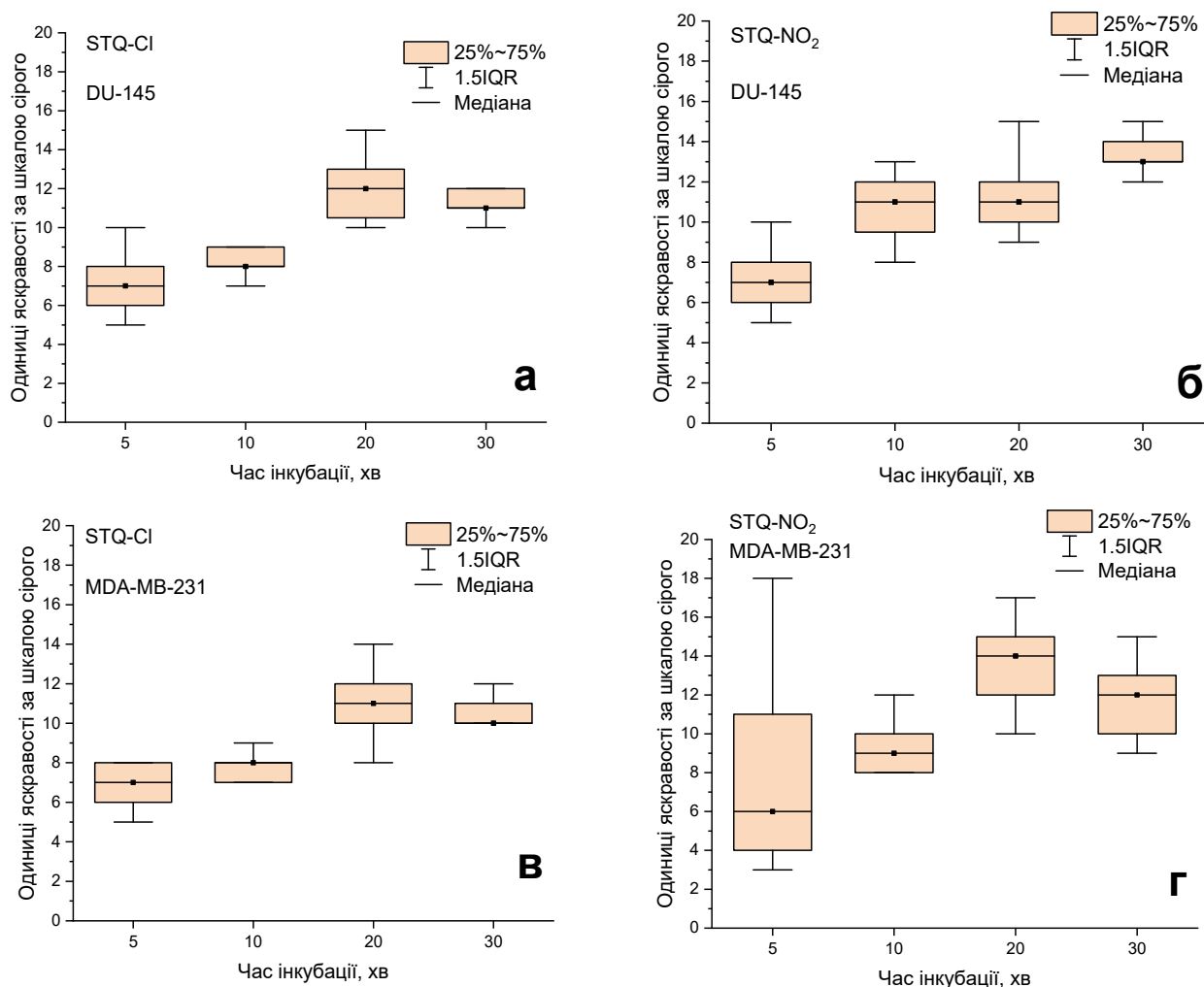


Рис. 4. Люмінесценція клітин раку передміхурової залози DU-145 (а, б) та молочної залози MDA-MB-231 (в, г) після інкубації з похідними 8-гідроксистирилхінолінів STQ-Cl (а, в) та STQ-NO<sub>2</sub> (б, г) протягом 5, 10, 20, 30 хв; медіана і квартилі,  $n = 10$

#### Дискусія і висновки

Виявлено зниження максимумів оптичного поглинання водних розчинів похідних 8-гідроксистирилхінолінів STQ-Cl за наявності  $Mg^{2+}$  (0,03125 мМ),  $Ca^{2+}$  (0,03125 мМ),  $Zn^{2+}$  (0,015625 мМ), що найбільш імовірно є наслідком агрегаційних процесів утворених комплексів. Відносно кращу стабільність демонструє сполука STQ-NO<sub>2</sub> за аналогічних умов. Спектри оптичного поглинання змінювалися не суттєво. Виявлено відмінності цитотоксичності STQ-Cl та STQ-NO<sub>2</sub> щодо лінії клітин раку молочної (MDA-MB-231) та передміхурової (DU-145) залоз. Виявлено високу цитотоксичність STQ-NO<sub>2</sub> щодо клітин DU-145 ( $EC_{50} = 0,011$  мМ), а STQ-Cl мав слабкий вплив на виживання цих клітин. Максимальна цитотоксичність сполук STQ-Cl та STQ-NO<sub>2</sub> клітин MDA-MB-231 була в межах 90 % та 60 %, відповідно. Отримані результати є наслідком різної спорідненості похідних 8-гідроксистирилхінолінів до катіонів магнію, кальцію та цинку, розчинності у воді, стабільності, схильності до агрегації утворених комплексів та вільних речовин.

**Внесок авторів:** Павло Вірич – методологія, написання (оригінальна чернетка), написання (перегляд і редагування); Віталій Смокал – написання (оригінальна чернетка), валідація даних; Оксана Харченко – методологія, формальний аналіз; Наталія Куцевол – концептуалізація, формальний аналіз; Петро Вірич – методологія, валідація даних.

**Подяки, джерела фінансування.** Дослідження виконано за підтримки Міністерства освіти і науки України, проєкт 0122U001818.

#### Список використаних джерел

- Chen, C., Yang, X., Fang, H., & Hou, X. (2019). Design, synthesis and preliminary bioactivity evaluations of 8-hydroxyquinoline derivatives as matrix metalloproteinase (MMP) inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*, 181, 111563. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111563>
- Conan, P., Léon, A., Gourdel, M., Rollet, C., Chair, L., Caroff, N., Le Goux, N., Le Jossic-Corcos, C., Sinane, M., Gentile, L., Maillebois, L., Loäc, N., Martin, J., Vilaine, M., Corcos, L., Mignen, O., Croyal, M., Voisset, C., Bihel, F., & Friocourt, G. (2022). Identification of 8-Hydroxyquinoline Derivatives That Decrease Cystathionine Beta Synthase (CBS) Activity. *International journal of molecular sciences*, 23(12), 6769. <https://doi.org/10.3390/ijms23126769>
- Cui, Y., Vogt, S., Olson, N., Glass, A.G., & Rohan, T.E. (2007). Levels of zinc, selenium, calcium, and iron in benign breast tissue and risk of subsequent breast cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 16(8), 1682–1685. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-07-0187>
- Dai, Q., Motley, S. S., Smith, J.A. Jr., Concepcion, R., Barocas, D., Byerly, S., & Fowke, J. H. (2011). Blood magnesium, and the interaction with calcium, on the risk of high-grade prostate cancer. *PloS one*, 6(4), e18237. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018237>
- Gumienna-Kontecka, E., Nurchi, V.M., Szebesczyk, A., Biliska, P., Krzywoszynska, K., & Kozłowski, H. (2013). Chelating agents as tools for the treatment of metal overload. *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie*, 639, 1321–1331. <https://doi.org/10.1002/zaac.201300064>
- Gupta, R., Luxami, V., & Paul, K. (2021). Insights of 8-hydroxyquinolines: A novel target in medicinal chemistry. *Bioorganic chemistry*, 108, 104633. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104633>

Heiskanen, J.P., Omar, W.A.E., Ylikunnari, M.K., Haavisto, K.M., Juan, M.J., & Hormi O.E.O. (2007). Synthesis of 4-Alkoxy-8-hydroxyquinolines. *The Journal of Organic Chemistry*, 72(3), 920–922. <https://doi.org/10.1021/jo062175i>

Hu, H., Xu, Q., Mo, Z., Hu, X., He, Q., Zhang, Z., & Xu, Z. (2022). New anti-cancer explorations based on metal ions. *Journal of nanobiotechnology*, 20(1), 457. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01661-w>

Jacobsen, J.A., Fullagar, J.L., Miller, M.T., & Cohen, S.M. (2011). Identifying chelators for metalloprotein inhibitors using a fragment-based approach. *Journal of medicinal chemistry*, 54(2), 591–602. <https://doi.org/10.1021/jm101266s>

Liu, Y., Wang, Y., Song, S., & Zhang, H. (2021). Cancer therapeutic strategies based on metal ions. *Chemical science*, 12(37), 12234–12247. <https://doi.org/10.1039/d1sc03516a>

Monzon, L.M.A., Burke, F., & Coey, J.M.D. (2011). Optical, Magnetic, Electrochemical, and Electrical Properties of 8-Hydroxyquinoline-Based Complexes with  $Al^{3+}$ ,  $Cr^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , and  $Zn^{2+}$ . *The Journal of Physical Chemistry C*, 115(18), 9182–9192. <https://doi.org/10.1021/jp201019c>

Park, S.-Y., Ghosh, P., Park, S.O., Lee, Y.M., Kwak, S.K., & Kwon, O.-H. (2016). Origin of ultraweak fluorescence of 8-hydroxyquinoline in water: photoinduced ultrafast proton transfer. *RSC Advanced*, 6, 9812–9821. <https://doi.org/10.1039/C5RA23802A>

Pulukuri, S. M., Gondi, C. S., Lakka, S. S., Jutla, A., Estes, N., Gujrati, M., & Rao, J. S. (2020). Retraction: RNA interference-directed knockdown of urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor inhibits prostate cancer cell invasion, survival, and tumorigenicity in vivo. *The Journal of biological chemistry*, 295(37), 13136. <https://doi.org/10.1074/jbc.RX120.015588>

Rohini, Paul, K., & Luxami, V. (2020). 8-Hydroxyquinoline Fluorophore for Sensing of Metal Ions and Anions. *Chemical record*, 20(12), 1430–1473. <https://doi.org/10.1002/tcr.202000082>

Rusch, P., Hirner, A.V., Schmitz, O., Kimmig, R., Hoffmann, O., & Diel, M. (2021). Zinc distribution within breast cancer tissue of different intrinsic subtypes. *Archives of gynecology and obstetrics*, 303(1), 195–205. <https://doi.org/10.1007/s00404-020-05789-8>

Shoji, E., Miyatake, K., Hlil, A., Hay, A., Maindrone, T., Jousseau, V., Dodelet, J., Tao, Y., & D'Iorio, M. (2003). Immiscible polymers in double spin-coated electroluminescent devices containing phenyl-substituted Tris (8-Hydroxyquinoline) aluminum derivatives soluble in a host polymer. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 41, 3006–3016. <https://doi.org/10.1002/pola.10883>

To, P.K., Do, M.H., Cho, J.H., & Jung, C. (2020). Growth Modulatory Role of Zinc in Prostate Cancer and Application to Cancer Therapeutics. *International journal of molecular sciences*, 21(8), 2991. <https://doi.org/10.3390/ijms21082991>

Xue, Y.N., Yu, B.B., Liu, Y.N., Guo, R., Li, J.L., Zhang, L.C., Su, J., Sun, L.K., & Li, Y. (2019). Zinc promotes prostate cancer cell chemosensitivity to paclitaxel by inhibiting epithelial-mesenchymal transition and inducing apoptosis. *The Prostate*, 79(6), 647–656. <https://doi.org/10.1002/pros.23772>

Zhao, J., Wu, Q., Hu, X., Dong, X., Wang, L., Liu, Q., Long, Z., & Li, L. (2016). Comparative study of serum zinc concentrations in benign and malignant prostate disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Scientific reports*, 6, 25778. <https://doi.org/10.1038/srep25778>

Zheng, H., Weiner, L.M., Bar-Am, O., Epsztejn, S., Cabantchik, Z.I., Warshawsky, A., Youdim, M.B., & Fridkin, M. (2005). Design, synthesis, and evaluation of novel bifunctional iron-chelators as potential agents for neuroprotection in Alzheimer's, Parkinson's, and other neurodegenerative diseases. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 13(3), 773–783. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.10.037>

## References

Chen, C., Yang, X., Fang, H., & Hou, X. (2019). Design, synthesis and preliminary bioactivity evaluations of 8-hydroxyquinoline derivatives as matrix metalloproteinase (MMP) inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*, 181, 111563. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111563>

Conan, P., Léon, A., Gourdel, M., Rollet, C., Chair, L., Caroff, N., Le Goux, N., Le Jossic-Corcos, C., Sinane, M., Gentile, L., Maillebois, L., Loaec, N., Martin, J., Vialre, M., Corcos, L., Mignen, O., Croyal, M., Voisset, C., Bihel, F., & Friocourt, G. (2022). Identification of 8-Hydroxyquinoline Derivatives That Decrease Cystathionine Beta Synthase (CBS) Activity. *International journal of molecular sciences*, 23(12), 6769. <https://doi.org/10.3390/ijms23126769>

Cui, Y., Vogt, S., Olson, N., Glass, A.G., & Rohan, T.E. (2007). Levels of zinc, selenium, calcium, and iron in benign breast tissue and risk of subsequent breast cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored*

*by the American Society of Preventive Oncology*, 16(8), 1682–1685. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-07-0187>

Dai, Q., Motley, S.S., Smith, J.A. Jr, Concepcion, R., Barocas, D., Byerly, S., & Fowke, J.H. (2011). Blood magnesium, and the interaction with calcium, on the risk of high-grade prostate cancer. *PloS one*, 6(4), e18237. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018237>

Gumienna-Kontecka, E., Nurchi, V.M., Szebesczyk, A., Bilska, P., Krzywoszynska, K., & Kozłowski, H. (2013). Chelating agents as tools for the treatment of metal overload. *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie*, 639, 1321–1331. <https://doi.org/10.1002/zaac.201300064>

Gupta, R., Luxami, V., & Paul, K. (2021). Insights of 8-hydroxyquinolines: A novel target in medicinal chemistry. *Bioorganic chemistry*, 108, 104633. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104633>

Heiskanen, J.P., Omar, W.A.E., Ylikunnari, M.K., Haavisto, K.M., Juan, M.J., & Hormi O.E.O. (2007). Synthesis of 4-Alkoxy-8-hydroxyquinolines. *The Journal of Organic Chemistry*, 72(3), 920–922. <https://doi.org/10.1021/jo062175i>

Hu, H., Xu, Q., Mo, Z., Hu, X., He, Q., Zhang, Z., & Xu, Z. (2022). New anti-cancer explorations based on metal ions. *Journal of nanobiotechnology*, 20(1), 457. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01661-w>

Jacobsen, J.A., Fullagar, J.L., Miller, M.T., & Cohen, S.M. (2011). Identifying chelators for metalloprotein inhibitors using a fragment-based approach. *Journal of medicinal chemistry*, 54(2), 591–602. <https://doi.org/10.1021/jm101266s>

Liu, Y., Wang, Y., Song, S., & Zhang, H. (2021). Cancer therapeutic strategies based on metal ions. *Chemical science*, 12(37), 12234–12247. <https://doi.org/10.1039/d1sc03516a>

Monzon, L.M.A., Burke, F., & Coey, J.M.D. (2011). Optical, Magnetic, Electrochemical, and Electrical Properties of 8-Hydroxyquinoline-Based Complexes with  $Al^{3+}$ ,  $Cr^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , and  $Zn^{2+}$ . *The Journal of Physical Chemistry C*, 115(18), 9182–9192. <https://doi.org/10.1021/jp201019c>

Park, S.-Y., Ghosh, P., Park, S.O., Lee, Y.M., Kwak, S.K., & Kwon, O.-H. (2016). Origin of ultraweak fluorescence of 8-hydroxyquinoline in water: photoinduced ultrafast proton transfer. *RSC Advanced*, 6, 9812–9821. <https://doi.org/10.1039/C5RA23802A>

Pulukuri, S.M., Gondi, C.S., Lakka, S.S., Jutla, A., Estes, N., Gujrati, M., & Rao, J.S. (2020). Retraction: RNA interference-directed knockdown of urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor inhibits prostate cancer cell invasion, survival, and tumorigenicity in vivo. *The Journal of biological chemistry*, 295(37), 13136. <https://doi.org/10.1074/jbc.RX120.015588>

Rohini, Paul K., & Luxami, V. (2020). 8-Hydroxyquinoline Fluorophore for Sensing of Metal Ions and Anions. *Chemical record*, 20(12), 1430–1473. <https://doi.org/10.1002/tcr.202000082>

Rusch, P., Hirner, A.V., Schmitz, O., Kimmig, R., Hoffmann, O., & Diel, M. (2021). Zinc distribution within breast cancer tissue of different intrinsic subtypes. *Archives of gynecology and obstetrics*, 303(1), 195–205. <https://doi.org/10.1007/s00404-020-05789-8>

Shoji, E., Miyatake, K., Hlil, A., Hay, A., Maindrone, T., Jousseau, V., Dodelet, J., Tao, Y., & D'Iorio, M. (2003). Immiscible polymers in double spin-coated electroluminescent devices containing phenyl-substituted Tris (8-Hydroxyquinoline) aluminum derivatives soluble in a host polymer. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 41, 3006–3016. <https://doi.org/10.1002/pola.10883>

To, P.K., Do, M.H., Cho, J.H., & Jung, C. (2020). Growth Modulatory Role of Zinc in Prostate Cancer and Application to Cancer Therapeutics. *International journal of molecular sciences*, 21(8), 2991. <https://doi.org/10.3390/ijms21082991>

Xue, Y.N., Yu, B.B., Liu, Y.N., Guo, R., Li, J.L., Zhang, L.C., Su, J., Sun, L.K., & Li, Y. (2019). Zinc promotes prostate cancer cell chemosensitivity to paclitaxel by inhibiting epithelial-mesenchymal transition and inducing apoptosis. *The Prostate*, 79(6), 647–656. <https://doi.org/10.1002/pros.23772>

Zhao, J., Wu, Q., Hu, X., Dong, X., Wang, L., Liu, Q., Long, Z., & Li, L. (2016). Comparative study of serum zinc concentrations in benign and malignant prostate disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Scientific reports*, 6, 25778. <https://doi.org/10.1038/srep25778>

Zheng, H., Weiner, L.M., Bar-Am, O., Epsztejn, S., Cabantchik, Z.I., Warshawsky, A., Youdim, M.B., & Fridkin, M. (2005). Design, synthesis, and evaluation of novel bifunctional iron-chelators as potential agents for neuroprotection in Alzheimer's, Parkinson's, and other neurodegenerative diseases. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 13(3), 773–783. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.10.037>

Отримано редакцією журналу / Received: 31.08.23  
Прорецензовано / Revised: 31.08.23  
Схвалено до друку / Accepted: 29.09.23

Pavlo VIRYCH<sup>1</sup>, PhD (Biol.), Researcher  
ORCID ID: 0000-0002-1463-1992  
e-mail: pavlo.virych@knu.ua

Vitaliy SMOKAL<sup>1</sup>, PhD (Chem.), Senior Researcher  
ORCID ID: 0000-0001-6832-8625  
e-mail: vitalii.smokal@knu.ua

Oksana KHARCHENKO<sup>1</sup>, PhD (Chem.), Researcher  
ORCID ID: 0000-0001-6900-514X  
e-mail: oksana\_kharchenko@ukr.net

Natalia KUTSEVOL<sup>1</sup>, DSc (Chem.), Leading Researcher  
ORCID ID: 0000-0002-1468-4111  
e-mail: nataliya.kutsevol@knu.ua

Petro VIRYCH<sup>2</sup>, PhD Student  
ORCID ID: 0000-0001-6201-3892  
e-mail: anabenas@gmail.com

<sup>1</sup>Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

<sup>2</sup>R.E. Kavetsky Institute for Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, Kyiv, Ukraine

### CHELATION OF DIVALENT CATIONS AND ANTI-CANCER ACTIVITY OF 8-HYDROXYSTYRYLQUINOLINE DERIVATIVES IN VITRO

**Background.** The search for new methods of cancer treatment and diagnosis are important. The disadvantages of chemotherapy drugs are the rapid acquisition of resistance and high toxicity. 8-hydroxyquinoline derivatives have a wide spectrum of biological activity and have the necessary properties for fluorescent cancer diagnosis. The aim of the study was to determine the chelation of calcium, magnesium and zinc cations by hydrophobic derivatives of 8-hydroxystyrylquinolines (8HQ) 2-(4-chlorostyryl)quinolin-8-ol (STQ-Cl) and 2-(4-nitrostyryl)quinolin-8-ol (STQ-NO<sub>2</sub>) in physiological solution, the stability of the complexes and the cytotoxicity of the compounds to prostate and breast cancer cell lines in vitro.

**Methods.** 8HQ derivatives STQ-Cl and STQ-NO<sub>2</sub> were used. Solutions of Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> cations were prepared by the method of two-fold dilutions in 0.5-0.0078125 mM concentration range based on 0.9 % NaCl. Both individual solutions of each cation and a mixture in an equivalent molar ratio were used. The concentration of 8HQ derivatives were 0.05 mM. Optical absorption was registered in 200-700 nm wavelength range. Cytotoxicity was investigated on breast (MDA-MB-231) and prostate (DU-145) cancer cell lines. STQ-Cl and STQ-NO<sub>2</sub> derivatives in DMSO were added to the incubation solution by four-fold dilutions (0.125–0.00003 mM). For luminescence studies, MDA-MB-231 and DU-145 cells were grown on coverslips. The final concentration of 8HQ derivatives were 5 mM. Cells were kept for 5, 10, 20 and 30 min. Luminescence was recorded under the same conditions for all samples, with an exposure time of 10 ms.

**Results.** Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> (0.03125 mM) were contributed to reduce the intensity of optical absorption maxima of STQ-Cl by 1.6 and 1.3 times, respectively. The effect was most pronounced at 0.015625 mM Zn<sup>2+</sup>. Weak differences in the optical absorption of solutions were detected when STQ-NO<sub>2</sub> was incubated with different concentrations of Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>. The optical absorption intensity of the STQ-NO<sub>2</sub> aqueous solution was increased at 0.015625 and 0.03125 mM Zn<sup>2+</sup>. The maximum cytotoxicity against MDA-MB-231 cells for STQ-Cl was about 80 %, and STQ-NO<sub>2</sub> was 60 % at 0.04 mM Zn<sup>2+</sup>. DU-145 cells were more sensitive to STQ-NO<sub>2</sub> (EC<sub>50</sub> = 0.011 mM), but weakly sensitive to STQ-Cl (50 % at 0.125 mM). The maximum luminescence intensity was after 20 min of incubation with STQ-Cl and STQ-NO<sub>2</sub> (5 mM) for both cells lines and was not change over time.

**Conclusions.** The decrease of optical absorption maxima of STQ-Cl aqueous solutions in the presence of magnesium, calcium, and zinc cations was a consequence of aggregation processes. This phenomenon was probably the reason for the different cytotoxicity of STQ-Cl and STQ-NO<sub>2</sub>, as well as the presence of other mechanisms of action to cancer cells. Results was a consequence of different affinity of 8-hydroxyquinoline derivatives to magnesium, calcium and zinc cations, solubility in water, stability, aggregation of metal complexes and free compounds.

**Keywords:** 8-hydroxystyrylquinolines, zinc, magnesium, calcium, cytotoxicity, anticancer.

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів. Спонсори не брали участі в розробленні дослідження; у зборі, аналізі чи інтерпретації даних; у написанні рукопису; в рішенні про публікацію результатів.

The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; in the decision to publish the results.



UDC581.5;582.091;582.095  
DOI: 10.17721/1728.2748.2023.94.23-27

Nataliia NUZHYNIA, PhD (Biol.)  
ORCID ID: 0000-0002-4404-4502  
e-mail: nuzhynan@gmail.com  
Taras Shevchenko Kyiv National University, Kyiv, Ukraine

Iryna IVANOVA, Leading Biologist  
e-mail: ivanova\_irinka@ukr.net  
Taras Shevchenko Kyiv National University, Kyiv, Ukraine

## DROUGHT RESISTANCE MONITORING OF INTRODUCED TALL TREES SPECIES UNDER CHANGED URBAN CLIMATIC CONDITIONS

**Background.** Landscaping of urban environments significantly mitigates the negative effects of "urban heat islands", which in turn has a positive effect on many aspects of human life. Therefore, the purpose of our research was to identify drought-tolerant rare and decorative species of woody plants with further recommendation for their inclusion in the ecosystems of the urban environment.

**Methods.** For research, we selected from the collections of the Botanical Garden named after acad. O.V. Fomina 25 highly decorative species of trees with a height from 10 to 50 m, which come from temperate and continental climate zones. Among them, 14 species are uncommon and 11 species are widespread in mass culture in the Polissia and Forest-Steppe zone of Ukraine. The drought resistance test was conducted twice: in early June and also in early September. Relative drought resistance was assessed by following parameters: tissue hydration and water loss per unit time.

**Results.** According to the results of the study, most of the 25 species of tall trees showed a high or average level of drought resistance. The most drought-resistant light-loving and shade-tolerant species were recommended. Species that may require additional care during cultivation (*Phelodendron amurense* and *Styphnolobium japonicum*) have been identified, which must be taken into account when landscaping urban areas.

**Conclusions.** Among shade-tolerant trees, the following species can be recommended for cultivation in urban conditions as highly drought-resistant: *Acer mandshuricum*, *Acer velutinum*, *Corylus colurna* and *Prunus padus*. The following light-loving plants turned out to be the most drought-resistant: *Liriodendron chinense*, *Ginkgo biloba*, *Acer saccharinum*, *Catalpa bignonioides*, *Catalpa fargesii* and *Tilia europea*.

**Keywords:** drought resistance, landscaping of cities, rare plants.

### Background

The importance of increasing and expanding the area of green spaces in cities in order to reduce the effects of "urban heat islands" in the summer, as well as to improve the comfort, health and safety of local communities, is emphasized by scientists from different countries (Keenan et al., 2016; Zhao et al., 2018; Branas et al., 2018). Planting trees contributes to the cooling of the earth's surface and the air, the air is saturated with O<sub>2</sub> and purified from harmful substances, phytoremediation and protection of the soil from degradation is observed (Önder & Akay, 2014). The selection of drought-resistant plants for landscaping increases their viability in urban conditions, and also has a positive economic effect, as it reduces the costs of their maintenance. The selection of rare, uncommon drought-resistant species will not only allow recommending new plants for landscaping urban environments, but will also contribute to the preservation of phytodiversity, which is prescribed in the "National Strategy of the State Environmental Policy of Ukraine".

Global climate change is often accompanied by sudden changes in temperature, a significant increase in precipitation in some regions, and increased drought in others. According to the latest forecasts, such phenomena will occur more often and will be more extreme (Allen et al., 2010; Reyer et al., 2015). Such climatic changes in some places reduce the viability of some native plants, but, on the other hand, there is an opportunity to grow plants from temperate climate zones, which are not yet widely cultivated in Ukraine. Unfortunately, similar problems are currently present all over the world (Lanza & Stone, 2016; Kannenberg et al., 2019). So, for example, Lanza K. and co-authors studied the historical range of distribution of tree species in the United States in view of the migration of winter hardiness

zones to the north with climate change (Lanza & Stone, 2016). The goal of their work was to identify tree species that are likely to remain well adapted to urban climates in the future. Under urbanized conditions complicated by climate change, the survival of plant species depends on the complex of their adaptations. However, until recently, agricultural plants (corn, wheat, soy, some fruit trees, etc.) were the objects of study of the mechanisms of resistance to the effects of, in particular, drought (Zandalinas et al., 2016; Hasanuzzaman et al., 2019; Hussain et al., 2019).

In this regard, the aim of the work was to identify and research the most promising drought-tolerant rare and decorative species of woody plants from the collection of the Botanical Garden named after Acad. O.V. Fomina with a further recommendation to include them in the ecosystems of the urban environment.

### Methods

For research, we selected from the collections of the Botanical Garden named after Acad. O.V. Fomina 25 highly decorative species of woody plants with a height from 10 to 50 m. Kyiv is located in the North of Ukraine, on the border between Polissia and Forest Steppe; the climate of the capital is defined as moderately continental, with mild winters and warm summers (Climate of Kyiv, 2010). Among the introduced species selected by us, there were 14, which originate from the zones of temperate and continental climates, are not common in culture in the Polissia and Forest-Steppe zones of Ukraine (*Acer mandshuricum* Maxim., *Acer velutinum* Boiss., *Castanea sativa* Mill., *Catalpa bignonioides* Walter, *Catalpa fargesii* Bureau, *Fagus orientalis* Lipsky, *Ginkgo biloba* L., *Juglans nigra* L., *Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg., *Parrotia persica* C.A. Mey., *Paulownia tomentosa* Steud., *Platanus × hispanica*

Mill. Ex Münchh., *Pterocarya pterocarpa* Kunth ex I.Iljinsk., *Styphnolobium japonicum* (L.) Schott).

As well as 11 introduced and native species that come from temperate and continental climate zones, widely distributed in mass culture in the Polissia and Forest-Steppe zone of Ukraine (*Acer saccharinum* L., *Aesculus × carnea* Zeyh., *Aesculus hippocastanum* L., *Corylus columna* L., *Fagus sylvatica* L., *Phelodendron amurense* Rupr., *Prunus padus* L., *Quercus rubra* L., *Robinia pseudoacacia* L., *Tilia europea* L., *Tilia platyphyllos* Scop.).

In addition to being highly decorative, most of the species we have chosen are rare and endangered. Such species as: *Acer mandshuricum*, *Castanea sativa*, *Corylus columna*, *Fagus orientalis*, *Fagus sylvatica*, *Juglans nigra*, *Prunus padus*, *Quercus rubra* have the degree of rarity LC; *Aesculus hippocastanum* – Vul, *Catalpa bignonioides* – DD, *Ginkgo biloba* – Enand *Liriodendron chinense* – NT. The degree of rarity of plant species is established according to iucnredlist.org, version 2021-2.

The staff of the Botanical Garden conducted long-term visual observations of the woody plants used in this study. These plants proved to be hardy in our climate. However, growing in garden collections involves additional care, which is often absent in urban landscaping. Therefore, we conducted additional studies of relative drought resistance indicators in order to select the most hardy species for cultivation in the urban environment.

The test on drought resistance was carried out twice: in early June, when the temperatures are already high, but the

leaves on the trees are still young, and also in early September, when the temperatures are still high, the amount of precipitation is low, but the leaves have already acquired all characteristics of their species.

The winter of 2022 in Kyiv had little snow, the spring and summer of 2022 were very dry, according to the observations of the weather station Boris Sresnevsky Central Geophysical Observatory (<https://www.cgo-sresnevskyi.kyiv.ua>). Spring started a month earlier. The spring months, except for March, were colder than the climatic norm, and the amount of precipitation in the capital during the spring was 87 mm, which is 59 % of the climatic norm. The spring of 2022 was among the ten driest from 1855. The average air temperature in summer in Kyiv was +21.6 °C. This exceeded the climatic norm by 1.2 °C. According to the amount of precipitation, the summer in Kyiv was among the twenty driest since 1891. Such weather conditions contributed to conducting research on drought resistance.

Relative drought resistance was assessed by measuring the following parameters of the water regime: leaf water content (WC) and water loss per unit time (WL) ( $n = 6$  for the species) and based on the relative drought resistance assessment scale (Table 1):

$WC = (a - b) / a \times 100$ , where WC – leaf water content, %; a – weight of wet raw, g; b – weight of dry raw, g;

$WL = (M1 - M2) / M3 \times 100$ , where WL – water loss in 1 h of wilting, %; M1 – mass of leaves before wilting, g; M2 – mass of leaves after 2 or 4 h of wilting, g; M3 – weight of dry raw, g.

Table 1

Rating scale of water regime parameters  
for determining relative drought resistance

| Assessment<br>of drought resistance | WC, %       | WL, %       |
|-------------------------------------|-------------|-------------|
| Low                                 | 59,9 and <  | 11,1 and >  |
| Average                             | 60,0 – 69,9 | 10,1 – 11,0 |
| High                                | 70,0 and >  | to 10,0     |

Statistical processing of the results was done using the Prism Graphpad 8 program (GraphPad; La Jolla, CA, USA). The values for different groups were compared by ANOVA followed by Tukey's multiply comparison test. Tree species were compared with each other, as well as the June group with the group studied in September.

## Results

One of the relative indicators of drought resistance is leaf water content (Fig. 1). *Liriodendron chinense*, *Aesculus hippocastanum* and *Ginkgo biloba* are the most drought-resistant species according to this indicator among large trees both in spring and in early autumn. Increased water content indicates the presence in the leaves of a sufficient supply of water for the vital activity of plants in case of dry conditions. Also, a high rate of water was found in early June in young leaves of *Acer saccharinum*, *Aesculus × carnea*, *Acer velutinum*, *Catalpa bignonioides*, *Catalpa fargesii*, *Juglans nigra*,

*Paulownia tomentosa*, *Phelodendron amurense*, *Styphnolobium japonicum*, *Tilia europea*. This indicator is especially important for young leaves, since they often have not yet acquired all the inherent xerophytic features.

A low rate of water content in both summer and autumn leaves was found in *Castanea sativa*, *Fagus orientalis*, *Fagus sylvatica*, *Parrotia persica*, *Prunus padus*, *Quercus rubra*.

*Acer mandshuricum*, *Corylus columna*, *Platanus × hispanica*, *Pterocarya pterocarpa* and *Robinia pseudoacacia* showed a low level of water content of autumn tree leaves. All other studied plants were characterized by the average values of this indicator. In general, leaf water content at the beginning of summer was significantly higher than at the beginning of autumn in all studied species. A similar pattern was also observed for trees up to 10 m tall and bushes (Nuzhyna et al., 2022).

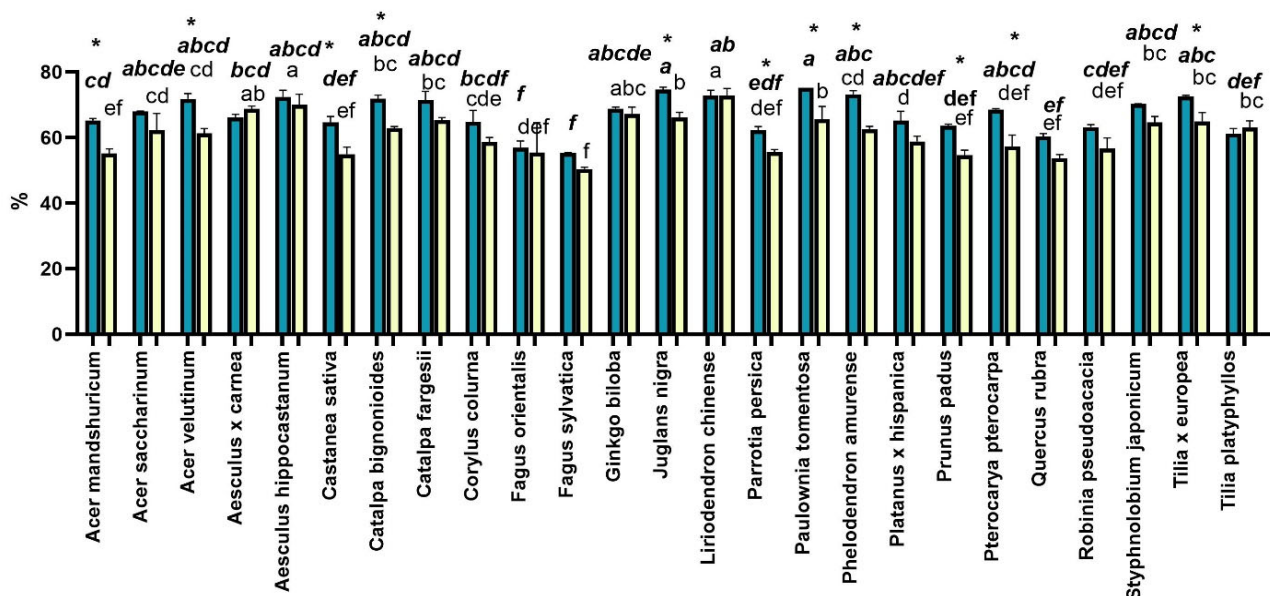


Fig. 1. Index of leaf water content (where, dark color is the value obtained in June; light color is the value obtained in September) \* –  $P \leq 0.01$  significant difference, compared to the September group; identical letters in bold italics indicate no significant difference between species examined in June; same letters in regular font indicate no significant difference between different species examined in September

The water-holding capacity is characterized by the loss of water in 1 hour of wilting, this indicator was small for most of the studied species of tall trees, which is indirectly a sign of high drought resistance of plants (Fig. 2). Only such species as: *Aesculus hippocastanum* and *Phelodendron amurense* showed a large loss of water per unit time of wilting in the spring along with a small loss in the fall, which

is probably related to the slower formation of immature leaves and requires especially careful care for young seedlings in the spring. Along with this, *Aesculus x carnea* and *Juglans nigra* showed an average level of drought resistance in autumn according to the water retention index. *Styphnolobium japonicum* had rather low indicators of relative drought resistance in both autumn and spring.

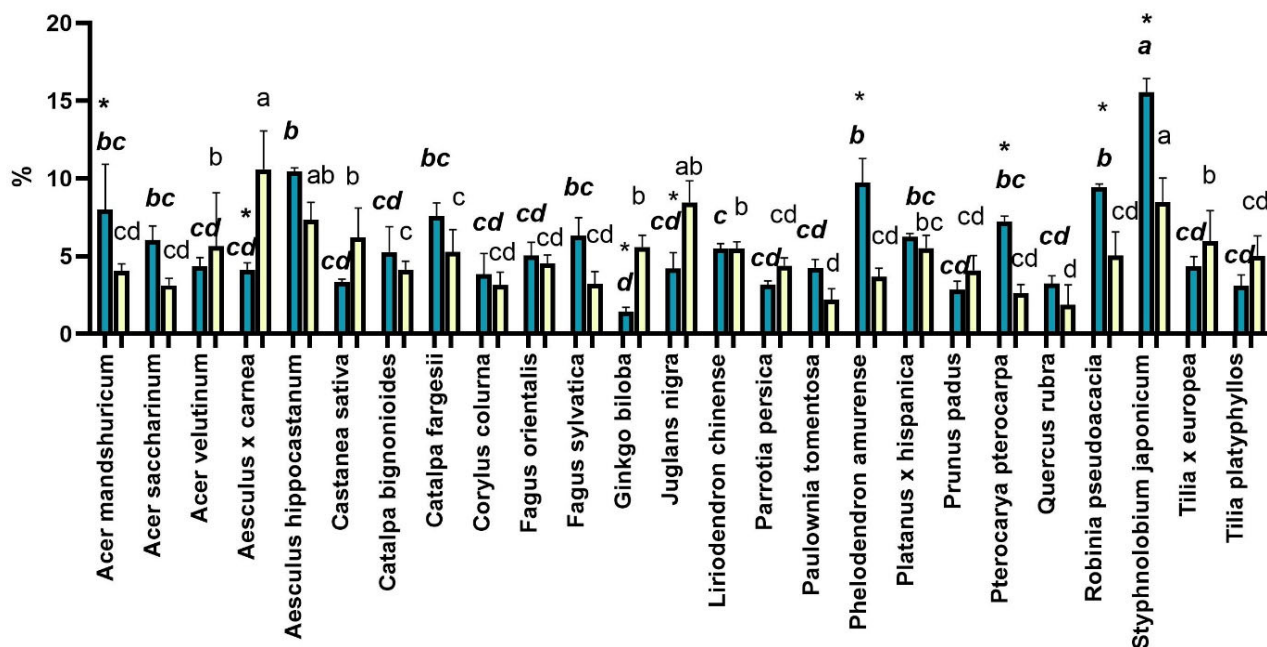


Fig. 2. Index of leaf water loss in 1 h of wilting (where, dark color is the value obtained in June; light color is the value obtained in September); \* –  $P \leq 0.01$  significant difference, compared to the September group; identical letters in bold italics indicate no significant difference between species examined in June; same letters in regular font indicate no significant difference between different species examined in September

*Castanea sativa*, *Fagus orientalis*, *Fagus sylvatica*, *Parrotia persica*, *Prunus padus*, and *Quercus rubra* showed a lower relative drought resistance according to the leaf water content, but a high water-holding capacity. That is, the adaptation to arid conditions in these species is not aimed at the accumulation of water in the leaf, but at the development of the covering tissues of the leaf plate, with the aim of reducing water evaporation.

Most species showed an increase in drought resistance as measured by water loss in September compared to early June, possibly due to the appearance of xerophytic traits in older leaves. When growing these plants, it is especially important to increase watering in the spring for young seedlings.

### Discussion and conclusions

Adaptation to drought is characterized by such anatomical and morphological features as leaf thickness, cuticular cover, number of stomata, root morphology, etc. It is the first three signs that affect the measured indicators of relative drought resistance. Also, adaptation at other levels are analyzed. Thus, although *Fagus sylvatica* and *Quercus robur* are close representatives of the same family, they adapt to arid conditions in different ways (Roman et al., 2015). Beech has a shallow root system, while oak has a deep root system, which allows efficient use of groundwater (Leuschner & Meier, 2018). Based on the results of the relative drought resistance indicators, the beeches and oaks studied by us did not reliably differ from each other, only a slight tendency towards greater drought resistance of *Quercus rubra* was observed. It should be noted that the condition of the root system is difficult to assess when growing in urban conditions, since in cities, as a rule, the growth of the root system is limited to roadways, foundations, pipelines, etc. That is why it is difficult to extrapolate the structure of the root system characteristic of the species to plants grown in the city.

Another way to withstand drought is leaf shedding, which is regulated by various phytohormones. Breeders have created polyploid poplars, which in drought conditions shed leaves similar to plants from dry tropical forests, which increased the survival of such poplars during extreme drought (Hennig et al., 2015). A similar property was found in *Liriodendron chinense*, *Acer velutinum*, *Platanus hispanica*, *Prunus padus*, *Styphnolobium japonicum*, which is an additional protection of the plant against adverse conditions.

When creating landscape compositions, it is also necessary to take into account the relationship of plants to the intensity of lighting. According to Kolisnichenko, among the studied species, the following are shade-tolerant: *Acer mandshuricum*, *Acer velutinum*, *Corylus colurna*, *Fagus orientalis*, *Fagus sylvatica*, *Parrotia persica*, *Phelodendron amurense* and *Prunus padus* (Kolisnichenko, 2004). Since growth in shaded conditions generally involves less drying of the soil, it is possible that this may explain the lower drought tolerance of most of these species. Thus, among shade-tolerant trees, the following species can be recommended for cultivation in urban conditions as highly drought-resistant: *Acer mandshuricum*, *Acer velutinum*, *Corylus colurna* and *Prunus padus*. Growing *Phelodendron amurense* will require additional watering, which is not economically beneficial, and insufficient soil moisture is stressful for plants, which in turn increases the possibility of various diseases.

Among light-loving plants, almost all plants showed a high or medium level of drought resistance, only

*Styphnolobium japonicum* showed a low water-holding capacity. The following light-loving plants turned out to be the most drought-resistant: *Liriodendron chinense*, *Ginkgo biloba*, *Acer saccharinum*, *Catalpa bignonioides*, *Catalpa fargesii* and *Tilia europea*.

According to the results of the study, most of the 27 species of tall trees showed a high or average level of drought resistance. Only *Phelodendron amurense* and *Styphnolobium japonicum* were characterized by a low level of drought resistance according to the measured parameters. Therefore, these species cannot be recommended for landscaping urban areas.

**Authors' contributions:** Natalia Nuzhyna conceived of the research idea, performed statistical analyses, wrote the paper; Natalia Nuzhyna and Iryna Ivanova collected data and discussed the results.

**Acknowledgments, sources of funding.** The research was carried out with the support of the Ministry of Education and Science of Ukraine, scientific direction "Biology and health care".

### References

- Allen, C.D., Macalady, A.K., Chenchouni, H., Bachelet, D., McDowell, N., Vennetier, M. et al. (2010). A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecol. Manag.*, 259, 660–684. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2009.09.001>
- Branas, C.C., South, E., Kondo, M.C., Hohl, B., Bourgois, Ph., Wiebe, D.J., & MacDonald, J.M. (2018). Citywide cluster randomized trial to restore blighted vacant land and its effects on violence, crime, and fear. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 115(12), 2946–2951. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718503115>
- Hasanuzzaman, M., Fujita, M., Nahar, K., & Biswas, J.K. (2019). Advances in rice research for abiotic stress tolerance. *Woodhead publishing*, 988. <https://doi.org/10.1016/C2017-0-01486-6>
- Hennig, A., Kleinschmit, J.R., Schoneberg, S., Löffler, S., Janßen, A., & Polle, A. (2015). Water consumption and biomass production of protoplast fusion lines of poplar hybrids under drought stress. *Front. Plant Sci.*, 6, 330. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00330>
- Hussain, H.A., Men, S., Hussain, S., Chen, Y., Ali, Sh., Zhang, S., Zhang, K., Li, Y., Xu, Q., Liao, Ch., & Wang, L. (2019). Interactive effects of drought and heat stresses on morphophysiological attributes, yield, nutrient uptake and oxidative status in maize hybrids. *Scientific Reports*, 9, 3890. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40362-7>
- Kannenber, S.A., Maxwell, J.T., Pederson, N., D'Orangeville, L., Ficklin, D.L., & Phillips, R.P. (2019). Drought legacies are dependent on water table depth, wood anatomy and drought timing across the eastern US. *Ecol. Lett.*, 22(1), 119–127. <https://doi.org/10.1111/ele.13173>
- Keenan, T.F., Prentice, I.C., Canadell, J.G., Williams, Ch.A., Wang, H., Raupach, M., & Collatz, G.J. (2016). Recent pause in the growth rate of atmospheric CO<sub>2</sub> due to enhanced terrestrial carbon uptake. *Nat. Commun.*, 7, 13428. <https://doi.org/10.1038/ncomms13428>
- Kolisnichenko, O.M. (2004). *Seasonal biorhythms and winter stability of woody plants*. Fitosotsiotsentr, 176 [in Ukrainian]. [Колісниченко О.М. (2004). *Сезонні біоритми і зимостійкість деревних рослин*. Фітоцентр, 176].
- Lanza, K., & Stone, B. (2016). Climate adaptation in cities: What trees are suitable for urban heat management. *Landscape and Urban Planning*, 153, 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2015.12.002>
- Leuschner, C., & Meier, I.C. (2018). The ecology of Central European tree species: Trait spectra, functional trade-offs, and ecological classification of adult trees. *Perspect. Plant Ecol. Syst.*, 33, 89–103. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2018.05.003>
- Nuzhyna, N.V., Ivanova, I.Yu., Hrytsak, L.R., & Drobyk, N.M. (2022). Drought-resistant species of trees and bushes are an important link for reducing the negative effects of "urban heat islands". *Scientific notes of Volodymyr Ternopil National Pedagogical University Hnatyuk, Series "Biology"*, 83(3), 37–43. <https://doi.org/10.25128/2078-2357.22.3.6> [in Ukrainian]
- Нужина, Н.В., Іванова, І.Ю., Грицак, Л.Р., & Дробик, Н.М. (2022). Посухостійкі види дерев та кущів – важлива ланка для зменшення негативних ефектів "міських островів тепла". *Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія "Біологія"*, 83(3), 37–43. <https://doi.org/10.25128/2078-2357.22.3.6>
- Osadchyi, V.I., Kosovets, O.O., & Babichenko, V.M. (Ed.). (2010). *Climate of Kyiv*. Nika-Tsentr, 320 p. [in Ukrainian]. [Осадчий, В.І., Косовець, О.О., & Бабіченко В.М. (Ред.). (2010). *Клімат Києва*. Ніка-Центр, 320 с.]
- Önder, S., & Akay, A. (2014). The roles of plants on mitigating the urban heat islands' negative effects. *International Journal of Agriculture and Economic Development*, 2(2), 18–32.
- Reyer, C.P.O., Brouwers, N., Rammig, A., Brook, B.W., Epila, J., Grant, R.F. et al. (2015). Forest resilience and tipping points at different spatio-temporal



scales: approaches and challenges. *J. Ecol.*, 103, 5–15. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12337>

Roman, D.T., Novick, K.A., Brzostek, E.R., Dragoni, D., Rahman, F., & Phillips, R.P. (2015). The role of isohydric and anisohydric species in determining ecosystem-scale response to severe drought. *Oecologia*, 179, 641–654. <https://doi.org/10.1007/s00442-015-3380-9>

Zandalinas, S.I., Rivero, R.M., Martínez, V., Gómez-Cadenas, A., & Arbona, V. (2016). Tolerance of citrus plants to the combination of high temperatures and drought is associated to the increase in transpiration

modulated by a reduction in abscisic acid levels. *BMC Plant Biology*, 16, 105. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0791-7>

Zhao, L., Oppenheimer, M., Zhu, Q., Baldwin, J.W., Ebi, K.L., Bou-Zeid, E., Guan, K., & Liu, X. (2018). Interactions between urban heat islands and heat waves. *Environ. Res. Lett.*, 13, 034003. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/aa9f73>

Отримано редакцією журналу / Received: 01.09.23

Прорецензовано / Revised: 01.09.23

Схвалено до друку / Accepted: 02.10.23

Наталія НУЖИНА, канд. біол. наук

ORCID ID: 0000-0002-4404-4502

e-mail: nuzhynan@gmail.com

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

Ірина ІВАНОВА, провід. біолог

e-mail: ivanova\_irinka@ukr.net

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

## МОНІТОРИНГ ПОСУХОСТІЙКОСТІ ІНТРОДУКОВАНИХ ВИДІВ ВИСОКОРОСЛИХ ДЕРЕВ ПІСЛЯ ЗМІНИ КЛІМАТИЧНИХ УМОВ УРБОПРОСТОРІВ

**Вступ.** Озеленення урбанізованих середовищ значно пом'якшує негативні ефекти "міських островів тепла", що, у свою чергу, позитивно впливає на багато аспектів життя людини. Тому метою дослідження було виявити посухотолерантні рідкісні та декоративні види деревних рослин з подальшою рекомендацією присаднання їх до екосистеми урбанізованого середовища.

**Методи.** Для дослідження було відібрано з колекцій Ботанічного саду ім. акад. О.В. Фоміна 25 високодекоративних видів деревних рослин висотою від 10 до 50 м, які походять із зон помірного та континентального клімату. Серед них 14 видів є малопоширеними та 11 видів істотно поширені в масовій культурі в зоні Полісся і Лісостепу України. Дослід на посухостійкість проводили двічі: на початку червня, а також на початку вересня. Оцінювання відносної посухостійкості проводили за такими параметрами: оводненість тканин і втрату води за одиницю часу.

**Результати.** За результатами дослідження більшість з 25 видів високорослих дерев показали високий або середній рівень посухостійкості. Було рекомендовано найбільш посухостійкі світлолюбні та тіньовитривалі види. Виявлено види, що можуть потребувати додаткового догляду під час вирощування (*Phelodendron amurense* та *Styrphnolobium japonicum*), що потрібно враховувати під час озеленення міських територій.

**Висновки.** Серед тіньовитривалих дерев для вирощування в міських умовах як високодекоративні до посухи можна рекомендувати такі види: *Acer mandshuricum*, *Acer velutinum*, *Corylus colurna* та *Prunus padus*. Найбільш посухостійкими виявилися світлолюбні рослини: *Liriodendron chinense*, *Ginkgo biloba*, *Acer saccharinum*, *Catalpa bignonioides*, *Catalpa fargesii* та *Tilia europaea*.

**Ключові слова:** посухостійкість, озеленення міст, рідкісні рослини.

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів. Спонсори не брали участі в розробленні дослідження; у зборі, аналізі чи інтерпретації даних; у написанні рукопису; в рішенні про публікацію результатів.

The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; in the decision to publish the results.

УДК 616-002-008.953-092; 616.831;571.27  
DOI: 10.17721/1728.2748.2023.94.28-34

Анастасія НЕФЬОДОВА<sup>1</sup>, асп.  
ORCID ID: 0000-0003-3440-3687  
e-mail: nefodova.av@gmail.com

Марія РУДИК<sup>1</sup>, канд. біол. наук  
ORCID ID: 0000-0003-1252-885X  
e-mail: rudyk\_marie@knu.ua

Роман ДОВГИЙ<sup>1</sup>, канд. біол. наук  
ORCID ID: 0000-0003-1189-4479  
e-mail: romandovgiy@gmail.com

Лариса СКІВКА<sup>1</sup>, д-р біол. наук, проф.  
ORCID ID: 0000-0002-2171-1085  
e-mail: realmed@ukr.net

<sup>1</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

## ПОПУЛЯЦІЙНИЙ СКЛАД ЛЕЙКОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ У ЩУРІВ З РІЗНИМИ МОДЕЛЯМИ ХВОРОБИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

**Вступ.** Системне запалення визнано однією з основних ознак хвороби Альцгеймера (ХА) – нейродегенеративного розладу, що характеризується зниженням когнітивних функцій, прогресуючою втратою пам'яті та вражає мільйони людей переважно похилого віку. Літературні дані останніх років свідчать про участь периферичних імунних клітин в ініціюванні та прогресуванні захворювання. Проте популяційний склад лейкоцитів у периферичній крові та його вплив на прогресування захворювання залишаються не до кінця вивченими. Використання тваринних моделей має важливе значення для дослідження потенційних механізмів, що лежать в основі зв'язку між периферичною імунною системою та запальними процесами, що лежать в основі нейродегенерації. Метою дослідження було порівняльне оцінювання популяційного складу лейкоцитів у щурів з ХА, індукованою інтрагіпокампарним введенням бета-амілоїду (Аβ) 1–40 та бета-амілоїду 25–35. У дослідженні використовували самців щурів лінії Wistar.

**Методи.** Як контроль використовували інтактних і псевдооперованих тварин. Розвиток захворювання підтверджували оцінюванням когнітивних порушень у поведінковому тесті лабіринт Барнса, а також рівня загибелі дофамінергічних нейронів (ДА). Показники гемограми досліджували на момент завершення експерименту (37 день). Оцінювали абсолютну кількість лейкоцитів, а також абсолютну та відносну кількість лімфоцитів, моноцитів і нейтрофілів.

**Результати.** У тварин з Аβ 1–40-індукованою ХА зареєстровано гранулоцитоз (збільшення абсолютної кількості циркулюючих гранулоцитів у 5 разів). Показники абсолютної і відносної кількості лімфоцитів у цих тварин були знижені порівняно з аналогічними показниками в групах інтактних та хібно оперованих щурів, у середньому в 2,5 раза, показники моноцитів – у середньому в 3 рази. У щурів з Аβ 25–35-індукованою ХА виявлено лейкоцитоз із незначним зменшенням частки лімфоцитів, збільшенням частки моноцитів, у середньому в 2 рази і відсутністю змін у кількості нейтрофілів.

**Висновки.** У тварин з Аβ 1–40-індукованою ХА виявлено гематологічні маркери системного запалення (лейкоцитоз, нейтрофілія, лімфоцитопенія, моноцитопенія). Отримані дані вказують на те, що Аβ 1–40-індукована модель ХА більш адекватно відтворює гематологічні ознаки системного запалення, характерні для пацієнтів з цією патологією.

**Ключові слова:** хвороба Альцгеймера, лейкоцити, запалення, лімфоцити, моноцити, нейтрофіли.

### Вступ

В останні роки демографічна ситуація у високорозвинутих країнах світу рухається в бік старіння населення. Хвороба Альцгеймера є одним із найбільш часто діагностованих випадків нейродегенеративних захворювань людей похилого віку у світі (Alzheimer's Association, 2023). Зараз у світі близько 55 млн людей страждають на ХА, і ця кількість подвоюється кожні 5 років (Twarowski, & Herbert 2023). Передбачається, що до 2050 року кількість хворих зросте приблизно до 152 млн, при цьому найбільше зростання очікується в країнах, що розвиваються (Twarowski, & Herbert 2023). ХА характеризується специфічними патологічними змінами в головному мозку, включаючи накопичення бляшок аномально згорнутого амілоїду-бета (Аβ) та білка Тау, що призводить до дегенерації та загибелі нервових клітин (Villabona-Rueda et al., 2019). Вважається, що системне запалення є невід'ємним компонентом патології ХА (Xie, Van Hoeske, & Vandenbroucke, 2022). За умов тривалого навантаження на імунну систему системне запалення набуває хронічного характеру, підвищуючи ризик розвитку і прогресування ХА. Лейкоцити є основними ефекторами як локального, так і системного запалення (Abbas et al., 2020). Літературні дані вказують на те, що

системне запалення супроводжується виробленням медіаторів, які можуть порушити гематоенцефалічний бар'єр і спровокувати патологію Альцгеймера. Медіатори локального нейрозапалення, яке є типовим для перебігу ХА, у свою чергу, можуть потрапляти в периферичну циркуляцію через послаблений гемато-енцефалічний бар'єр і спричиняти прозапальну активацію циркулюючих лейкоцитів. У такий спосіб формується порочне коло, яке сприяє ініціації і прогресуванню хвороби (Pérez et al., 2021). Точні механізми, що лежать в основі розвитку системного запалення та імунної дисфункції як індукторів нейродегенеративного процесу, залишаються предметом активних дискусій та суперечок.

Лейкограма, яка передбачає оцінювання популяції лейкоцитів (лейкоцитів) та їх субпопуляцій, відіграє вирішальну роль у розумінні імунної відповіді та запальних процесів, пов'язаних з патофізіологією ХА (Garfias et al., 2022). Підвищення загальної кількості лейкоцитів, відоме як лейкоцитоз, зазвичай спостерігається під час системного запалення та вказує на активну імунну відповідь (Saresella, 2020). Диференційний підрахунок лейкоцитів дає змогу краще зрозуміти специфічні зміни в клітинних популяціях, такі як гранулоцитоз (підвищена

кількість гранулоцитів), або моноцитоз (підвищена кількість моноцитів), що може допомогти оцінити тяжкість і прогнозувати прогресування запального процесу (Bennett, 2016).

Численні літературні дані засвідчують, що лейкоцитоз з нейтрофілією за зниженням відносної кількості лімфоцитів всіх популяцій є типовими маркерами прогресуючої ХА й асоціюються з прогресивними когнітивними порушеннями (Unda et al., 2021). Деякі дослідження повідомляють про зниження кількості периферичних нейтрофілів у осіб з ХА порівняно зі здоровими донорами (Huang et al., 2022; D'Andrea, 2016). Посилена міграція та інфільтрація моноцитів у мозок, де вони сприяють нейрозапаленню та очищенню бляшок амілоїду- $\beta$ , може призводити до зменшення кількості циркулюючих моноцитів на периферії (Butovsky, & Weiner, 2018). Зменшення кількості лейкоцитів, що спостерігається при ХА, може відображати порушення рекрутування імунних клітин або зміни в кістковому мозку чи лімфоїдних органах, що призводить до ослаблення імунної відповіді в цілому (Fricker, Ott, & Mahringer 2014). Проте всі автори однастайні в тому, що зміни популяційного складу лейкоцитів в умовах розвитку ХА, включаючи як підвищення, так і зниження певних популяцій, відображають дисрегуляцію імунної системи і відіграють вирішальну роль у патогенезі нейрозапалення та потребують більш ретельного дослідження.

Тваринні моделі дозволяють відтворити основні ознаки ХА, у т. ч., дослідити роль периферичних лейкоцитів у прогресуванні захворювання та отримати уявлення про дисрегуляцію імунітету, асоційовану з розвитком хвороби (Lehmann et al., 2020). Для моделювання ХА зазвичай використовуються генетичні та інтервенційні моделі (Yokoama et al., 2022). Останні засновані на інтрацеребральному веденні бета-амілоїдів. Порівняльне оцінювання відтворення порушень лейкоцитарної формули крові, які є відображенням системного запального процесу, є важливим елементом характеристики їхньої адекватності для дослідження запалення як важливого компонента патофізіології та патогенезу ХА. Для дослідження ми обрали найбільш часто застосовували інтервенційні моделі ХА, засновані на інтрацеребральній інфузії А $\beta$  1–40 та моно/олігомерної форми А $\beta$  25–35 людини. Модель А $\beta$ 1–40 передбачає накопичення пептидів А $\beta$ 1–40, відтворює бета-амілоїдну патологію, що спостерігається у ході клінічного перебігу ХА. Ця модель дозволяє дослідникам вивчати вплив накопичення А $\beta$  на різні аспекти патології захворювання, включаючи його вплив на профіль периферичних лейкоцитів (Zeiss, 2015).

Згідно з літературними даними А $\beta$ 25–35 демонструє токсичні властивості подібно до повнорозмірного бета-амілоїдного білка. Проте А $\beta$ 1–40 більш схильний до агрегації та утворення амілоїдних бляшок порівняно з А $\beta$ 25–35. Обидві моделі відтворюють когнітивні порушення та нейрозапальні реакції, типові для клінічного перебігу ХА (Zambrano et al., 2021). Дані стосовно гематологічних маркерів системного запалення у тварин з інтервенційними моделями ХА в літературі нечисленні (Akhtar et al., 2022).

Імунну відповідь на моделі щурів з AD досліджували (Xie et al., 2013) і виявили збільшення загальної кількості лейкоцитів, включаючи лімфоцити, нейтрофіли та моноцити у периферичній крові (Xie, et al., 2022).

Помічено збільшення частки активованих моноцитів у периферичній крові, що мають посилений прозапальний фенотип і здатність проникати в мозок, долаючи гематоенцефалічний бар'єр і сприяючи розвитку нейрозапалення та нейродегенерації (Huang, 2021). У дос-

лідженні (Wu et al., 2019) підвищений рівень циркулюючих нейтрофілів спостерігався на моделі ХА щурів, що свідчить про їхній потенціал як периферичного біомаркера розвитку хвороби.

**Метою** дослідження було провести порівняльне оцінювання популяційного складу лейкоцитів у щурів з ХА, індукованою інтрагіпокампульним уведенням бета-амілоїду (А $\beta$ ) 1–40 та бета-амілоїду 25–35.

#### Методи

Дослідження проводили на самцях щурів лінії Вістар віком 14 міс. (300–500 г) розведення віварію Навчально-наукового центру "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Тварин утримували в стандартних умовах з доступом до води та їжі *ad libitum*. Протокол утримання тварин був затверджений Комітетом з біоетики університету відповідно до вказівок Закону про захист тварин. Усі дослідження на тваринах проводилися відповідно до норм, встановлених Законом України № 3447-IV "Про захист тварин від жорстокого поводження", а також відповідно до стандартів Конвенції з біоетики Ради Європи "Європейська конвенція для захисту хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях" (1997), загальних етичних принципів роботи з дослідними тваринами, затверджених Першим національним конгресом з біоетики України (вересень 2001 р.) та іншими міжнародними угодами та національним законодавством у цій галузі. Перед початком експерименту тварини були випадково розподілені на 4 групи: I ( $n = 10$ ) – інтактні тварини, що утримувались за стандартних умов віварію та не піддавались жодним маніпуляціям; II ( $n = 10$ ) – хібно оперовані (плацебо) щури; III ( $n = 10$ ) – щури з А $\beta$ 1-40-індукованою ХА; IV ( $n = 10$ ) – щури з А $\beta$ 25–35-індукованою ХА. Рандомізацію проводили за допомогою функції "RAND" () у Microsoft Excel. Наркотизацію щурів проводили сумішшю кетаміну (75 мг/кг, розведеного в стерильній воді для ін'єкцій, "Sigma", США) і 2 % розчином ксилазину (100 мкл/щур, "AlfasanInternational B.V.", Нідерланди). Цю суміш вводили інтраперитонеально загальним об'ємом 1 мл. Інтрагіпокампульне введення А $\beta$  проводили у стереотаксі. Для проведення ін'єкції попередньо проводили трепанацію черепа для введення ін'єкційної голки. Трепанацію проводили від точки перетину сагітального шва і брегми: 2 мм дистально, 2 мм латерально і 3,5 мм вглиб. Розчинні агрегати А $\beta$ 1–40 або А $\beta$ 25–35 набирали в мікроін'єктор і опускали його кінчик у трепанаційний отвір. Загальний об'єм суспензії 10 мкл на тварину. Інфузія відбувалась протягом 5 хв зі швидкістю 0,5 мкл/хв (кожні 5 с). Після введення А $\beta$  кінчик мікроін'єктора залишався у тканині мозку 4 хв. Після чого його діставали і накладали кожній тварині шви на м'які тканини голови. Контрольним тваринам (хібно оперованим) проводили аналогічну хірургічну операцію, проте замість дослідної суспензії А $\beta$ 1–40 або А $\beta$ 25–35 вводили розчинник у тому самому об'ємі.

Дегенерацію дофамінергічних нейронів (ДН) оцінювали методом імуногістохімічного аналізу з використанням антитіл до тирозингідроксилази (ТГ). За допомогою лабіринту Барнса проводили перевірку змін короткотривалої та довготривалої просторової пам'яті, а також когнітивну гнучкість у дослідних щурів. Концентрацію розчинної форми А $\beta$  (CloudCloneCorporation, Houston, TX, США) і тау-протеїну (Elabscience, Houston, TX, США) у гомогенатах гіпокампа щурів з ХА визначали методом імуноферментного аналізу з використанням комерційних тест-систем (R&D Systems, USA) відповідно до рекомендацій виробників. Для уникнення протеолітичної деградації бета-амілоїду в гомогенаті використовували комп-

лекс інгібіторів протеаз та фосфатаз (Sigma, США). Гематологічні показники визначали за допомогою аналізатора "ParticleCounterModel PCE 210" (ERMA, Японія), адаптованого для експериментів з використанням клітин крові щурів і мишей.

Усі дані представлено як середнє  $\pm$  SD. Статистичні відмінності між групами порівняння були обчислені за допомогою дисперсійного аналізу з пост-хок тестом Тьюкі. За  $p < 0,05$  відмінності вважалися достовірними.

## Результати

За результатами наших досліджень інтрагіпокампальне введення А $\beta$  1–40 та А $\beta$  25–35 не супроводжувалося статистично вірогідними змінами ваги тварин та їхньої харчової поведінки (дані не представлені), когнітивні порушення були більш виразними у щурів з А $\beta$  1–40-індукованою ХА (табл. 1).

Таблиця 1

Когнітивні порушення у щурів із хворобою Альцгеймера, індукованою інтрагіпокампальним уведенням 1–40- та 25–35- $\beta$ -амілоїду

| Критерій                                     | Просторова пам'ять                                                                      |                                                                                     | Когнітивна гнучкість                                                                                                          |                                                                                                                           |
|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                              | Короткотривала (термін пошуку "ESCAPE BOX" через 24 год після закінчення тренування, с) | Довготривала (термін пошуку "ESCAPE BOX" через 5 дб після закінчення тренування, с) | Короткотривала (термін перебування перед входом до "ESCAPE BOX" перед евакуацією через 24 год після закінчення тренування, с) | Довготривала (термін перебування перед входом до "ESCAPE BOX" перед евакуацією через 5 дб після закінчення тренування, с) |
| Інтактні тварини, $n = 10$                   | 5,7 $\pm$ 1,3                                                                           | 18,0 $\pm$ 2,2                                                                      | 18,0 $\pm$ 2,2                                                                                                                | 16,3 $\pm$ 2,3                                                                                                            |
| Хібно оперовані тварини (плацебо), $n = 10$  | 4,5 $\pm$ 1,1                                                                           | 21,8 $\pm$ 6,7                                                                      | 21,8 $\pm$ 6,7                                                                                                                | 24,0 $\pm$ 6,3                                                                                                            |
| 1–40-А $\beta$ -індукована модель, $n = 10$  | 17,0 $\pm$ 7,2 <sup>1,2</sup>                                                           | 26,8 $\pm$ 2,2                                                                      | 26,8 $\pm$ 12,2 <sup>1,2</sup>                                                                                                | 28,3 $\pm$ 7,8 <sup>1,2</sup>                                                                                             |
| 25–35-А $\beta$ -індукована модель, $n = 10$ | 11,4 $\pm$ 4,3 <sup>1,2,3</sup>                                                         | 17,4 $\pm$ 1,9 <sup>3</sup>                                                         | 17,4 $\pm$ 1,9 <sup>3</sup>                                                                                                   | 28,4 $\pm$ 5,4 <sup>1,2</sup>                                                                                             |

**Примітки:** 1 –  $p < 0,05$  порівняно з показником інтактних тварин, 2 –  $p < 0,05$  порівняно з показником хібно оперованих тварин, 3 –  $p < 0,05$  порівняно з показником тварин з 1–40-А $\beta$ -індукованою моделлю.

Порівняно з інтактними тваринами в групі з А $\beta$  1–40-індукованою ХА, час на пошук "ESCAPE BOX" через добу після закінчення тренування, який характеризує короткотривалу просторову пам'ять, був більшим у 3 рази, тоді як у групі з А $\beta$  25–35-індукованою моделлю – у 2 рази порівняно з хібно оперованими тваринами. У процесі оцінювання довготривалої просторової пам'яті порушення показника спостерігалися лише у щурів з А $\beta$  1–40-індукованою моделлю: через 5 дб після проведення тренування час пошуку "ESCAPE BOX" у цих тварин був збільшений на 50 % порівняно з інтактними і хібно оперованими тваринами.

Для перевірки когнітивної короткотривалої та довготривалої гнучкості визначали термін перебування тварини перед входом у "ESCAPE BOX" через 24 год і 5 дб після тренування. У щурів з А $\beta$  1–40-індукованою ХА значення цього показника перевищували такі в обох контрольних групах, що свідчить про непевність тварини щодо коректності

обраного варіанта входу. У щурів з А $\beta$  25–35-індукованою ХА лише під час перевірки довготривалої когнітивної гнучкості було виявлено порушення щодо контрольних груп. Показники короткотривалої когнітивної гнучкості в цій моделі були аналогічними до тварин, що не мали захворювання (інтактна група і група плацебо).

Додатковими критеріями розвитку ХА були показник кількості ТН-позитивних нейронів у гіпокампі, а також концентрація А $\beta$  і Тау-протеїну в гомогенаті гіпокампа.

Тирозинагідроксилаза є маркером ДН нейронів, що містять дофамін, норадреналін, адреналін. У зрілих тварин кількість ТГ-позитивних нейронів значно зменшується, оскільки експресія відбувається на дуже низьких рівнях. Для патології Альцгеймера також характерне зменшення кількості цих нейронів (Wu et al., 2019). Істотну втрату ДН було виявлено у щурів з А $\beta$  1–40-індукованою моделлю, тоді як у тварин з А $\beta$  25–35-індукованою ХА зареєстровано лише помірну втрату цих нейронів (табл. 2).

Таблиця 2

Додаткові критерії розвитку хвороби Альцгеймера, індукованої інтрагіпокампальним уведенням 1–40- та 25–35- $\beta$ -амілоїду, у щурів

| Групи тварин                            | Частка ТН-позитивних нейронів у гіпокампі (% від показника інтактних тварин/% від показника хібно оперованих тварин) | Концентрація А $\beta$ у гомогенаті гіпокампа, пг/мг білка | Концентрація Тау-протеїну у гомогенаті гіпокампа, пг/мл |
|-----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Інтактні, $n = 10$                      | –                                                                                                                    | 18,8 $\pm$ 8,1                                             | 22,0 $\pm$ 9,1                                          |
| Хібно оперовані, $n = 10$               | –                                                                                                                    | 21,3 $\pm$ 15,2                                            | 38,8 $\pm$ 10,6                                         |
| А $\beta$ 1-40-індукована ХА, $n = 10$  | 38,9/33,3                                                                                                            | 62,2 $\pm$ 18,3 <sup>*#</sup>                              | 86,9 $\pm$ 32,1 <sup>*#</sup>                           |
| А $\beta$ 25-35-індукована ХА, $n = 10$ | 88,9/76,2                                                                                                            | 66,5 $\pm$ 21,0 <sup>*#</sup>                              | 92,5 $\pm$ 28,5 <sup>*#</sup>                           |

**Примітки:** \* –  $p < 0,05$  порівняно з показником інтактних тварин, # –  $p < 0,05$  порівняно з показником хібно оперованих тварин.

Спостерігали втричі більшу концентрацію А $\beta$  у гомогенаті гіпокампа щурів як з А $\beta$  1–40-, так і з А $\beta$  25–35-індукованою ХА. Також зареєстровано в 3–3,5 раза збільшену концентрацію Тау-протеїну в обох групах. Накопичення А $\beta$

і Тау-протеїну в гіпокампі свідчить про те, що мікроглія не здатна забезпечувати кліренс цих субстанцій в обох моделях, що, однак асоціювалося з різним ступенем



нейродегенерації й розвитку когнітивних порушень, власних цій патології (Nefodova et al., 2022).

Дослідження показників лейкограми проводилось на момент завершення експерименту. У тварин з Аβ 1–40 та з Аβ 25–35-індукованою ХА зареєстровано збільшення кількості лейкоцитів майже в 2,5 раза, що вказує на лейкоцитоз, як маркер системного запального

процесу (рис. 1). Окрім модельних груп, також помічено характерний лейкоцитоз у хибно оперованих тварин, що може бути зумовлено розвитком репаративного запалення після проведеного хірургічного втручання, як було зазначено раніше (Maimaiti et al., 2021), і низьким рівнем та темпом регенерації у щурів похилого віку.

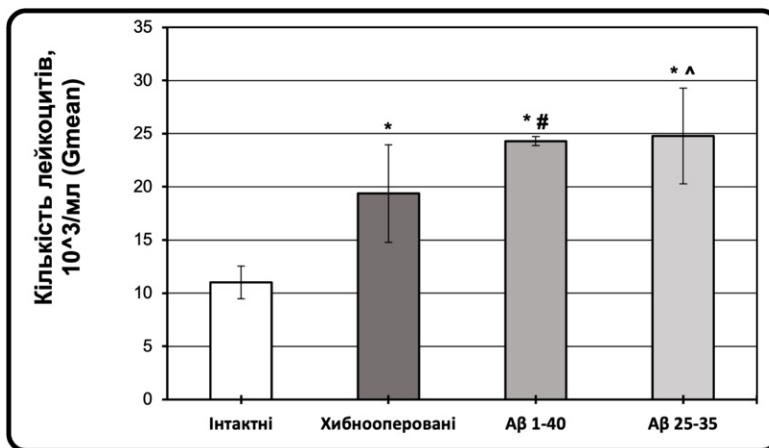


Рис. 1. Кількість лейкоцитів периферичної крові у тварин з Аβ 1–40- та Аβ 25–35-індукованою ХА,  $n = 10$  у кожній групі тварин

**Примітки:** \* –  $p < 0,05$  порівняно з інтактними тваринами, # –  $p < 0,05$  порівняно з хибно оперованими тваринами, ^ –  $p < 0,05$  порівняно з тваринами з Аβ 1–40-індукованою ХА.

Периферичні лімфоцити, які циркулюють у кровотоці та периферичних лімфоїдних органах, можуть відображати системні імунні зміни і потенційно служити біомаркерами прогресування захворювання та терапевтичних втручань у щурячих моделях AD (Maimaiti et al., 2021). У тварин з Аβ 1–40-індукованою ХА кількість лімфоцитів була істотно меншою порівняно з інтактною групою і хибно оперованим контролем, що вказує на абсолютну лімфопенію. Зниженою була і відносна кількість

лімфоцитів, що є однією з основних ознак системного запального процесу. У тварин з Аβ 25–35-індукованою ХА навпаки, кількість лімфоцитів була вищою порівняно з інтактною групою і хибно оперованим контролем. Також вказано на одночасний абсолютний лімфоцитоз та відносну лімфопенію, однією з причин якої є перерозподіл лімфоцитів та міграція до ушкодженої тканини, типова для процесів репарації та регенерації (рис. 2).

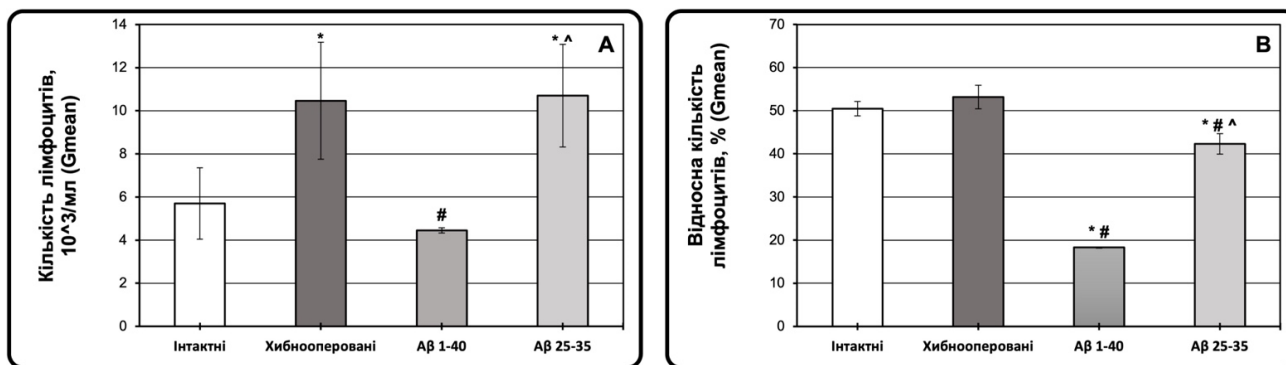


Рис. 2. Абсолютна (А) та відносна (В) кількість лімфоцитів у тварин з Аβ 1–40- та Аβ 25–35-індукованою ХА,  $n = 10$  у кожній групі тварин,  $n = 10$  у кожній групі тварин

**Примітки:** \* –  $p < 0,05$  порівняно з інтактними тваринами, # –  $p < 0,05$  порівняно з хибно оперованими тваринами, ^ –  $p < 0,05$  порівняно з тваринами з Аβ 1–40-індукованою ХА.

Відомо, що кількість периферичних моноцитів корелює зі зниженням когнітивних функцій і може виступати прогностичним біомаркером раннього виявлення та моніторингу ХА. У контексті ХА було показано, що моноцити проникають у мозок і сприяють запаленню нейронів та їх пошкодженню. При цьому кількість циркулюючих у периферичній крові моноцитів зменшується. З іншого боку, міграція моноцитів в ушкоджену ділянку тканини

може бути пов'язана з залученням їх до репаративних процесів з диференціюванням на альтернативно активовані макрофаги M2 профілю (Garfias et al., 2022).

У тварин з Аβ 1–40-індукованою ХА абсолютна кількість моноцитів була в 4 рази нижчою порівняно з інтактною групою. Виразна моноцитопенія вказує на порушення імунної функції, дисрегуляцію запальних реакцій або рекрутинг цих клітин до пошкодженої ділянки,

що сприяє погіршенню когнітивних функцій. З іншого боку, у тварин з Аβ 25–35-індукованою ХА було

zareєстровано збільшення кількості моноцитів, більш ніж у 5 разів (рис. 3).

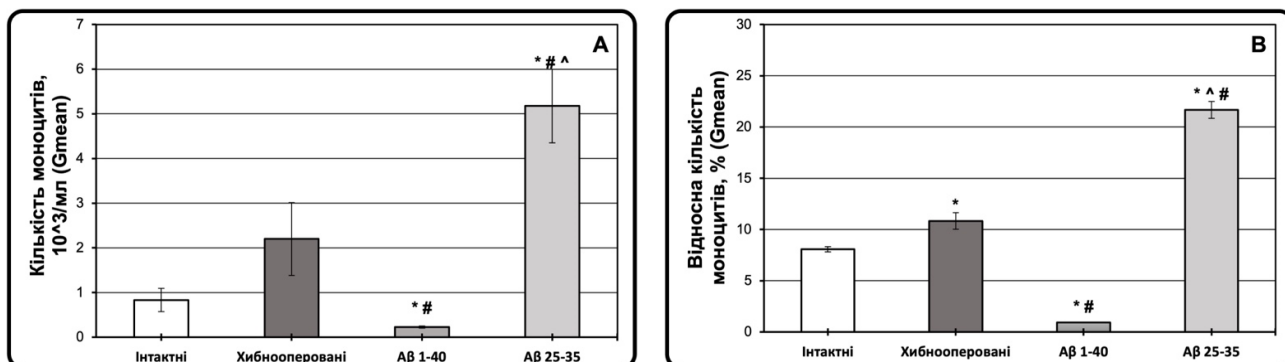


Рис. 3. Абсолютна (А) і відносна (В) кількість моноцитів у тварин з Аβ 1–40-індукованою та Аβ 25–35-індукованою ХА,  $n = 10$  у кожній групі тварин

**Примітки:** \* –  $p < 0,05$  порівняно з інтактними тваринами, # –  $p < 0,05$  порівняно з хібно оперованими тваринами, ^ –  $p < 0,05$  порівняно з тваринами з Аβ 1–40-індукованою ХА.

Абсолютний нейтрофіліоз відображає активовану запальну імунну відповідь, що спрямована у т. ч. на очищення бета-амілоїдних агрегатів. Нейтрофіли беруть безпосередню участь у патогенезі ХА та сприяють погіршенню когнітивних функцій. Загалом нейтрофіли є найпоширенішим типом лейкоцитів і відіграють вирішальну роль у вроджених імунних реакціях, включаючи запален-

ня та контроль інфекції (Wang et al., 2021). Підвищення абсолютної і відносної кількості моноцитів є основним гематологічним маркером запального процесу. У тварин з Аβ 1–40-індукованою ХА zareєстровано абсолютний нейтрофіліоз, збільшення відносної кількості нейтрофілів більш ніж у 3 рази порівняно з інтактною групою (рис. 4).

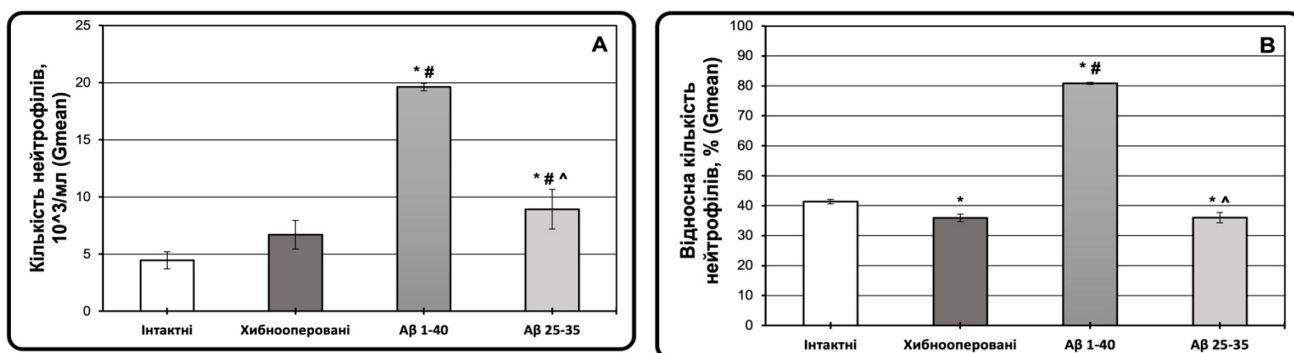


Рис. 4. Абсолютна (А) і відносна (В) кількість нейтрофілів у тварин з Аβ 1–40-індукованою та Аβ 25–35-індукованою ХА,  $n = 10$  у кожній групі тварин

**Примітки:** \* –  $p < 0,05$  порівняно з інтактними тваринами, # –  $p < 0,05$  порівняно з хібно оперованими тваринами, ^ –  $p < 0,05$  порівняно з тваринами з Аβ 1–40-індукованою ХА.

У тварин з Аβ 25–35-індукованою ХА кількість цих клітин не відрізнялася від аналогічних показників у тварин контрольних груп. Відсутність нейтрофілії є доказовою ознакою відсутності системного запального процесу, зважаючи на виняткове значення цих клітин в ініціюванні і персистенції системного запального процесу (Neggers-Cervera, Soehnlein, & Kenne, 2022).

#### Дискусія і висновки

Таким чином, порівняльне оцінювання гематологічних маркерів системного запалення у двох моделях ХА, індукованих повнорозмірним і коровим Аβ, свідчить на користь того, що системний запальний процес здебільшого відтворюється під час інтрагіпокампального введення повнорозмірного амілоїду, що робить відповідну модель більш адекватною для вивчення системного запалення у патофізіології хвороби та пошуку терапевтичних мішеней для його фармакологічного усунення.

**Внесок авторів:** Анастасія Нефьодова – пробопідготовка та проведення гематологічних досліджень; Марія Рудик – статистична обробка; Роман Довгий – проведення поведінкових тестів; Лариса Сквіка – формулювання концепції дослідження, аналіз та узагальнення результатів.

**Подяки, джерела фінансування.** Висловлюємо подяку студентам-бакалаврам та магістрам ННЦ "Інститут біології та медицини", які взяли участь у цьому дослідженні, а також Віталіні Святецькій за допомогу в проведенні хірургічних маніпуляцій та Наталії Дзюбенко за допомогу в проведенні імуногістохімічних досліджень. Дослідження проведено в рамках НДР № 19ДП036-03.

#### Список використаних джерел

- 2023 Alzheimer's disease facts and figures. (2023). *Alzheimers & Dementia*, 19(4), 1598–1695. <https://doi.org/10.1002/alz.13016>  
 Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2020). *Cellular and Molecular Immunology E-Book*. Elsevier Health Sciences.  
 Akhtar, A., Gupta, S.M., Dwivedi, S., Kumar, D., Shaikh, M.F., & Negi, A.S. (2022). Preclinical Models for Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future

- Approaches. *ACS Omega*, 7(51), 47504–47517. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c05609>
- Bennett, M.L., Bennett, F.C., Liddel, S.A., Ajami, B., Zamanian, J.L., Fernhoff, N.B., Mulinyawe, S.B., Bohlen, C.J., Adil, A., Tucker, A.M., Weissman, I.L., Chang, E.Y., Li, G., Grant, G.A., Gephart, M.H., & Barres, B.A. (2016). New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(12). <https://doi.org/10.1073/pnas.1525528113>
- Butovsky, O., & Weiner, H.L. (2018). Microglial signatures and their role in health and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 19(10), 622–635. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0057-5>
- D'Andrea, M.R. (2016). *Intracellular Consequences of Amyloid in Alzheimer's Disease*. Academic Press.
- Fricker, G., Ott, M., & Mahringer, A. (Eds.) (2014). *The Blood Brain Barrier (BBB)*. In Topics in Medicinal Chemistry (TMC), 10, Springer.
- Garfias, S.R., Domínguez, B.T., Rojas, A.T., Arroyo, M.P.M., Rodríguez, U., Boll, C., Sosa, A.L., Sciutto, E., Adalid-Peralta, L., López, Y.M., Frago, G., & Fleury, A. (2022). *Peripheral blood lymphocyte phenotypes in Alzheimer and Parkinson's diseases*. *Neurologia*. <https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2018.10.022>
- Herrero-Cervera, A., Soehnlein, O., & Kenne, E. (2022). Neutrophils in chronic inflammatory diseases. *Cellular & molecular immunology*, 19(2), 177–191. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00832-3>
- Huang, L., Zhang, C., Wang, Y., & Wang, J. (2022). Association of Peripheral Blood Cell Profile With Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.888946>
- Huang, L.T., Zhang, C.P., Wang, Y.B., & Wang, J.H. (2022). Association of Peripheral Blood Cell Profile With Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis. *Frontiers Aging Neuroscience*, 14, 888946. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.888946>
- Huang, X., Hussain, B., & Chang, J. (2021). Peripheral inflammation and blood–brain barrier disruption: effects and mechanisms. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 27(1), 36–47. <https://doi.org/10.1111/cns.13569>
- Jia, R., Chen, Y., & Xu, Y. (2019). Effects of physical activity and exercise on the cognitive function of patients with Alzheimer disease: a meta-analysis. *BMC Geriatrics*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12877-019-1175-2>
- Lehmann, S., Dumurgier, J., Aygnac, X., Marelli, C., Alcolea, D., Ormaechea, J.F., Thouvenot, E., Delaby, C., Hirtz, C., Vialaret, J., Ginestet, N., Bouaziz-Amar, E., Laplanche, J., Labauge, P., Paquet, C., Lleó, A., & Gabelle, A. (2020). Cerebrospinal fluid A beta 1-40 peptides increase in Alzheimer's disease and are highly correlated with phospho-tau in control individuals. *Alzheimer's Research & Therapy*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13195-020-00696-1>
- Maimaiti, A., Show, P.L., Minmin, W., Weiwei, M., Wenhui, S., Aikemu, A., & Maimaitiyming, D. (2021). Improvement of Total Flavonoids from *Dracocephalum moldavica* L. in Rats with Chronic Mountain Sickness through 1H-NMR Metabonomics. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2021/6695346>
- Nefodova, A.M., Rudyk, M., Pasichnichenko M., Dovhyi R., Dovbychuk, T., Tolstanova, G., Skivka, L. (2022). Pro-inflammatory effects of placebo neurosurgery in rats: age-related features. *General Surgery*, 2(3), 56–63. <https://doi.org/10.30978/GS-2022-2-56>
- Perez, M.F., Bregonzio, C., Castro, M.G., & Saravia, F.E. (2022). *Targeting Neuroinflammation in Central Nervous System Disorders: Uncovering Mechanisms, Pharmacological Targets, and Neuropharmaceutical Developments*. Frontiers Media SA.
- Saresella, M., Marventano, I., Piancone, F., La Rosa, F., Galimberti, D., Fenoglio, C., Scarpini, E., & Clerici, M. (2020). IL-33 and its decoy sST2 in patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01806-4>
- Twarowski, B., & Herbet, M. (2023). Inflammatory Processes in Alzheimer's Disease—Pathomechanism, Diagnosis and Treatment: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(7), 6518. <https://doi.org/10.3390/ijms24076518>
- Unda, S.R., Antoniazzi, A.M., Altschul, D.J., & Marongiu, R. (2021). Peripheral Leukocytosis Predicts Cognitive Decline but not behavioral Disturbances: A Nationwide Study of Alzheimer's and Parkinson's Disease Patients. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 50(2), 143–152. <https://doi.org/10.1159/000516340>
- Villabona-Rueda, A., Erice, C., Pardo, C.A., & Stins, M.F. (2019). The Evolving Concept of the Blood Brain Barrier (BBB): from a Single Static Barrier to a Heterogeneous and Dynamic Relay Center. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00405>
- Wang, Y., Sun, Y., Luo, Y., Peng, D., Li, X., Yang, B., Wang, Q., & Kuang, H. (2021). Biomarkers for the Clinical Diagnosis of Alzheimer's Disease: Metabolomics Analysis of Brain Tissue and Blood. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.700587>
- Wu, T., Dejanovic, B., Gandham, V.D., Gogineni, A., Edmonds, R., Schauer, S.P., Srinivasan, K., Huntley, M. A., Wang, Y., Wang, T., Hedehus, M., Barck, K. H., Stark, M., Ngu, H., Foreman, O., Meilandt, W. J., Elstrott, J., Chang, M. C., Hansen, D. J., . . . Hanson, J. E. (2019). Complement C3 is Activated in Human AD Brain and Is Required for Neurodegeneration in Mouse Models of Amyloidosis and Tauopathy. *Cell Reports*, 28(8), 2111–2123.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.07.060>
- Xie, J., Van Hoecke, L., & Vandenbroucke, R.E. (2022). The Impact of Systemic Inflammation on Alzheimer's Disease Pathology. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.796867>
- Xie, L., Kang, H., Xu, Q., Chen, M.Z.Q., Liao, Y., Thiagarajan, M., O'Donnell, J.S., Christensen, D.H., Nicholson, C., Iliff, J.J., Takano, T., & Deane, R. (2013). Sleep Drives Metabolite Clearance from the Adult Brain. *Science*, 342(6156), 373–377. <https://doi.org/10.1126/science.1241224>
- Yokoyama, M., Kobayashi, H., Tatsumi, L. & Tomita, T. (2022). Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Front. Mol. Neurosci.*, 15, 912995. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.912995>
- Zeiss C.J. (2015). Improving the predictive value of interventional animal models data. *Drug Discov. Today*, 20(4), 475–482. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.10.015>
- Zambrano, P., Suwalsky, M., Jemiola-Rzemińska, M., Gallardo-Nelson, M.J., Strzałka, K., & Muñoz-Torres, D. (2021). Protective Role of a Dipeptidyl-Hydrolase Inhibitor against the  $\beta$ -Amyloid (1-42) Effect on Human Erythrocytes. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9563. <https://doi.org/10.3390/ijms22179563>

## References

- 2023 Alzheimer's disease facts and figures. (2023). *Alzheimers & Dementia*, 19(4), 1598–1695. <https://doi.org/10.1002/alz.13016>
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2020). *Cellular and Molecular Immunology E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Akhtar, A., Gupta, S.M., Dwivedi, S., Kumar, D., Shaikh, M.F., & Negi, A.S. (2022). Preclinical Models for Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future Approaches. *ACS Omega*, 7(51), 47504–47517. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c05609>
- Bennett, M.L., Bennett, F.C., Liddel, S.A., Ajami, B., Zamanian, J.L., Fernhoff, N.B., Mulinyawe, S.B., Bohlen, C.J., Adil, A., Tucker, A.M., Weissman, I.L., Chang, E.Y., Li, G., Grant, G.A., Gephart, M.H., & Barres, B.A. (2016). New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(12). <https://doi.org/10.1073/pnas.1525528113>
- Butovsky, O., & Weiner, H.L. (2018). Microglial signatures and their role in health and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 19(10), 622–635. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0057-5>
- D'Andrea, M.R. (2016). *Intracellular Consequences of Amyloid in Alzheimer's Disease*. Academic Press.
- Fricker, G., Ott, M., & Mahringer, A. (Eds.) (2014). *The Blood Brain Barrier (BBB)*. In Topics in Medicinal Chemistry (TMC), 10, Springer.
- Garfias, S.R., Domínguez, B.T., Rojas, A.T., Arroyo, M.P.M., Rodríguez, U., Boll, C., Sosa, A.L., Sciutto, E., Adalid-Peralta, L., López, Y.M., Frago, G., & Fleury, A. (2022). *Peripheral blood lymphocyte phenotypes in Alzheimer and Parkinson's diseases*. *Neurologia*. <https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2018.10.022>
- Herrero-Cervera, A., Soehnlein, O., & Kenne, E. (2022). Neutrophils in chronic inflammatory diseases. *Cellular & molecular immunology*, 19(2), 177–191. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00832-3>
- Huang, L., Zhang, C., Wang, Y., & Wang, J. (2022). Association of Peripheral Blood Cell Profile With Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.888946>
- Huang, L.T., Zhang, C.P., Wang, Y.B., & Wang, J.H. (2022). Association of Peripheral Blood Cell Profile With Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis. *Frontiers Aging Neuroscience*, 14, 888946. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.888946>
- Huang, X., Hussain, B., & Chang, J. (2021). Peripheral inflammation and blood–brain barrier disruption: effects and mechanisms. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 27(1), 36–47. <https://doi.org/10.1111/cns.13569>
- Jia, R., Chen, Y., & Xu, Y. (2019). Effects of physical activity and exercise on the cognitive function of patients with Alzheimer disease: a meta-analysis. *BMC Geriatrics*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12877-019-1175-2>
- Lehmann, S., Dumurgier, J., Aygnac, X., Marelli, C., Alcolea, D., Ormaechea, J.F., Thouvenot, E., Delaby, C., Hirtz, C., Vialaret, J., Ginestet, N., Bouaziz-Amar, E., Laplanche, J., Labauge, P., Paquet, C., Lleó, A., & Gabelle, A. (2020). Cerebrospinal fluid A beta 1-40 peptides increase in Alzheimer's disease and are highly correlated with phospho-tau in control individuals. *Alzheimer's Research & Therapy*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13195-020-00696-1>
- Maimaiti, A., Show, P.L., Minmin, W., Weiwei, M., Wenhui, S., Aikemu, A., & Maimaitiyming, D. (2021). Improvement of Total Flavonoids from *Dracocephalum moldavica* L. in Rats with Chronic Mountain Sickness through 1H-NMR Metabonomics. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2021/6695346>
- Nefodova, A.M., Rudyk, M., Pasichnichenko M., Dovhyi R., Dovbychuk, T., Tolstanova, G., Skivka, L. (2022). Pro-inflammatory effects of placebo neurosurgery in rats: age-related features. *General Surgery*, 2(3), 56–63. <https://doi.org/10.30978/GS-2022-2-56>
- Perez, M.F., Bregonzio, C., Castro, M.G., & Saravia, F.E. (2022). *Targeting Neuroinflammation in Central Nervous System Disorders: Uncovering Mechanisms, Pharmacological Targets, and Neuropharmaceutical Developments*. Frontiers Media SA.
- Saresella, M., Marventano, I., Piancone, F., La Rosa, F., Galimberti, D., Fenoglio, C., Scarpini, E., & Clerici, M. (2020). IL-33 and its decoy sST2 in patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01806-4>

Twarowski, B., & Herbet, M. (2023). Inflammatory Processes in Alzheimer's Disease—Pathomechanism, Diagnosis and Treatment: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(7), 6518. <https://doi.org/10.3390/ijms24076518>

Unda, S.R., Antoniazzi, A.M., Altschul, D.J., & Marongiu, R. (2021). Peripheral Leukocytosis Predicts Cognitive Decline but not behavioral Disturbances: A Nationwide Study of Alzheimer's and Parkinson's Disease Patients. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 50(2), 143–152. <https://doi.org/10.1159/000516340>

Villabona-Rueda, A., Erice, C., Pardo, C.A., & Stins, M.F. (2019). The Evolving Concept of the Blood Brain Barrier (BBB): from a Single Static Barrier to a Heterogeneous and Dynamic Relay Center. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00405>

Wang, Y., Sun, Y., Luo, Y., Peng, D., Li, X., Yang, B., Wang, Q., & Kuang, H. (2021). Biomarkers for the Clinical Diagnosis of Alzheimer's Disease: Metabolomics Analysis of Brain Tissue and Blood. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.700587>

Wu, T., Dejanovic, B., Gandham, V.D., Gogineni, A., Edmonds, R., Schauer, S.P., Srinivasan, K., Huntley, M. A., Wang, Y., Wang, T., Hedehus, M., Barck, K. H., Stark, M., Ngu, H., Foreman, O., Meilandt, W. J., Elstrott, J., Chang, M. C., Hansen, D. J., . . . Hanson, J. E. (2019). Complement C3 is Activated in Human AD Brain and Is Required for Neurodegeneration in

Mouse Models of Amyloidosis and Tauopathy. *Cell Reports*, 28(8), 2111–2123.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.07.060>

Xie, J., Van Hoecke, L., & Vandenbroucke, R.E. (2022). The Impact of Systemic Inflammation on Alzheimer's Disease Pathology. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.796867>

Xie, L., Kang, H., Xu, Q., Chen, M.Z.Q., Liao, Y., Thiyagarajan, M., O'Donnell, J.S., Christensen, D.H., Nicholson, C., Iliff, J.J., Takano, T., & Deane, R. (2013). Sleep Drives Metabolite Clearance from the Adult Brain. *Science*, 342(6156), 373–377. <https://doi.org/10.1126/science.1241224>

Yokoyama, M., Kobayashi, H., Tatsumi, L. & Tomita, T. (2022). Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Front. Mol. Neurosci.*, 15, 912995. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.912995>

Zeiss C.J. (2015). Improving the predictive value of interventional animal models data. *Drug. Discov. Today*, 20(4), 475–482. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.10.015>

Zambrano, P., Suwalsky, M., Jemioła-Rzemińska, M., Gallardo-Nelson, M.J., Strzałka, K., & Muñoz-Torrero, D. (2021). Protective Role of a Donepezil-Huprine Hybrid against the  $\beta$ -Amyloid (1–42) Effect on Human Erythrocytes. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9563. <https://doi.org/10.3390/ijms22179563>

Отримано редакцією журналу / Received: 04.09.23

Прорецензовано / Revised: 04.09.23

Схвалено до друку / Accepted: 05.10.23

Anastasia NEFODOVA<sup>1</sup>, PhD Student

ORCID ID: 0000-0003-3440-3687

e-mail: nefodova.av@gmail.com

Maria RUDYK<sup>1</sup>, PhD (Biol.)

ORCID ID: 0000-0003-1252-885X

e-mail: rudyk\_marie@knu.ua

Roman DOVHYI<sup>1</sup>, PhD (Biol.)

ORCID ID: 0000-0003-1189-4479

e-mail: romandovgiy@gmail.com

Larisa SKIVKA, DSc (Biol.), Prof.

ORCID ID: 0000-0002-2171-1085

e-mail: realm@ukr.net

<sup>1</sup>Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

## COMPOSITION OF PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTE SUBSETS IN RATS WITH DIFFERENT MODELS OF ALZHEIMER'S DISEASE

**Background.** Systemic inflammation is recognized as one of the key features of Alzheimer's disease (AD) – a neurodegenerative disorder, which is characterized by cognitive decline with progressive memory loss and affects millions of predominantly elderly people. Recent literature data suggest the involvement of peripheral immune cells in the initiation and progression of AD. However, our understanding of the population composition of peripheral blood leukocytes and its contribution to disease progression remains limited. The use of animal models plays an important role in investigating possible mechanisms linking the peripheral immune system to the inflammatory processes underlying neurodegeneration. The aim of this study was comparative assessment of the composition of leukocyte subsets in rats with AD, induced by intrahippocampal injection of amyloid-beta (A $\beta$ ) 1–40 and A $\beta$  25–35.

**Methods.** Male Wistar rats were used in the experiments, including intact and sham-operated animals as controls. Disease development was confirmed by assessing cognitive impairment in the Barnes maze behavioral test and by the loss of dopaminergic neurons. Hematological parameters were evaluated at the end of the experiment (day 37 after the disease initiation), including absolute leukocyte count, as well as absolute and relative count of their main subsets: lymphocytes, monocytes, and neutrophils. Rats with AD induced by A $\beta$  1–40 exhibited granulocytosis (a fivefold increase in absolute granulocyte count in the circulation). Absolute and relative count of lymphocytes in these animals were decreased on average by 2.5 times, monocyte count – on average by 3 times as compared to those in intact and sham-operated rats. In rats with A $\beta$  25–35-induced AD, leukocytosis with slightly decreased lymphocyte proportion, increase in monocyte count twice at average and unchanged neutrophil count were revealed.

**Results.** Therefore, animals with AD, induced by A $\beta$  1–40, had hematologic markers of systemic inflammation (leukocytosis, granulocytosis, lymphocytopenia, and monocytopenia).

**Conclusions.** These results suggest that the A $\beta$  1–40-induced AD model more accurately reproduces the hematologic signs of systemic inflammation observed in patients with this pathology.

**Keywords:** Alzheimer's disease, leukocytes, inflammation, lymphocytes, monocytes, neutrophils.

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів. Спонсори не брали участі в розробленні дослідження; у зборі, аналізі чи інтерпретації даних; у написанні рукопису; в рішенні про публікацію результатів.

The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; in the decision to publish the results.



УДК 616.72-002: 616-002.2  
DOI: 10.17721/1728.2748.2023.94.35-40

Юрій ТУГАРОВ, асп.  
ORCID ID: 0000-0002-1583-6279  
e-mail: tugarovdoc@gmail.com  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

Алевтина ЮЕТ, канд. біол. наук  
ORCID ID: 0000-0002-6511-2201  
e-mail: alevtina.dranitsina@gmail.com  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

Катерина ДВОРЩЕНКО, д-р біол. наук  
ORCID ID: 0000-0003-3118-9355  
e-mail: kateryna.dvorshchenko@knu.ua  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

## ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ *LRP1* ТА *OLR1* У КРОВІ ХВОРИХ НА ОСТЕОАРТРИТ ПІСЛЯ SARS-CoV2-ІНФЕКЦІЇ

**Вступ.** Уперше про інфекцію тяжкого гострого респіраторного синдрому коронавірусом 2 (*Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2, SARS-CoV-2*) було повідомлено в Ухані (Китай) у грудні 2019 року, а потім вона швидко поширилася по всьому світу, спричинивши близько 771 млн активних випадків із ~7 млн смертей станом на вересень 2023 року. Пандемія нового коронавірусу SARS-CoV-2 створює велику загрозу для світу в багатьох аспектах: медичному, соціальному, економічному та інших. Всебічне розуміння взаємодії вірусу з організмом фундаментально важливе в боротьбі з SARS-CoV-2. Під час коронавірусної хвороби 2019 р. (*Coronavirus disease 2019, COVID-19*) уражуються епітеліальні клітини дихальних шляхів, що проявляється симптомами респіраторної інфекції. Вірус SARS-CoV-2 як інфекційний тригер спричинює ушкодження інших систем органів, зокрема опорно-рухового апарату, а також може ускладнювати стан пацієнтів з коморбідними захворюваннями. Метою роботи було визначити експресію генів *LRP1* (*LDL receptor related protein 1*) та *OLR1* (*oxidized low density lipoprotein receptor 1*) у крові хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції.

**Методи.** Учасники дослідження були поділені на три групи: 1-ша група ( $n = 10$ ) – умовно здорові люди; 2-га група ( $n = 22$ ) – пацієнти з остеоартритом колінних суглобів II–III ступеня; 3-тя група ( $n = 14$ ) – пацієнти з остеоартритом колінних суглобів II–III ступеня, які перенесли легку та середньотяжку форму COVID-19 6–9 міс. тому. У крові визначали експресію генів *LRP1* та *OLR1*. РНК отримували методом Хомчинського; синтез кДНК та кількісну полімеразну ланцюгову реакцію – в реальному часі (*Real-time PCR, кПЛР*) за допомогою комерційного набору "Thermo Scientific Verso SYBR Green 1-Step qRT-PCR ROX Mix" ("Thermo Scientific", Литва). Обробку результатів дослідження проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики.

**Результати.** У крові пацієнтів, хворих на остеоартрит, знижується експресія гена *LRP1* та зростає експресія гена *OLR1* порівняно з групою умовно здорових людей. У пацієнтів з остеоартритом після інфікування SARS-CoV-2 показано більш суттєві порушення експресії досліджуваних генів.

**Висновки.** Отримані дані свідчать про порушення метаболізму ліпопротеїнів в організмі, активацію вільнорадикальних процесів та розвиток системного запалення, що призводить до зниження протекції судин та ендотеліальної дисфункції у хворих на остеоартрит, яке посилюється за умов додаткового інфекційного навантаження на організм під дією SARS-CoV2-інфекції.

**Ключові слова:** SARS-CoV-2, остеоартрит, кров, експресія генів *LRP1*, *OLR1*, ліпідний обмін, запалення, окисний стрес.

### Вступ

Коронавірус тяжкого гострого респіраторного синдрому 2 (*Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2, SARS-CoV-2*) є етіологічним збудником коронавірусної хвороби 2019 (*Coronavirus disease 2019, COVID-19*). Це захворювання набуло розмірів пандемії, від якої на сьогодні вже померли мільйони людей. SARS-CoV-2 був вперше зареєстрований у китайському місті Ухань (Китай) у 2019 р. Цей вірус висококонтагіозний для людської популяції, він швидко поширився по всьому світу через респіраторний матеріал (кашель, чхання) інфікованих людей або непрямий контакт через фоміти на поверхнях у найближчому оточенні хворого. До 30 січня 2020 р. Всесвітня організація охорони здоров'я оголосила глобальну надзвичайну ситуацію у сфері охорони здоров'я, а 11 березня 2020 р. COVID-19 було оголошено пандемією (Billah, Miah, & Khan, 2020). Коронавірусна хвороба 2019 поширилася на більш ніж 200 країн, областей або територій по всьому світу, що стало серйозною медико-соціальною проблемою в багатьох країнах світу (Muralidar et al., 2020; Taleghani, & Taghipour, 2021).

SARS-Cov-2 таксономічно належить до родини коронавірусів і підроду *Sarbecovirus*, які містять кілька інших видів, що викликають легкі та тяжкі захворювання людини. Цьому вірусу властива тропність до епітеліальних клітин дихальних шляхів. SARS-CoV-2 зв'язується з епітеліальними клітинами ротової та носової порожнин, а також може мігрувати далі – у провідні дихальні шляхи. Вірус може проникати ще далі та інфікувати клітини пневмоцитів альвеолярного типу II, викликаючи їхній апоптоз, що спричиняє дифузне пошкодження альвеол і порушення газообміну. Припускають, що саме ці події, призводять до розвитку гострого респіраторного дистрес-синдрому (Kirtipal, Bharadwaj, & Kang, 2020; Parasher, 2021).

Як інфекційний тригер вірус SARS-CoV-2 спричинює ушкодження інших системи органів, зокрема опорно-рухового апарату, а також може ускладнювати стан пацієнтів з коморбідними захворюваннями (L.M. Ailioaie, C. Ailioaie, & Litscher, 2022; Jovani et al., 2021; Ruiz-Del-Valle et al., 2022; Wendling et al., 2021). До поширених хронічних захворювань належать остеоартрити (ОА) – хронічні дегенеративні захворювання суглобів. Остеоартрит має прогресуючий характер і з часом може

© Тугаров Юрій, Юет Алевтина, Дворщенко Катерина, 2023

привести до повної втрати рухливості суглоба. Надмірні фізичні навантаження, травми опорно-рухового апарату, старіння, метаболічні порушення та інфекційні захворювання є основними факторами ризику розвитку остеоартритів (Abramoff, & Caldera, 2020; Motta et al., 2023; Yao et al., 2023). На сьогодні до цих етіологічних чинників можна додати і вірусну інфекцію SARS-CoV-2. Вона створює очевидний ризик у пацієнтів з остеоартритами, що може підвищити тяжкість його перебігу та сприяти розвитку ускладнень. Тому це питання потребує детального вивчення та наукового обґрунтування.

Останніми роками були досягнуті значні успіхи у використанні геномного аналізу ряду патологій, що дає детальний аналіз генів-кандидатів, залучених до патогенезу захворювань, прогнозування їхнього перебігу, діагностики та передбачення відповіді на терапію. Також диференціальна експресія генів важлива для розуміння біологічних відмінностей між здоровим і хворим станами організму. Зміна експресії генів має велике значення для процесу захворювання. У нашій роботі ми дослідили взаємозв'язок між розвитком коронавірусної хвороби у пацієнтів з остеоартритом та експресією генів, пов'язаних з регуляцією метаболізму ліпідів. Були проведені дослідження експресії генів *LRP1* (LDL receptor related protein 1) та *OLR1* (oxidized low density lipoprotein receptor 1) у лейкоцитах крові хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції. За даними літератури (Akhmedov et al., 2022; Hashimoto et al., 2018; Yamamoto et al., 2013), ці гени можуть бути залучені до розвитку остеоартриту, але механізми, за яким вони сприяють його розвитку *in vivo*, залишаються не з'ясованими.

**Метою** роботи було визначити експресію генів *LRP1* та *OLR1* у крові хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції.

#### Методи

У дослідженні брали участь 46 пацієнтів віком від 39 до 70 років, які перебували на стаціонарному або амбулаторному лікуванні в ортопедичному спеціалізованому медичному центрі "Ортоклініка" (м. Тернопіль, Україна). У 36 пацієнтів на підставі клінічних та рентгенологічних критеріїв було встановлено діагноз "остеоартрит колінних суглобів II–III ступеня". На етапі відбору всім хворим проводилася рентгенографія колінних суглобів у прямій (передньозадній) та боковій проєкції. Оцінювання інтенсивності болю та функціонального стану колінних суглобів хворих проводилася за допомогою обчислення індексу WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index), який визначається на основі тестування, що містить 24 запитання, які відображають вираженість больових відчуттів (5 запитань), скутості (2 запитання) і функціональної активності (17 запитань) (McConnell, Kolopack, & Davis, 2001).

Всі учасники дослідження надалі були розподілені на три експериментальні групи. До першої групи ( $n = 10$ ) входило умовно здорових людей. Друга група ( $n = 22$ ) – пацієнти з ОА колінних суглобів II–III ступеня, у яких виключали можливу супутню наявність коронавірусної інфекції шляхом проведення епідеміологічного анамнезу кожного пацієнта, та наявність контакту з хворими на COVID-19. Третя група ( $n = 14$ ) – пацієнти з ОА колінних суглобів II–III ступеня, які перенесли легку або середньотяжку форму COVID-19 6–9 міс. тому. Діагноз COVID-19 було підтверджено за допомогою молекулярного аналізу (RT-PCR) зразків мазків із носоглотки. Усі учасники, які добровільно погодилися взяти участь у дослідженні, ознайомилися та підписали відповідну форму інформованої згоди. Дослідження виконано з дотриманням

основних положень "Правил етичних принципів проведення наукових медичних досліджень за участю людини", затверджених Гельсінською декларацією (1964–2013 pp.), ICH GCP (1996 p.), Директиви ЄЕС № 609 (від 24.11.1986 p.), наказів МОЗ України № 690 від 23.09.2009 p., № 944 від 14.12.2009 p., № 616 від 03.08.2012 p. та схвалені Комітетом з етики медичного центру "Ортоклініка" (м. Тернопіль, Україна). Вжиті всі заходи для забезпечення анонімності пацієнтів.

Забір біологічного матеріалу проводився на базі спеціалізованого медичного центру "Ортоклініка", м. Тернопіль. Кров отримували пункцією з ліктьової вени пацієнта натще, переносили у пробірку з антикоагулянтом, щоб запобігти її згортанню.

У клітинах крові визначали експресію генів *LRP1* та *OLR1*. РНК отримували методом Хомчинського (Chomczynski, & Sacchi, 1987) із цільної крові, використовуючи її лейкоцити. Синтез кДНК та кількісну полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі (Real-time PCR, кПЛР) здійснювали за допомогою комерційного набору "Thermo Scientific Verso SYBR Green 1-Step qRT-PCR ROX Mix" ("Thermo Scientific", Литва), використовуючи по 0,3 мкмоль/л кожного праймера; проводили за таких рекомендованих фірмою-виробником температурних умов: синтез кДНК 50 °C – 30 хв; ініціююча денатурація 95 °C – 15 хв; далі 40 циклів: денатурація ДНК 95 °C – 15 с; гібридизація праймерів 50 °C – 35 с; добування ланцюга 72 °C – 30 с.; елонгація ампліфікатів 72 °C – 5 хв.

У реакціях було використано такі послідовності праймерів: для *LRP1*: прямий – TGGCAGACACCGGAAGATTG та зворотний – CGTTCCAAGCGGTAGACACT; для *OLR1*: прямий – GTGACTGCTTCACTCTCATT та зворотний – GGCACCACCATGGAGAGTAA; для *ACTB* (ген  $\beta$ -актину, що використовується як внутрішній контроль реакції завдяки конститутивній експресії): прямий – CTTCCAGCTCCTCCCTGGAG та зворотний – CCACAGGACTCCATGCCAG. Відтворюваність результатів ампліфікації було перевірено в паралельних експериментах шляхом повторення кПЛР на зразках РНК усіх добровольців, із кожним праймером не менше трьох разів. Відносну кількість мРНК визначали порівняльним Ст методом "ΔΔC<sub>t</sub> Method" (Livak, & Schmittgen, 2001), ефективність ПЛР була однаковою ( $Ex = (10^{-1/slope}) - 1$ ), де slope – коефіцієнт нахилу, який становив 3,7, а ефективність кПЛР дорівнювала 86 %. Відносний рівень експресії значених генів нормалізували до рівня експресії *ACTB*.

Отримані дані тестували на нормальне розподілення за допомогою тесту Шапіро–Вілкс з використанням програмного пакета "GraphPad Prism 8.4.3" ("GraphPad Software Inc.", США). Подальший обрахунок відбувався за допомогою непарного параметричного *t* тесту. Отримані результати наведені у вигляді середнього арифметичного  $\pm$  стандартне відхилення – SD. Результати вважали значущими, коли  $p \leq 0,05$ .

#### Результати

У проведених дослідженнях було визначено експресію генів *LRP1* (кодує білок 1, подібний до рецептора ліпопротеїнів низької щільності (або рецептор для  $\alpha 2$ -мікроглобуліну, або рецептор аполіпопротеїну Е (LRP-1)) та *OLR1* (кодує рецептор окиснених ліпопротеїнів низької щільності (ox-LDL), який належить до надродини лектинів С-типу – LOX1) у крові пацієнтів, які страждають на остеоартрит, та хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції.

У результаті проведених експериментальних досліджень виявлено, що рівень експресії гена *LRP1* у крові

пацієнтів з остеоартритом був нижчим в 1,7 раза ( $p \leq 0,0001$ ) порівняно з групою умовно здорових людей. У групи хворих на остеоартрит після COVID-19 цей показник знижувався в 2,3 раза ( $p \leq 0,0001$ ) порівняно з групою

умовно здорових людей та майже в 1,4 раза ( $p \leq 0,001$ ) порівняно з групою хворих на остеоартрит (рис. 1).

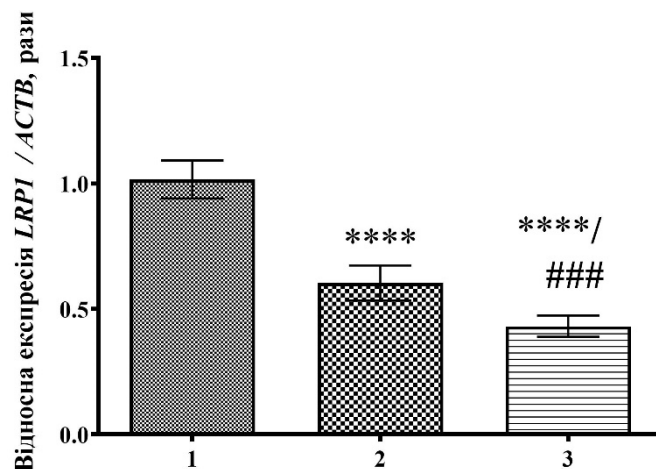


Рис. 1. Рівень експресії гена *LRP1* у крові хворих на остеоартрит:

1 – умовно здорові люди; 2 – пацієнти з остеоартритом; 3 – остеоартрит + COVID-19;

\*\*\*\* $p \leq 0,0001$  відносно умовно здорових людей; ### –  $p \leq 0,001$  відносно групи людей з остеоартритом

У результаті подальших експериментів встановлено, що рівень експресії гена *OLR1* у крові хворих на остеоартрит був вищим у 1,9 раза ( $p \leq 0,0001$ ) порівняно з групою умовно здорових людей (рис. 2). Водночас у пацієнтів з остеоартритом колінних суглобів, які

перехворіли COVID-19, цей показник зростав у 2,4 раза ( $p \leq 0,0001$ ) порівняно з групою умовно здорових людей та в 1,3 раза ( $p \leq 0,001$ ) порівняно з групою хворих на остеоартрит (рис. 2).

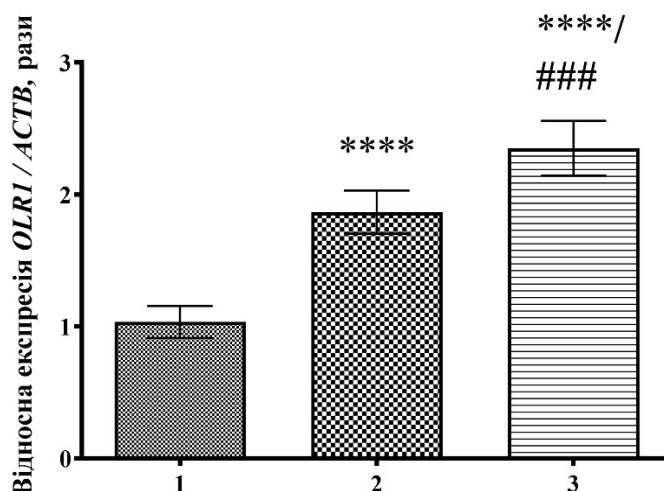


Рис. 2. Рівень експресії гена *OLR1* у крові хворих на остеоартрит:

1 – умовно здорові люди; 2 – пацієнти з остеоартритом; 3 – остеоартрит + COVID-19;

\*\*\*\* $p \leq 0,0001$  відносно умовно здорових людей; ### –  $p \leq 0,001$  відносно групи людей з остеоартритом

LRP1 є багатофункціональним рецептором, який бере участь у різних біологічних процесах, включаючи метаболізм ліпопротеїнів, розпад протеаз, активацію лізосомальних ферментів, проникнення бактеріальних токсинів і вірусів у клітину, дозрівання та рециркуляцію інтегринів, регуляцію судинного тонуусу та проникності, запалення, клітинну адгезію (через інтегрини), ріст, міграція та апоптоз (Dietert et al., 2023; He et al., 2021; Pratt, Haidara, & Annabi, 2022; Wujak et al., 2018).

В організмі LRP1 відіграє важливу системну роль, завдяки його здатності розпізнавати понад 100 лігандів, таких як ліпопротеїни, глікопротеїни позаклітинного мат-

риксу (фібронектин, гепарансульфат-протеоглікани, амілоїд  $\beta$ ), цитокіни (тканинний активатор плазміногену, лептин), і фактори росту (включаючи трансформуючий фактор росту (TGF $\beta$ 1), інгібітор активатора плазміногену-1 і фактор росту сполучної тканини (CTGF)). Також LRP1 здатний зв'язувати велику кількість цитоплазматичних адапторних білків. Крім того, LRP1 може зв'язуватися з іншими трансмембранними рецепторами, такими як інтегрини, рецепторні тирозинкінази, BMPR і рецептори TGF $\beta$ 1 (TGFBR), та модулювати активність інших трансмембранних рецепторів (Calvier et al., 2019;



Faissner, 2023; Munshaw et al., 2023; Sizova et al., 2023; Wujak et al., 2018).

У дослідженнях, L. Calvier зі співавторами показано вазопротекторну роль LRP1 у легеневої артерії (Parasher, 2021). Завдяки численним лігандам LRP1 є очевидною терапевтичною мішенню для підтримки судинного гомеостазу та гасіння макроглобулінозапальних сигналів при кількох складних захворюваннях. Були ідентифіковані різні агоністи LRP1, такі як природний  $\alpha 2$ -,  $\alpha 1$ -антитрипсин, антитромбін III і синтетичний SP16. Окрім того, кілька агоністів LRP1 вже успішно оцінено на доклінічних моделях ішемії-реперфузії, і два з них ( $\alpha 1$ -антитрипсин і SP16) випробовуються в клінічних дослідженнях для гострого інфаркту міокарда. Описано багато ліків, які модулюють активність рецептора LRP1, причому деякі препарати вже тестуються в клінічних випробуваннях для корекції серцево-судинних захворювань (Calvier, Herz, & Hansmann, 2022). Накопичені дані свідчать про те, що LRP1 модулює судинний гомеостаз головним чином шляхом регулювання вазоактивних речовин і специфічних внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, включаючи сигнальний шлях інгібітора активатора плазміногену 1 (PAI-1), сигнальний шлях тромбобластичного фактора росту (PDGF), трансформуючий фактор росту  $\beta$  (TGF $\beta$ ) сигнальний шлях і сигнальний шлях фактора росту ендотелію судин (VEGF) (Calvier et al., 2019).

Також LRP-1 задіяний у фізіологічний і патологічний катаболізм агрекану в хрящі як ключовий модулятор позаклітинної активності адамалізіноподібної металопротеїнази з тромбоспондиновими мотивами 5 (ADAMTS-5), яка є основним ферментом, що розкладає агрекан у хрящі (Yamamoto et al., 2013).

LOX-1 є рецепторним білком, який належить до над родини лектинів C-типу. Його ген регулюється через сигнальний шлях циклічного AMP. Білок зв'язує, інтерналізує та розкладає окиснений ліпопротеїн низької щільності. Система LOX-1/ox-LDL відіграє багато ролей у розвитку артриту. Кілька досліджень показали, що система LOX-1/ox-LDL відіграє певну роль у розвитку дегенерації хряща. Т. Nakagawa зі співавторами вперше продемонстрували експресію LOX-1 і наявність ox-LDL у суглобових хондроцитах при артриті, індукованому зимозаном (ZIA) (Nakagawa et al., 2002). Крім того, вони вказали, що суглобові хондроцити щурів у базальному культуральному середовищі експресували LOX-1, а ox-LDL, який зв'язує LOX-1, знижував життєздатність культивованих хондроцитів (Nakagawa et al., 2002). Також повідомлялося про наявність ox-LDL у синовіальній рідині людини та спільну експресію LOX-1 і ox-LDL у хрящі людини при остеоартриті (Akagi et al., 2007; Simopoulou, Malizos, & Tsezou, 2007).

Відомо, що розчинний лектиноподібний рецептор 1 окисненого ліпопротеїну низької щільності (sLOX-1) наявний у кровообігу та синовіальній рідині в пацієнтів з ревматоїдним артритом (Ishikawa et al., 2016). Підвищені рівні TNF- $\alpha$  спричиняють не лише ревматоїдний артрит, але й ендотеліальні дисфункції шляхом збільшення вмісту оксЛПНЩ у судинах та активації шляху LOX-1/NF $\kappa$ B/Arg2, що призводить до зниження біодоступності NO та зниження рівня cGMP. Лікування анти-TNF- $\alpha$  зменшує як суглобові симптоми, так і функцію ендотелію шляхом зниження рівнів LOX-1, судинного oxLDL та Arg2 (Akhmedov et al., 2022). Рівень sLOX-1 може бути корисним біомаркером для оцінювання клінічної ремісії та активності захворювання у пацієнтів з ревматоїдним артритом.

Показано, що лектиноподібний рецептор ox-LDL-1 (LOX-1) є важливим рецептором для ox-ЛПНЩ, які були

клоновані з культивованих ендотеліальних клітин аорти великої рогатої худоби і, як відомо, експресуються в багатьох різних типах клітин, включаючи ендотеліальні клітини, клітини гладенької мускулатури судин, макрофаги і хондроцити (Akhmedov et al., 2022; Hashimoto et al., 2018). Проведене оцінювання ролі LOX-1 у серцево-судинних захворюваннях. Показано, що під час запалення відбувається індукція рецептора окиснених ЛПНЩ, LOX-1, який залучений до утворення атеросклеротичних бляшок при гострому коронарному синдромі. Зазвичай експресія LOX-1 на ендотеліальних клітинах низька, але ФНП- $\alpha$ , окиснені ЛПНЩ та інші атеросклеротичні стимули значно підвищують експресію LOX-1 (Sagar et al., 2020). Мутації гена OLR1 пов'язані з атеросклерозом та ризиком інфаркту міокарда.

Останні дані свідчать про те, що лектиноподібна окиснена система ліпопротеїнів низької щільності (ox-LDL) рецептор-1 (LOX-1)/ox-LDL може брати участь у патогенезі артриту. LOX-1-позитивні синовіальні клітини та хондроцити є потенційними терапевтичними мішенями для профілактики артриту (Hashimoto et al., 2018).

Згідно з проведеним аналізом літературних даних LRP1 та OLR1 належать до багатобудовних рецепторів в організмі, залучених до клітинної сигналізації, транспортуванні ліпопротеїнів та розвитку різних патологічних станів, включаючи запалення та окисний стрес. Зважаючи на отримані у процесі дослідження результати, було встановлено, що у хворих на остеоартрит у крові знижується експресія гена LRP1 і зростає експресія гена OLR1 порівняно з групою умовно здорових людей. У пацієнтів з остеоартритом після інфікування SARS-CoV-2 показано більш глибокі порушення експресії досліджуваних генів.

#### Дискусія і висновки

Зважаючи на дані літератури й отримані власні результати, виявлене у крові пацієнтів зниження експресії гена LRP1 та зростання експресії гена OLR1 свідчить про порушення метаболізму ліпопротеїнів в організмі, активацію вільнорадикальних процесів та розвиток системного запалення, що призводить до зниження протекції судин та ендотеліальної дисфункції у хворих на остеоартрит, яке посилюється за умов додаткового інфекційного навантаження на організм під дією SARS-CoV2-інфекції.

**Внесок авторів:** Юрій Тугаров – пошук та опрацювання фахової літератури за темою дослідження, аналіз сучасного стану проблеми, участь у проведенні експериментів, теоретичне обґрунтування результатів дослідження; Алевтина Юет – участь у проведенні експериментів, статистична обробка результатів дослідження; Катерина Дворченко – формування ідеї та мети роботи, постановка завдань, моделювання експерименту, планування методичних підходів, узагальнення результатів дослідження.

**Подяки, джерела фінансування.** Робота виконана на кафедрі біохімії Навчально-наукового центру "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка у рамках науково-дослідної теми "Патології суглобів різного генезу в постковідний період" (№ д/р 0122U001909, 2022–2024 рр.).

#### Список використаних джерел

- Abramoff, B., & Caldera, F.E. (2020). Osteoarthritis: Pathology, Diagnosis, and Treatment Options. *Med Clin North Am.*, 104(2), 293–311. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2019.10.007>
- Ailioaie, L.M., Ailioaie, C., & Litscher, G. (2022). Implications of SARS-CoV-2 Infection in Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 23(8), 4268. <https://doi.org/10.3390/ijms23084268>
- Akagi, M., Kanata, S., Mori, S., Itabe, H., Sawamura, T., & Hamanishi, C. (2007). Possible involvement of the oxidized low-density lipoprotein/lectin-like



oxidized lowdensity lipoprotein receptor-1 system in pathogenesis and progression of human osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 15, 281–290.

Akhmedov, A., Cruet, M., Simic, B., Kraler, S., Bonetti, N.R., Ospelt, C., Distler, O., Ciurea, A., Liberale, L., Jauhainen, M., Metso, J., Miranda, M., Cydecian, R., Schwarz, L., Fehr, V., Zilinyi, R., Amrollahi-Sharifabadi, M., Ntari, L., Karagianni, N., ... Lüscher, T.F. (2022). TNF $\alpha$  induces endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis via LOX-1 and arginase 2: reversal by monoclonal TNF $\alpha$  antibodies. *Cardiovasc Res.*, 7, 118(1), 254–266. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab005>

Billah, M. A., Miah, M. M., & Khan, M. N. (2020). Reproductive number of coronavirus: A systematic review and meta-analysis based on global level evidence. *PLoS One*, 11, 15(11), e0242128. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242128>

Calvier, L., Boucher, P., Herz, J., & Hansmann, G. (2019). LRP1 deficiency in vascular SMC leads to pulmonary arterial hypertension that is reversed by PPAR $\gamma$  activation. *Circ Res.*, 124, 1778–1785.

Calvier, L., Herz, J., & Hansmann, G. (2022). Interplay of Low-Density Lipoprotein Receptors, LRP1s, and Lipoproteins in Pulmonary Hypertension. *JACC Basic to Translational Science*, 7(2), 164–180. <https://doi.org/10.1016/j.jacbs.2021.09.011>

Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162(1), 156–159. <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>

Dietert, K., Mahesula, S., Hegde, S., Verschelde, J., Reed, P., Sprague, S., Kokovay, E., & Sayre, N.L. (2023). Loss of LRP1 in Adult Neural Stem Cells Impairs Migration to Ischemic Lesions. *Stem. Cells.*, 15, 41(6), 570–577. <https://doi.org/10.1093/stmcsls/sxad034>

Faissner, A. (2023). Low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP1) in the glial lineage modulates neuronal excitability. *Front. Netw. Physiol.*, 3, 1190240. <https://doi.org/10.3389/fnetp.2023.1190240>

Hashimoto, K., Oda, Y., Nakagawa, K., Ikeda, T., Ohtani, K., & Akagi, M. (2018). LOX-1 deficient mice show resistance to zymosan-induced arthritis. *Eur. Journal Histochem.*, 62(1), 2847. <https://doi.org/10.4081/ejh.2018.2847>

He, Z., Wang, G., Wu, J., Tang, Z., & Luo, M. (2021). The molecular mechanism of LRP1 in physiological vascular homeostasis and signal transduction pathways. *Biomed. Pharmacother.*, 139, 111667. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111667>

Ishikawa, M., Ito, H., Furu, M., Hashimoto, M., Fujii, T., Okahata, A., Mimori, T., & Matsuda, S. (2016). Plasma sLOX-1 is a potent biomarker of clinical remission and disease activity in patients with seropositive RA. *Mod. Rheumatol.*, 26(5), 696–701. <https://doi.org/10.3109/14397595.2015.1128871>

Jovani, V., Pascual, E., Vela, P., & Andrés, M. (2021). Acute arthritis following SARS-CoV-2 infection. *Journal Med. Virol.*, 93(2), 661. <https://doi.org/10.1002/jmv.26440>

Kirtipal, N., Bharadwaj, S., & Kang, S.G. (2020). From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. *Infect. Genet. Evol.*, 85, 104502. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104502>

Livak, K., & Schmittgen, T. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 $^{-\Delta\Delta C_T}$  (T). *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

McConnell, S., Kolopack, P., & Davis, A.M. (2001). The Western Ontario and McMaster universities osteoarthritis index (WOMAC): a review of its utility and measurement properties. *Arthritis Care Res.*, 45(5), 453–461. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200110\)45:5<453::aid-art365>3.0.co;2-w](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200110)45:5<453::aid-art365>3.0.co;2-w)

Motta, F., Barone, E., Sica, A., & Selmi, C. (2023). Inflammation and Osteoarthritis. *Clin. Rev. Allergy. Immunol.*, 64(2), 222–238. <https://doi.org/10.1007/s12016-022-08941-1>

Munshaw, S., Redpath, A.N., Pike, B.T., & Smart, N. (2023). Thymosin  $\beta_4$  preserves vascular smooth muscle phenotype in atherosclerosis via regulation of low density lipoprotein related protein 1 (LRP1). *International Immunopharmacol.*, 115, 109702. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.109702>

Muralidar, S., Ambi, S.V., Sekaran, S., & Krishnan, U.M. (2020). The emergence of COVID-19 as a global pandemic: Understanding the epidemiology, immune response and potential therapeutic targets of SARS-CoV-2. *Biochimie.*, 179, 85–100. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.09.018>

Nakagawa, T., Akagi, M., Hoshikawa, H., Chen, M., Yasuda, T., & Mukai, S. (2002). Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates leukocyte infiltration and articular cartilage destruction in rat zymosan-induced arthritis. *Arthritis Rheum.*, 46, 2486–2494.

Nakagawa, T., Yasuda, T., Hoshikawa, H., Shimizu, M., Kakinuma, T., & Chen, M. (2002). LOX-1 expressed in cultured rat chondrocytes mediates oxidized LDL-induced cell death-possible role of dephosphorylation of Akt. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 299, 91–97.

Parasher, A. (2021). COVID-19: Current understanding of its Pathophysiology, Clinical presentation and Treatment. *Postgrad. Med. Journal*, 97(1147), 312–320. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2020-138577>

Pratt, J., Haidara, K., & Annabi, B. (2022). MT1-MMP Expression Levels and Catalytic Functions Dictate LDL Receptor-Related Protein-1 Ligand Internalization Capacity in U87 Glioblastoma Cells. *Int J Mol Sci.*, 23(22), 14214. <https://doi.org/10.3390/ijms232214214>

Ruiz-Del-Valle, V., Sarabia de Ardanaz, L., Navidad-Fuentes, M., Martín-Martín, I., & Lobato-Cano, R. (2022). Reactive arthritis with SARS-COV-2 as a trigger. *Rheumatol. Clin. (Engl. Ed.)*, 18(8), 490–492. <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2021.11.002>

Sagar, D., Gaddipati, R., Ongstad, E.L., Bhagroo, N., An, L.L., Wang, J., Belkhdja, M., Rahman, S., Manna, Z., Davis, M.A., Hasni, S., Siegel, R., Sanjuan, M., Grimsby, J., Kolbeck, R., Karathanasis, S., Sims, G.P., & Gupta, R. (2020). LOX-1: A potential driver of cardiovascular risk in SLE patients. *PLoS One*, 17, 15(3), e0229184. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229184>

Simopoulou, T., Malizos, K.N., & Tsezou, A. (2007). Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor 1 (LOX-1) expression in human articular chondrocytes. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 25, 605–612.

Sizova, O., John, L., S., Ma, Q., & Molldrem, J.J. (2023). Multi-faceted role of LRP1 in the immune system. *Front. Immunol.*, 14, 1166189. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1166189>

Taleghani, N., & Taghipour, F. (2021). Diagnosis of COVID-19 for controlling the pandemic: A review of the state-of-the-art. *Biosens. Bioelectron.*, 15, 174, 112830. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112830>

Wendling, D., Verhoeven, F., Chouk, M., & Prati, C. (2021). Can SARS-CoV-2 trigger reactive arthritis? *Joint. Bone Spine*, 88(1), 105086. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2020.105086>

Wujak, L., Schnieder, J., Schaefer, L., & Wygrecka, M. (2018). LRP1: a chameleon receptor of lung inflammation and repair. *Matrix Biol.*, 68-69, 366–381.

Yao, Q., Wu, X., Tao, C., Gong, W., Chen, M., Qu, M., Zhong, Y., He, T., Chen, S., & Xiao, G. (2023). Osteoarthritis: pathogenic signaling pathways and therapeutic targets. *Signal. Transduct. Target. Ther.*, 3, 8(1), 56. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01330-w>

Yamamoto, K., Troeberg, L., Scilabra, S., Pelosi, M., Murphy, C., Strickland, D., & Nagase H. (2013). LRP-1-mediated endocytosis regulates extracellular activity of ADAMTS-5 in articular cartilage. *FASEB*, 27(2), 511–521. <https://doi.org/10.1096/fj.12-216671>

## References

Abramoff, B., & Caldera, F.E. (2020). Osteoarthritis: Pathology, Diagnosis, and Treatment Options. *Med Clin North Am.*, 104(2), 293–311. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2019.10.007>

Ailioaie, L.M., Ailioaie, C., & Litscher, G. (2022). Implications of SARS-CoV-2 Infection in Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 23(8), 4268. <https://doi.org/10.3390/ijms23084268>

Akagi, M., Kanata, S., Mori, S., Itabe, H., Sawamura, T., & Hatanishi, C. (2007). Possible involvement of the oxidized low-density lipoprotein/lectin-like oxidized lowdensity lipoprotein receptor-1 system in pathogenesis and progression of human osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 15, 281–290.

Akhmedov, A., Cruet, M., Simic, B., Kraler, S., Bonetti, N.R., Ospelt, C., Distler, O., Ciurea, A., Liberale, L., Jauhainen, M., Metso, J., Miranda, M., Cydecian, R., Schwarz, L., Fehr, V., Zilinyi, R., Amrollahi-Sharifabadi, M., Ntari, L., Karagianni, N., ... Lüscher, T.F. (2022). TNF $\alpha$  induces endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis via LOX-1 and arginase 2: reversal by monoclonal TNF $\alpha$  antibodies. *Cardiovasc Res.*, 7, 118(1), 254–266. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab005>

Billah, M. A., Miah, M. M., & Khan, M. N. (2020). Reproductive number of coronavirus: A systematic review and meta-analysis based on global level evidence. *PLoS One*, 11, 15(11), e0242128. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242128>

Calvier, L., Boucher, P., Herz, J., & Hansmann, G. (2019). LRP1 deficiency in vascular SMC leads to pulmonary arterial hypertension that is reversed by PPAR $\gamma$  activation. *Circ Res.*, 124, 1778–1785.

Calvier, L., Herz, J., & Hansmann, G. (2022). Interplay of Low-Density Lipoprotein Receptors, LRP1s, and Lipoproteins in Pulmonary Hypertension. *JACC Basic to Translational Science*, 7(2), 164–180. <https://doi.org/10.1016/j.jacbs.2021.09.011>

Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162(1), 156–159. <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>

Dietert, K., Mahesula, S., Hegde, S., Verschelde, J., Reed, P., Sprague, S., Kokovay, E., & Sayre, N.L. (2023). Loss of LRP1 in Adult Neural Stem Cells Impairs Migration to Ischemic Lesions. *Stem. Cells.*, 15, 41(6), 570–577. <https://doi.org/10.1093/stmcsls/sxad034>

Faissner, A. (2023). Low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP1) in the glial lineage modulates neuronal excitability. *Front. Netw. Physiol.*, 3, 1190240. <https://doi.org/10.3389/fnetp.2023.1190240>

Hashimoto, K., Oda, Y., Nakagawa, K., Ikeda, T., Ohtani, K., & Akagi, M. (2018). LOX-1 deficient mice show resistance to zymosan-induced arthritis. *Eur. Journal Histochem.*, 62(1), 2847. <https://doi.org/10.4081/ejh.2018.2847>

He, Z., Wang, G., Wu, J., Tang, Z., & Luo, M. (2021). The molecular mechanism of LRP1 in physiological vascular homeostasis and signal transduction pathways. *Biomed. Pharmacother.*, 139, 111667. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111667>

Ishikawa, M., Ito, H., Furu, M., Hashimoto, M., Fujii, T., Okahata, A., Mimori, T., & Matsuda, S. (2016). Plasma sLOX-1 is a potent biomarker of clinical remission and disease activity in patients with seropositive RA. *Mod. Rheumatol.*, 26(5), 696–701. <https://doi.org/10.3109/14397595.2015.1128871>

Jovani, V., Pascual, E., Vela, P., & Andrés, M. (2021). Acute arthritis following SARS-CoV-2 infection. *Journal Med. Virol.*, 93(2), 661. <https://doi.org/10.1002/jmv.26440>

Kirtipal, N., Bharadwaj, S., & Kang, S.G. (2020). From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. *Infect. Genet. Evol.*, 85, 104502. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104502>

Livak, K., & Schmittgen, T. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

McConnell, S., Kolopack, P., & Davis, A.M. (2001). The Western Ontario and McMaster universities osteoarthritis index (WOMAC): a review of its utility and measurement properties. *Arthritis Care Res.*, 45(5), 453–461. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200110\)45:5<453::aid-art365>3.0.co;2-w](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200110)45:5<453::aid-art365>3.0.co;2-w)

Motta, F., Barone, E., Sica, A., & Selmi, C. (2023). Inflammaging and Osteoarthritis. *Clin. Rev. Allergy. Immunol.*, 64(2), 222–238. <https://doi.org/10.1007/s12016-022-08941-1>

Munshaw, S., Redpath, A.N., Pike, B.T., & Smart, N. (2023). Thymosin  $\beta$ 4 preserves vascular smooth muscle phenotype in atherosclerosis via regulation of low density lipoprotein related protein 1 (LRP1). *International Immunopharmacol.*, 115, 109702. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.109702>

Muralidar, S., Ambi, S.V., Sekaran, S., & Krishnan, U.M. (2020). The emergence of COVID-19 as a global pandemic: Understanding the epidemiology, immune response and potential therapeutic targets of SARS-CoV-2. *Biochimie.*, 179, 85–100. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.09.018>

Nakagawa, T., Akagi, M., Hoshikawa, H., Chen, M., Yasuda, T., & Mukai, S. (2002). Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates leukocyte infiltration and articular cartilage destruction in rat zymosan-induced arthritis. *Arthritis Rheum.*, 46, 2486–2494.

Nakagawa, T., Yasuda, T., Hoshikawa, H., Shimizu, M., Kakinuma, T., & Chen, M. (2002). LOX-1 expressed in cultured rat chondrocytes mediates oxidized LDL-induced cell death-possible role of dephosphorylation of Akt. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 299, 91–97.

Parasher, A. (2021). COVID-19: Current understanding of its Pathophysiology, Clinical presentation and Treatment. *Postgrad. Med. Jjournal*, 97(1147), 312–320. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2020-138577>

Pratt, J., Haidara, K., & Annabi, B. (2022). MT1-MMP Expression Levels and Catalytic Functions Dictate LDL Receptor-Related Protein-1 Ligand Internalization Capacity in U87 Glioblastoma Cells. *Int J Mol Sci.*, 23(22), 14214. <https://doi.org/10.3390/ijms232214214>

Ruiz-Del-Valle, V., Sarabia de Ardanaz, L., Navidad-Fuentes, M., Martín-Martín, I., & Lobato-Cano, R. (2022). Reactive arthritis with SARS-CoV-2 as

a trigger. *Reumatol. Clin. (Engl. Ed.)*, 18(8), 490–492. <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2021.11.002>

Sagar, D., Gaddipati, R., Ongstad, E.L., Bhagroo, N., An, L.L., Wang, J., Belkhdja, M., Rahman, S., Manna, Z., Davis, M.A., Hasni, S., Siegel, R., Sanjuan, M., Grimsby, J., Kolbeck, R., Karathanasis, S., Sims, G.P., & Gupta, R. (2020). LOX-1: A potential driver of cardiovascular risk in SLE patients. *PLoS One*, 17, 15(3), e0229184. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229184>

Simopoulou, T., Malizos, K.N., & Tsezou, A. (2007). Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor 1 (LOX-1) expression in human articular chondrocytes. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 25, 605–612.

Sizova, O., John, L., S., Ma, Q., & Moldrem, J.J. (2023). Multi-faceted role of LRP1 in the immune system. *Front. Immunol.*, 14, 1166189. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1166189>

Taleghani, N., & Taghipour, F. (2021). Diagnosis of COVID-19 for controlling the pandemic: A review of the state-of-the-art. *Biosens. Bioelectron.*, 15, 174, 112830. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112830>

Wendling, D., Verhoeven, F., Chouk, M., & Prati, C. (2021). Can SARS-CoV-2 trigger reactive arthritis? *Joint. Bone Spine*, 88(1), 105086. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2020.105086>

Wujak, L., Schnieder, J., Schaefer, L., & Wygrecka, M. (2018). LRP1: a chameleon receptor of lung inflammation and repair. *Matrix Biol.*, 68–69, 366–381.

Yao, Q., Wu, X., Tao, C., Gong, W., Chen, M., Qu, M., Zhong, Y., He, T., Chen, S., & Xiao, G. (2023). Osteoarthritis: pathogenic signaling pathways and therapeutic targets. *Signal. Transduct. Target. Ther.*, 3, 8(1), 56. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01330-w>

Yamamoto, K., Troeberg, L., Scilabra, S., Pelosi, M., Murphy, C., Strickland, D., & Nagase H. (2013). LRP-1-mediated endocytosis regulates extracellular activity of ADAMTS-5 in articular cartilage. *FASEB*, 27(2), 511–521. <https://doi.org/10.1096/fj.12-216671>

Отримано редакцією журналу / Received: 06.09.23

Прорецензовано / Revised: 06.09.23

Схвалено до друку / Accepted: 05.10.23

Yuriy TUGAROV, PhD Student  
ORCID ID: 0000-0002-1583-6279  
e-mail: tugarovdoc@gmail.com  
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

Alevtyna HUET, PhD (Biol.)  
ORCID ID: 0000-0002-6511-2201  
e-mail: alevtina.dranitsina@gmail.com  
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

Kateryna DVORSHCHENKO, DSc (Biol.)  
ORCID ID: 0000-0003-3118-9355  
e-mail: kateryna.dvorshchenko@knu.ua  
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

## EXPRESSION OF *LRP1* AND *OLR1* GENES IN THE BLOOD OF PATIENTS WITH OSTEOARTHRITIS AFTER SARS-CoV2 INFECTION

**Background.** Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection was first reported in Wuhan, China in December 2019, and then spread rapidly worldwide, causing an estimated 771 million active cases with ~7 million deaths as of September 2023. The pandemic of the new coronavirus SARS-CoV-2 poses a great threat to the world in many aspects: medical, social, economic and other. A comprehensive understanding of the interaction of the virus with the body is fundamentally important in the fight against SARS-CoV-2. During the 2019 coronavirus disease (Coronavirus disease 2019, COVID-19), epithelial cells of the respiratory tract are affected, which is manifested by symptoms of a respiratory infection. The SARS-CoV-2 virus, as an infectious trigger, causes damage to other organ systems, in particular, the musculoskeletal system, and can also complicate the condition of patients with comorbid diseases.

**Methods.** The aim of the work was to determine the expression of *LRP1* and *OLR1* genes in the blood of patients with osteoarthritis after SARS-CoV2 infection. All study participants were divided into three groups. The first group ( $n = 10$ ) is conditionally healthy people. The second group ( $n = 22$ ) – patients with osteoarthritis of the knee joints II-III degree. The third group ( $n = 14$ ) is patients with osteoarthritis of the knee joints II-III degree, who suffered a mild and moderate form of COVID-19 6–9 months ago. The expression of *LRP1* and *OLR1* genes was determined in the blood. RNA was obtained by the Chomczynski method. Synthesis of cDNA and quantitative polymerase chain reaction in real time (Real-time PCR, qPCR) using the commercial kit "Thermo Scientific Verso SYBR Green 1-Step qRT-PCR ROX Mix" ("Thermo Scientific, Lithuania). Processing of research results was carried out using generally accepted methods of variational statistics.

**Results.** In the blood of patients with osteoarthritis, the expression of the *LRP1* gene decreases and the expression of the *OLR1* gene increases compared to a group of conditionally healthy people. In patients with osteoarthritis after infection with SARS-CoV-2, more significant violations of the expression of the studied genes are shown.

**Conclusions.** The obtained data indicate a violation of the metabolism of lipoproteins in the body, the activation of free radical processes and the development of systemic inflammation, which leads to a decrease in vascular protection and endothelial dysfunction in patients with osteoarthritis, which increases under conditions of additional infectious load on the body under the influence of SARS-CoV2 infection.

**Keywords:** SARS-CoV-2, osteoarthritis, blood, *LRP1*, *OLR1* gene expression, lipid metabolism, inflammation, oxidative stress.

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів. Спонсори не брали участі в розробленні дослідження; у зборі, аналізі чи інтерпретації даних; у написанні рукопису; в рішенні про публікацію результатів.

The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; in the decision to publish the results.

УДК 577.122.8  
DOI: 10.17721/1728.2748.2023.94.41-45

Maryna KALASHNIKOVA, Student  
ORCID ID: 0000-0002-2600-4806

e-mail: maryna.kalashnikova@knu.ua

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

Olexiy SAVCHUK, Student  
ORCID ID: 0009-0005-3743-4763

e-mail: oleksiisavchuk@knu.ua

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

Vitaliy KARBOVSKIY, PhD (Biol.)

ORCID ID: 0000-0003-2226-0914

e-mail: Vkarbovskyy@gmail.com

LLC BIOPHARMA PLASMA, Kyiv, Ukraine

## OPTIMIZATION OF AN ENZYME ELECTROPHORESIS METHOD FOR USING COLLAGEN AS A SUBSTRATE

**Background.** The optimized method of collagen-containing sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide electrophoresis is introduced in this work. The main parameters that affect the efficiency and resolution of the method are the degree of sample dilution, the concentration of separation gel, the concentration of collagen solution which was used as a substrate, time of electrophoretic separation elongation. In order to investigate all active and pro-active forms of plasmin, all samples were prepared in two variations: with supplementary activation by streptokinase (Sk) addition, and without.

**Methods.** To obtain clearly visible and detectable lysis points, samples with Sk were diluted in a ratio of 1:16, and samples without Sk were diluted in a ratio of 1:8. To prevent substrate migration and the loss of proteins' electrophoretic mobility, the concentration of was 15 % separation gel, and the concentration of copolymerized collagen solution was 1 mg/ml. To obtain the most informative results, the time of electrophoresis elongation was 15 min. After electrophoresis gels were washed in 2,5 % Triton X-100 solution for 1 hour and stained according to a standard protocol.

**Results.** As a result of the conducted research, the optimal conditions for carrying out this enzyme-electrophoresis modification were found, according to all analytical manipulations, and methodical approaches to the detection of latent pro-enzymatic forms of enzymes with collagenolytic activity were shown.

**Conclusions.** This modified technique can be used for quantitative and qualitative analysis of the presence of collagenolytic activity in various samples and allows research of enzymes that possess this activity, both from a scientific point of view, and in the process of finding and developing technologies for obtaining collagenolytic enzymes for biotechnological purposes.

**Keywords:** enzyme electrophoresis, collagen, collagenolytic activity, proteolytic activity.

### Background

The human genome has more than 500 genes that encode proteases or protease-like molecules, where the largest classes are metalloproteinases (MMPs) and serine proteases (Kundapur, 2013). These enzymes regulate a lot of biological processes. For example, MMPs are important for tissue repair and remodeling, they also play a crucial role in different pathological processes, so that they were used as diagnostic tools or therapeutic targets in a wide range of diseases. Several approaches for detecting and identifying proteolytic activity in various samples have been developed, but enzyme electrophoresis remains to be the preferred one due to its simplicity and quality (Choi et al., 2008; Tajhya et al., 2017).

Enzyme electrophoresis is based on a standard sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis technique with an incorporated substrate that allows scientists to detect active enzymes by substrate degradation (Wilkesman, 2009). This method has a lot of advantages, for example, this technique gives both quantitative and qualitative information, it allows not only to detect the presence of different enzymes but also to identify them by molecular weight. In addition, both pro-enzymatic and active forms can be distinguished by zymography (Snoek-van Beurden, & Von den Hoff, 2005). However, the main advantage of this method is that it can be developed for the detection of different proteases by incorporating a suitable substrate such as fibrinogen, gelatin, casein, and collagen (Choi et al., 2004).

The inclusion of native collagen fibers in PAAG seemed to be inappropriate due to its complex structure. However, this problem was solved by SDS presence. SDS

disrupts most of the fibrillar collagen organization, which allows proteins to easily migrate through the gel and partially reserve their electrophoretic mobility (Gogly et al., 1998). The first data indicating the successful identification of active collagenase were obtained by Gogly and colleagues (Gogly et al., 1998) in their study on the use of copolymerized native collagen I in SDS-PAGE for the determination of interstitial collagenase. Although collagen zymography had been proven to be more sensitive than gelatin zymography because it can detect up to 0.1 pg of active collagenase (MMP-1) (Gogly et al., 1998), gelatin is still a commonly used substrate for protease detection and the information of collagen usage is limited.

In this study, we present an optimized method of collagen enzyme electrophoresis for qualitative and quantitative detection of collagenolytic activity in samples. The main advantages of this technique are that it prevents substrate migration through the gel and provides a better level of washing and staining steps for gaining clearly detectable results.

### Methods

Tris, acrylamide, N,N'-methylene-bis-acrylamide, ammonium persulfate (APS), N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), sodium dodecyl sulfate (SDS), Triton X-100, glycine, Coomassie G-250, were purchased from GE Healthcare AB, Sweden. Streptokinase was obtained from Kabi Pharmacia AG, Sweden.

To test the technique we used blood plasma from donors, who had recovered from COVID-19. According to the available scientific literature (Rachkovska et al., 2023), the post-COVID period is characterized by hemostatic



disorders, which can lead to an increase in proteolytic activity in the blood stream.

Samples were prepared in two variations, according to a protocol (Bratchik, 1993): 1) blood plasma was diluted in distilled water in a ratio of 1:10 without streptokinase (Sk) addition in order to investigate the whole content of active plasminogen/plasmin forms; 2) blood plasma was incubated with Sk for 10 min at 37 °C before dilution to examine pro-enzymatic forms with plasminogen origin present in the bloodstream. Then, all samples were incubated with 0,25 % acetic acid for 30 min at 4 °C and centrifugated for 15 min at 10,000 g. The precipitate was mixed with a sample buffer in an appropriate volume and stored before electrophoresis at 4 °C without boiling or the addition of any reducing agent, in order to prevent the loss of enzymatic activity.

Collagen zymography was conducted in several steps. A separation gel with collagen was incubated for 1 hour at room temperature in order to gain an appropriate polymerization. Electrophoresis was carried out at 36 mA for concentration gel and at 72 mA for separation gel. Then the gel was incubated with a non-ionic detergent, 2.5 % Triton X-100 solution for 1 h with gentle orbital shaking to remove the SDS. This step is necessary for enzyme and substrate renaturation, it also helps to prevent the irreversible denaturation of some enzymes and the total loss of their activity. Subsequently, gels were incubated in Tris-buffered saline solution with pH 7.4 for 12 h at 37 °C, in order to activate the enzyme and ensure that the substrate

was hydrolyzed at its stopping points in the gel. After the obtained gel was stained with Coomassie Brilliant Blue and washed to detect lysis spots. The results were detected as clear lysis points on a dark background. As markers of molecular weight were used trypsin (23 kDa) and plasmin (85, 44, 36 kDa). Plasmin was prepared according to a standard protocol (Wiman, 1973).

### Results

We determined the main parameters that can affect the quality of electrophoresis: 1) degree of sample dilution; 2) concentration of separation gel; 3) concentration of collagen solution which was added to the separation gel as a substrate; 4) time of electrophoretic separation elongation after sample front line extends beyond gel into a buffer for electrophoresis.

Testing samples without dilution can lead to excessive hydrolysis of the substrate, making the results difficult to analyze. However, the greater the sample dilution, the smaller the lysis points. The optimum degree of sample dilution was investigated by placing identical samples with and without Sk on different gels with dilutions of 4, 8, and 16 times. Samples with Sk diluted 16 times (Fig. 1a), compared to the others, formed a larger number of bands evenly distributed across the gel (it is shown by arrows that point to the lysis areas). On the opposite, samples without Sk diluted 8 times (Fig. 1b) allowed us to detect a larger number of clearly visible bands (it is shown by arrows that point to the lysis areas).

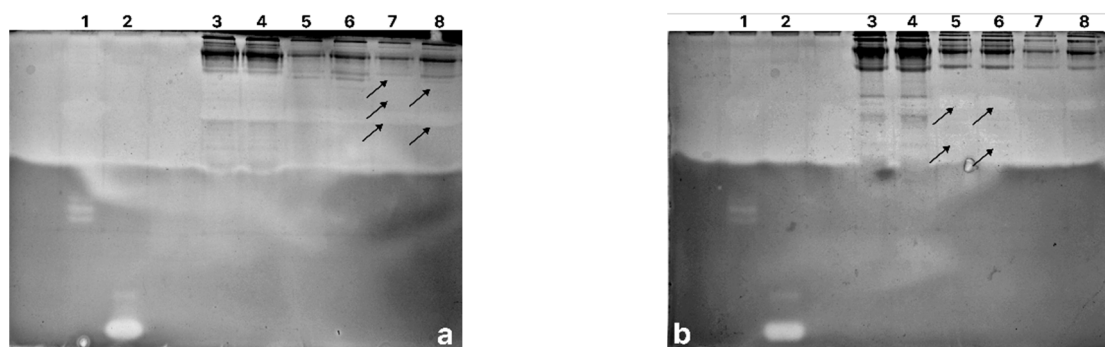


Fig. 1. Enzyme electrophoregram of donors' blood plasma incubated with Sk (a), and with out additional incubation with Sk (b): 1 – plasmin standard (MW 85, 44, 36 kDa); 2 – trypsin standard (MW 23 kDa); 3, 4 – samples diluted 4 times, with 0 Index (S/C) titer of anti-SARS-CoV-2 IgG; 5, 6 – samples diluted 8 times, with 0 Index (S/C) titer of anti-SARS-CoV-2 IgG; 7, 8 – samples diluted 16 times, with 0 Index (S/C) titer of anti-SARS-CoV-2 IgG

The concentration of separation gel, due to pore size, has a great impact on a protein's electrophoretic mobility, substrate incorporation, and its ability to migrate through the gel. We revealed that the 10 % separation gel caused

substrate migration and neither m. w. markers nor samples were not detectable (Fig. 2, the arrow points to the line of collagen migration).

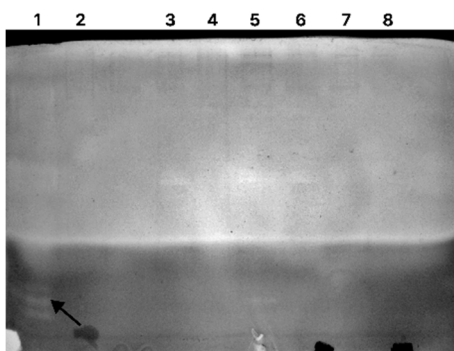
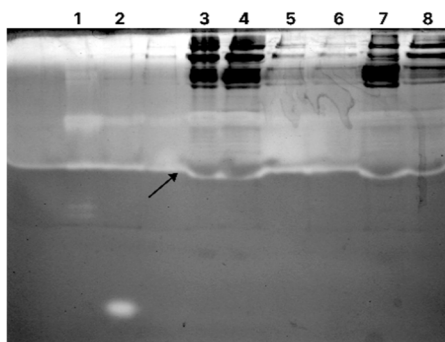


Fig. 2. Enzyme electrophoregram of donors' blood plasma incubated with Sk, separated in 10 % gel: 1 – plasmin standard (MW 85, 44, 36 kDa); 2 – trypsin standard (MW 23 kDa); 3, 4, 5 – sample diluted 16 times, with  $10 \pm 3$  Index (S/C) titer of anti-SARS-CoV-2 IgG; 6, 7, 8 – sample diluted 16 times, with  $55 \pm 5$  Index (S/C) titer of anti-SARS-CoV-2 IgG



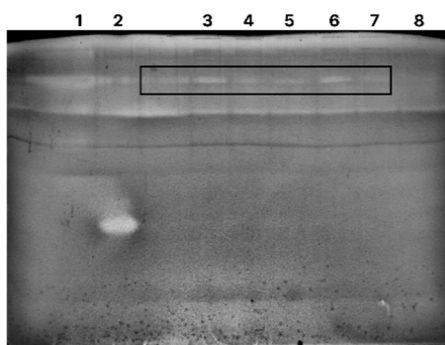
On the opposite, 12 % gel prevented the loss of samples and allowed to get distinct lysis points, but it failed with

substrate migration (Fig. 3, the arrow in the middle points to the line of collagen migration).



**Fig. 3. Enzyme electrophoregram of donors' blood plasma incubated with Sk, separated in 12 % gel:**  
1 – plasmin standard (MW 85, 44, 36 kDa); 2 – trypsin standard (MW 23 kDa); 3, 4, 5 – samples diluted 16 times, with 0 Index (S/C) titer of anti-SARS-CoV-2 IgG; 6, 7, 8 – samples diluted 16 times, with  $10 \pm 3$  Index (S/C) titer of anti-SARS-CoV-2 IgG

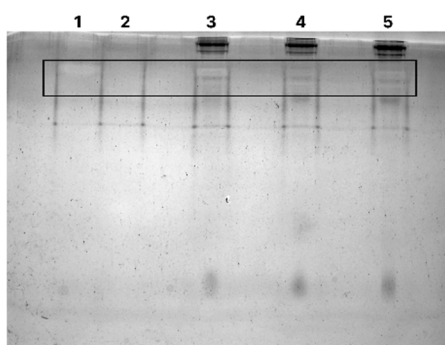
Fig. 4 shows that the 15 % separation gel contributes to keeping collagen from migrating out of the gel and the formation of evenly distributed, clearly visible markers and samples (the square on the gel shows the line of lysis points).



**Fig. 4. Enzyme electrophoregram of donors' blood plasma incubated with Sk, separated in 15 % gel:**  
1 – plasmin standard (MW 85, 44, 36 kDa); 2 – trypsin standard (MW 23 kDa); 3, 4, 5 – sample diluted 16 times, with  $10 \pm 3$  Index (S/C) titer of anti-SARS-CoV-2 IgG; 6, 7, 8 – sample diluted 16 times, with  $55 \pm 5$  Index (S/C) titer of anti-SARS-CoV-2 IgG

We determined that 18 % gel, shown in Fig. 5 has a critically low pore size, so that samples weren't able to

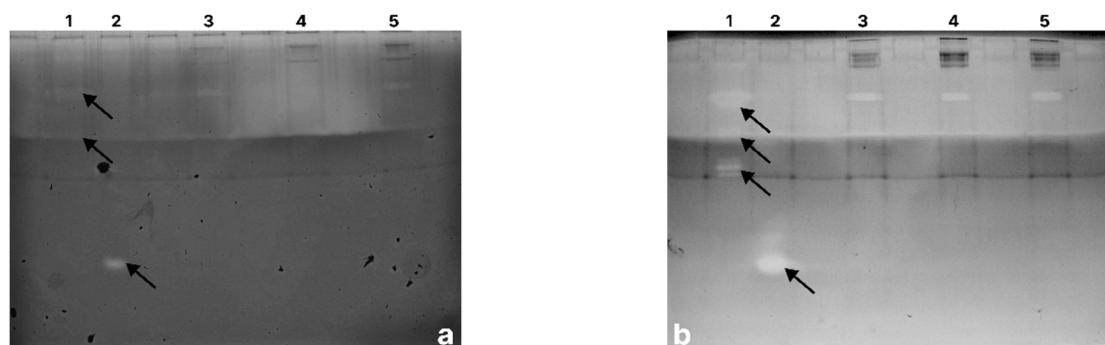
normally migrate and separate through the gel (the square on the gel shows the front of samples and marker).



**Fig. 5. Enzyme electrophoregram of donors' blood plasma incubated with Sk, separated in 18 % gel:**  
1 – plasmin standard (MW 85, 44, 36 kDa); 2 – trypsin standard (MW 23 kDa);  
3, 4, 5 – samples diluted 16 times, with 0 Index (S/C) titer of anti-SARS-CoV-2 IgG

The concentration of substrate copolymerized in to the separation gel can affect the protein's ability to migrate through the gel and the quality of washing gel after staining. It was found that a 2 mg/ml collagen solution cause poor washing of the gel after staining, which made both markers and samples badly visible (Fig. 6a, the arrows point to the

markers). In contrast, the zymogram in Fig. 6b shows that the collagen solution with a concentration of 1 mg/ml contributed to better washing after staining, which allowed us to obtain clearly visible molecular weight markers and samples (the arrows on the gel also point to the markers).

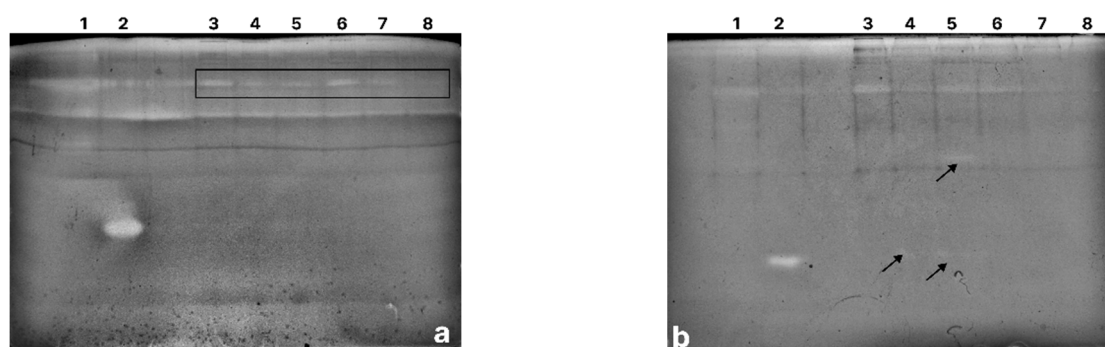


**Fig. 6. Enzyme electrophoregram of donors' blood plasma in cubated with Sk, separated in 15 % gel with incorporated 2 mg/ml (a), and 1 mg/ml (b) collagensolution: 1 – plasmin standard (MW 85, 44, 36 kDa); 2 – trypsin standard (MW 23 kDa); 3, 4, 5 – samples diluted 16 times, with 0 Index (S/C) titer of anti-SARS-CoV-2 IgG**

Despite the fact that substrate incorporation practically does not create additional obstacles to the protein's movement through the gel, their electrophoretic mobility is still reduced to some extent, which can be detected by m. w. markers. So the time of electrophoretic separation needs to be elongated after the sample front line extends beyond the gel into the buffer for electrophoresis.

The extension time in 10 min resulted in sample concentration in the upper part of the gel, and the frontline

of the markers was higher than expected (Fig. 7a, the square on the gel shows samples' concentration in the upper part of the gel). In contrast, Fig. 7b indicates that extending the electrophoretic separation by 15 min contributes to the formation of a clearer and more elongated exit line for both markers and samples, which caused formation a greater number of bands (the arrows on the gel point to the lysis points distributed across the gel).



**Fig. 7. Enzyme electrophoregram of donors' blood plasma incubated with Sk, with time of electrophoretic separation elongation 10 min (a), and 15 min (b): 1 – plasmin standard (MW 85, 44, 36 kDa); 2 – trypsin standard (MW 23 kDa); 3, 4, 5 – sample diluted 16 times, with 10 ± 3 Index (S/C) titer of anti-SARS-CoV-2 IgG; 6, 7, 8 – sample diluted 16 times, with 55 ± 5 Index (S/C) titer of anti-SARS-CoV-2 IgG**

## Discussion and conclusions

We found the most appropriate conditions for conducting enzyme-electrophoresis using collagen as a substrate. This optimized technique can be used to test the presence of collagenolytic activity, identify enzymes due to their molecular weight, and compare enzymatic activity in different samples.

**Authors' contribution:** Maryna Kalashnikova – conducting the experiment and calculations, writing the article; Olexiy Savchuk – conducting the experiment and calculations; Vitaliy Karbovskiy – the idea and conceptual provisions of the conducted research, writing the article.

## References

- Bratchik, A.M. (1993). *Clinical Problems of Fibrinolysis*. Zdorovye, 344 p. [In Ukrain]. [Братчик, А.М. (1993). *Клінічні проблеми фібринолізу*. Здоров'я, 344 с.]
- Choi, N.S., Kim, B.H., Park, C.S., Han, Y.J., Lee, H.W., Choi, J.H., Lee, S.G., & Song, J.J. (2008). Multiple-layer substrate zymography for detection of several enzymes in a single sodium dodecyl sulfate gel. *Anal. Biochem.*, 386(1), 121-122. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.11.007>
- Choi, N.S., Yoo, K.H., Yoon, K.S., Maeng, P.J., & Kim, S.H. (2004). Nano-scale proteomics approach using two-dimensional fibrin zymography combined with fluorescent SYPRO ruby dye. *Journal Biochem. Mol. Biol.*, 37(3), 298-303. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2004.37.3.298>

- Gogly, B., Groult, N., Hornebeck, W., Godeau, G., & Pellat, B. (1998). Collagen zymography as a sensitive and specific technique for the determination of subpicogram levels of interstitial collagenase. *Anal. Biochem.*, 255(2), 211-216. <https://doi.org/10.1006/abio.1997.2318>
- Kundapur, R. (2013). Zymography: Enzymes in Action. *Science International*, 1, 70-75. <https://doi.org/10.5567/sciintl.2013.70.75>
- Rachkovska, A., Krenytska, D., Karbovskyy, V., Raksha, N., Halenova, T., Vovk T, Savchuk O, & Ostapchenko L. (2023). A study of fibrinolytic system components in donor groups depending on various titers of circulating anti-SARS-CoV-2 IgG in the bloodstream. *Blood Coagul. Fibrinolysis*, 34(7), 439-445. <https://doi.org/10.1097/MB.0000000000001248>
- Snoek-van Beurden, P.A., & Von den Hoff, J.W. (2005). Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques*, 38(1), 73-83. <https://doi.org/10.2144/05381RV01>
- Tajhya, R.B., Patel, R.S., & Beeton, C. (2017). Detection of Matrix Metalloproteinases by Zymography. *Methods Mol Biol.*, 1579, 231-244. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6863-3\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6863-3_12)
- Wilkesman J. (2009). *Protease analysis by zymography: A Review on Techniques and Patents*. In J. Wilkesman, L. Kurz (Eds.). *Recent Patents on Biotechnology*, 3(3), 175-184. <https://doi.org/10.2174/187220809789389162>
- Wiman, B. (1973). Activation of human plasminogen by an insoluble derivative of urokinase. Structural changes of plasminogen in the course of activation to plasmin and demonstration of a possible intermediate compound. In B. Wiman, P. Wallen (Eds.). *European Journal of Biochemistry*, 36(1), 25-31. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1973.tb02880.x>

Отримано редакцією журналу / Received: 06.09.23  
Прорецензовано / Revised: 06.09.23  
Схвалено до друку / Accepted: 05.10.23

Марина КАЛАШНИКОВА, студ.  
ORCID ID: 0000-0002-2600-4806  
e-mail: maryna.kalashnikova@knu.ua  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

Олексій САВЧУК, студ.  
ORCID ID: 0009-0005-3743-4763  
e-mail: oleksiisavchuk@knu.ua  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

Віталій КАРБОВСЬКИЙ, канд. біол. наук  
ORCID ID: 0000-0003-2226-0914  
e-mail: Vkarbovskyy@gmail.com  
ТОВ "Біофарма Плазма", Київ, Україна

## ОПТИМІЗАЦІЯ МЕТОДУ ЕНЗИМ-ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ ДЛЯ ВИКОРИСТАННЯ ЯК СУБСТРАТ КОЛАГЕНУ

**Вступ.** Представлено оптимізований метод ензим-електрофорезу з використанням колагену як субстрату. Основними параметрами, що впливають на ефективність та роздільну здатність методу, є ступінь розведення проб, концентрація розподільчого гелю, концентрація розчину колагену, кополімеризованого в розподільчий гель та час продовження електрофоретичного розділення.

**Методи.** Для того, щоб дослідити всі активні та проактивні форми плазміну, усі зразки були приготовлені у двох варіаціях: з додатковою активацією, шляхом додавання стрептокінази (Ск), та без неї. Для отримання чітко видимих точок лізису зразки із Ск розводили у співвідношенні 1:16, а зразки без Ск розводили у співвідношенні 1:8. Для запобігання міграції субстрату та втрати електрофоретичної рухливості білків використовували розподільчий гель з концентрацією 15 %, а концентрація розчину колагену, кополімеризованого в гель, становила 1 мг/мл. Для отримання найбільш інформативних результатів час продовження електрофоретичного розділення становив 15 хв. Після електрофорезу гелі відмивали в 2,5 % розчині Тритон Х-100 протягом 1 год та фарбували відповідно до стандартного протоколу.

**Результати.** У результаті проведених досліджень було знайдено оптимальні умови проведення модифікації ензим-електрофорезу згідно з усіма аналітичними маніпуляціями та показано методичні підходи до виявлення латентних проферментних форм ензимів, яким властива колагенолітична активність.

**Висновки.** Описану модифіковану методику можна використовувати для кількісного та якісного аналізу наявності колагенолітичної активності в різних зразках, що дозволяє проводити дослідження ферментів, яким властива така активність, як з наукових позицій, так і в процесі пошуку та розроблення технологій отримання ферментів-колагенолітиків для біотехнологічних цілей.

**Ключові слова:** ензим-електрофорез, колаген, колагенолітична активність, протеолітична активність.

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів. Спонсори не брали участі в розробленні дослідження; у зборі, аналізі чи інтерпретації даних; у написанні рукопису; в рішенні про публікацію результатів.

The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; in the decision to publish the results.

UDC 159.91  
DOI: 10.17721/1728.2748.2023.94.46-53

Mariia CHERNYKH, PhD Student  
ORCID ID: 0000-0001-5091-5071  
e-mail: mariia.chernykh@knu.ua  
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

Ihor ZYMA, DSc (Biol.), Assoc. Prof.  
ORCID ID: 0009-0006-2192-5346  
e-mail: igzyna@gmail.com  
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

## **DISTORTED FACE PERCEPTION: AN ERP STUDY OF EMOTIONAL EXPRESSION PROCESSING**

**Background.** Reading the emotional cues from the faces of people around us is considered to be the crucial element of successful social interaction. However, at the moment there is no single point of view on the basic principles of the organization of neuromechanisms corresponding to face perception, which determines the relevance of this work. Therefore, we focused primarily on the effective neuronal networks formed during the processing of emotional visual stimuli – human faces, in their natural form and under the conditions of configurational changes' introduction. Current study aimed at highlighting more subtle elements of face perception and decoding mechanisms.

**Methods.** For the purpose of the study, blurred facial expressions were presented amongst the natural face images of different emotional valence. During the exposition, the electroencephalogram was recorded, which then formed the basis for event-related potentials' grand average calculation. Further analysis involved comparing the grand average ERP curves recorded from the precentral cortical regions in two gender-based groups. The findings showed that female participants were more engaged in detecting and deciphering emotional expressions even from the minute hints included in the blurred photos. On the other hand, the male group also showed more significant decoding and recall processes, when presented with blurred neutral stimuli.

**Results.** The findings showed that female participants were more engaged in detecting and deciphering emotional expressions even from the minute hints included in the blurred photos. On the other hand, the male group also showed more significant decoding and recall processes, when presented with blurred neutral stimuli.

**Conclusions.** These results are consistent with current evidence on the emotional sensitivity hypothesis and gender-specific variations in face perception strategies, which reveal that men and women appear to perceive neutral faces with varying degrees of accuracy, and women are more likely to perform better when processing emotional expressions.

**Keywords:** electroencephalography; event-related potentials; emotions; face perception.

### **Background**

Successful social interaction is said to depend heavily on one's ability to perceive nonverbal cues, such as facial expressions. Intuitive reading of mimic cues occurs automatically since it is seamlessly incorporated into our daily social interactions. There is no consensus on how the human brain interprets facial traits, though, as of yet. The perception of the face as a whole and as a single image is described by one competing idea, while the other emphasizes the significance of isolating particular structural components of the face with subsequent progressive processing. This ambiguity makes the problem of choosing the most important elements in emotional irradiation, which may be studied using warped images. The human face is perceived holistically, and information concerning the "centering" of the face is located in both the right and left hemispheres of the human brain cortex, according to recently discovered data (Almeida et al., 2020).

According to the concept of a holistic (configurational) face perception strategy, these visual stimuli are perceived atomically, as an inseparable object, at all stages of cognitive processing, and each subsequent presentation of a stimulus from this category is correlated by the brain with a previously formed template. Holism is a basic premise of Gestalt theory, which states that gestalts are "sensory wholes" that are qualitatively different from the sum of their individual parts or components and possess new traits (Almeida, 2020), that is, emergent properties. In the field of face perception, terms such as "configurational," "relational," and "holistic" are used to explain the emergent attributes of a face that emerge only when two or more of its elementary features (such as the eyes, nose, or mouth) are processed simultaneously at the same point in time.

The recognition process begins with the stage of visual analysis, which leads to the construction of a detailed perceptual image of the face being presented. For the

reason that faces constitute a visually homogeneous category with a high level of structural similarity seen among individual exemplars, successful discrimination at the individual level requires detailed holistic/configural processing that integrates multiple parts of a face into a unified perceptual image, taking into account subtle differences in the spatial relations between its components (Rossion, 2014). Thus, under normal circumstances, the activation of a face memory representation is accompanied by the search for multimodal information about the degree of familiarity of a person, which is a diverse collection of relevant biographical/semantic facts (e.g., profession, name, and personality traits), autobiographical/episodic details (e.g., memories of specific personal meetings) and an emotional reaction that reflects the personal significance of a person.

Thanks to the numerous works that exist at the moment, it has been proven that the perception of such a stimulus category as a face occurs thanks to an extensive cortical network that connects topographically separated areas of the cortex and some of the subcortical structures. Currently, it is customary to divide the elements of the face perception network into two distinct large networks: the central system, which specializes in processing the characteristics of the stimulus, according to the modality inherent in the face itself, and the extended system, which is responsible for storing a memory trace of the face, and is also able to generate an emotional response. The key components of the central system responsible for face recognition include three well-defined areas of the visual cortex located along the posterior-anterior axis of the ventral occipito-temporal cortex (VOTC) – these are face-specific areas of the occipital cortex (occipital face area, OFA), the fusiform face area (FFA), and anterior temporal face area (ATFA) (Kessler et al., 2021).

Core components of the extended face recognition system regions within the anterior temporal lobe (ATL),



namely ventrolateral and medial structures including the hippocampus and perirhinal/entorhinal cortex. They are involved in the storage and updating of semantic and episodic memory. The extended network also includes the amygdala and other elements of the limbic system (insula, ventral striatum, cingulate cortex, orbitofrontal cortex), which are involved in evaluating the emotional significance and personal significance of faces. Finally, it was found that the activation of the ventrolateral prefrontal cortex (PFC) during the processing of a familiar face was associated with the involvement of top-down monitoring functions and executive control mechanisms for face perception operations performed by the temporal cortex and memory network (Willinger et al., 2019).

For the purposes of the study, the event-related potential (ERP) technique was chosen due to its ability to detect fine aspects of input information perception and processing. In this study we focused on the nuances of cognitive processing, therefore only several cortical regions, all of precentral nature (frontal, central, and parietal) were selected for further inquiry, as they are known for their role in information analysis and integration. Several components of the grand average ERP curve demonstrate high specificity for face detection and analysis both at the early and late stages of processing, i.e., P100, N170, N400, LPP, etc. While the N170 peak (a negative peak, which arises at 150–200 msec after stimulus onset) is considered to be the major marker of face detection (Feurriegel et al., 2015), an increasing amount of evidence is currently being accumulated regarding the sensitivity of such ERP components as N400 (a negative component, which occurs around 400 msec after stimulus onset and indicates attention modulation during face processing (Neumann, Schweinberger, 2008)) and late positive potential (LPP, a positive peak at 800–1000 msec latency after stimulus onset). According to recent data (Gao et al., 2022), the LPP is considered to be the major ERP component conveying the face context effect. That is, the early-stage processing mainly reflects the emotion-valence based effects of face perception, while the late positive potentials correlate with specific contextual emotion-based effects.



Fig. 1. Example of stimulation material – positive facial expression (a); blurred positive facial expression (b)

Further preprocessing and analysis of the obtained data were carried out using the EEGLAB tool based on the MATLAB engineering package (Delorme, Makeig, 2004). In the above-mentioned software components, preprocessing of the primary data – filtering and ICA analysis – was carried out in order to remove the present artifactual components (oculomotor, neck muscle artifacts, etc.). The subjects were divided into two gender-based groups. With the use of total EEG recordings, several averaged ERP curves were created, reflecting the cognitive processes associated with the brain's response to visual stimulation – event-related potentials.

**The aim of this study** was to uncover subtle neuromechanisms of face perception, "coding", and emotional impact processing by using functionally misconstrued ("blurred") faces.

#### Methods

20 healthy volunteers of ESC "Institute of Biology and Medicine", Taras Shevchenko National University of Kyiv ( $n = 20$ ,  $n_{\text{fem}} = 11$ ) aged 18 to 24 ( $M = 21$ ,  $SD = 1.76$ ) were involved in the study. The participants were informed about the content of the stimulation, and written informed consent was obtained from each subject under the World Medical Association (WMA) Declaration of Helsinki—ethical principles for the medical research involving human subjects (Helsinki, Finland, June 1964), the Declaration of Principles on Tolerance (28<sup>th</sup> session of the General Conference of UNESCO, Paris, November 16, 1995), the Convention for the protection of Human Rights and Dignity of the Human Being about the Application of Biology and Medicine: Convention on Human Rights and Biomedicine (Oviedo, April 04, 1997).

The experimental structure consisted of the consequential oddball presentation of four stimulation series (10 min long each), with simultaneous EEG data recording. Each series of images was preceded by a resting EEG recording with eyes closed (3 min) and eyes open (3 min).

Stimulation material was obtained from the International Affective Pictures System (International Affective Pictures System) (Bradley, Lang, 2007), with further blur filter application. In the stimulation program, faces with neutral emotional valence were chosen as frequent stimuli ( $M = 4.22$ ,  $SD = 1.64$ ,  $n = 100$ ,  $n_{\text{fem}} = 50$  to  $M = 5.84$ ,  $SD = 1.62$ ,  $n = 100$ ,  $n_{\text{fem}} = 50$ ). Rare stimuli were identified as positive (mean values of emotional valence:  $M = 6.94$ ,  $SD = 1.42$ ,  $n = 100$ ,  $n_{\text{fem}} = 50$  to  $M = 8.03$ ,  $SD = 1.13$ ,  $n = 100$ ,  $n_{\text{fem}} = 50$ ) and negative (mean values of emotional valence  $M = 2.1$ ,  $SD = 1.63$ ,  $n = 100$ ,  $n_{\text{fem}} = 50$  to  $M = 4.21$ ,  $SD = 1.62$ ,  $n = 100$ ,  $n_{\text{fem}} = 50$ ) faces, which were blurred. Rare stimuli (positive and negative in valence, respectively) were presented according to a randomized pattern with rare stimuli' appearance probability at a 30 % rate. The total number of rare stimuli reached 100, and each stimulus was onset for 500 msec with a follow-up period of 3 sec  $\pm$  30 %.

The following assumptions form the basis of the ERP derivation from the original EEG signal: in a situation of multiple repetition of the event (stimulus presentation) the EEG signal that is registered is the sum of two components: spontaneous EEG and event-related potential (i). The component of spontaneous EEG is distributed accidentally across a series of consecutive event repetitions (ii). The component of the potential associated with the event is constant for all repetitions of the event (iii). Accidental "noise" from the raw EEG-data is removed by smoothing.

As a result of the accumulation of the EEG segments associated with certain events, their preprocessing (filtration, smoothing, artifactual components removal) and averaging, the ERPs are obtained, which can be described as a sequence of amplitude values or as a sequence of oscillations (waves).

ERP morphology is usually described in terms of waves, oscillations, deflections and shifts – directly observed changes in potential, and components – components of ERPs that do not necessarily coincide with a certain wave or oscillation and can determine the shape of several consecutive waves (synthetic component).

To identify a wave or component, the following parameters were used: amplitude characteristics – polarity (positive or negative deviations denoted as P and N, respectively), duration, latent period from the beginning of the deflection or its peak with respect to the moment of stimulus appearance (i); scalp distribution topography (ii); relation to the events, its characteristics (iii); task dependence (iv).

The major intergroup trends in the mechanisms underlying the response generation were revealed using the permutation statistical approach ( $p < 0.05$ ), with further application of the Bonferroni correction in order to eliminate statistical inexactness if any.

### Results

The results obtained during the subjects' exposition to the blurred neutral faces presented amongst negative facial expressions demonstrated regions of statistically significant differences both in the early and late ERP components. The female group demonstrated larger ERP amplitudes in the frontal cortical area around both at 200 msec ( $\Delta = 2.1 \mu V$ ,  $p < 0.05$ ) and in the range of 800–1000 msec ( $\Delta = 4.2 \mu V$ ,  $p < 0.05$ ) after stimulus onset (Fig. 2). At the same time, the male group was characterized by a significantly more pronounced negative ERP component, emerging at 200 msec latency.

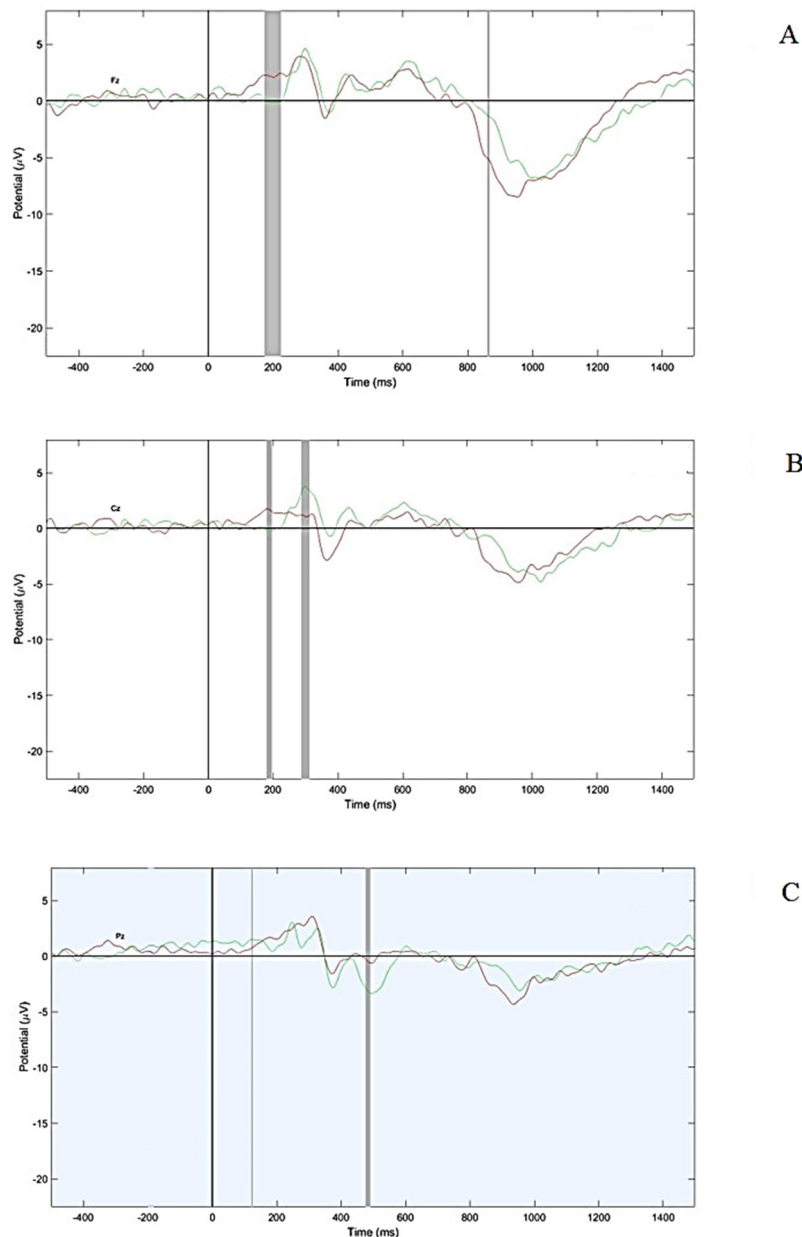
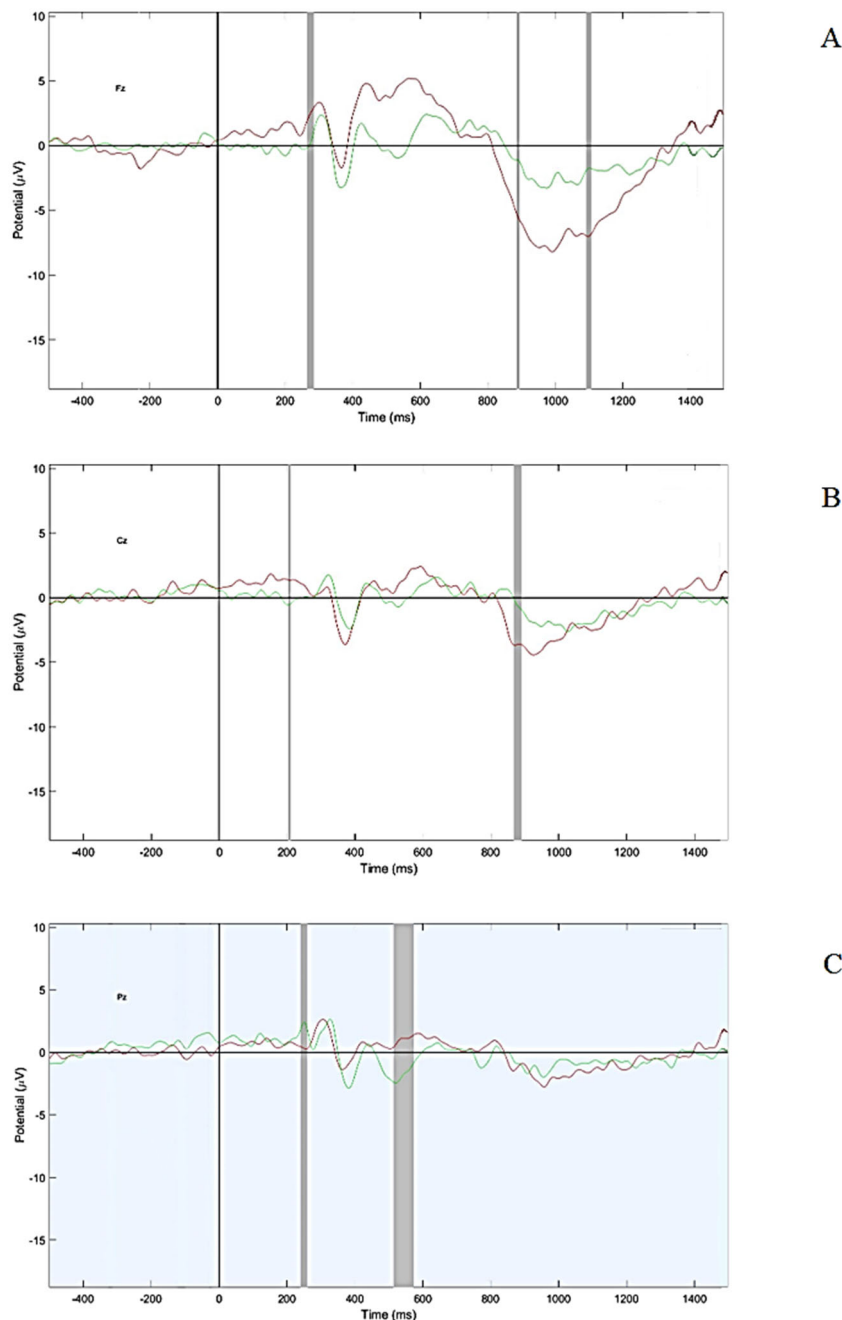


Fig. 2. Averaged ERP curves for blurred neutral face perception in the frontal (Fz, A), central (Cz, B), and parietal (Pz, C) areas when presented in a negative context. Point 0 marks the beginning of stimulus demonstration. The response of the male group is marked with a green line, and the response of the female group is marked with a red line. The regions of statistically significant difference are marked with grey color ( $p < 0.05$ )

A similar early-component trend was observed in the central cortical areas for the early 200 msec-ERP component ( $\Delta = 1.4 \mu\text{V}$ ,  $p < 0.05$ ). Apart from that, the male group appeared to have a larger amplitude of the P300 ERP component ( $\Delta = 1.9 \mu\text{V}$ ,  $p < 0.05$ ). Lastly, in the central parietal cortical area, the male group demonstrated a statistically significant increase of ERP components amplitude both in the range of 100–150 msec ( $\Delta = 0.7 \mu\text{V}$ ,  $p < 0.05$ ) and 400–600 msec ( $\Delta = 3.1 \mu\text{V}$ ,  $p < 0.05$ ), correspondingly.

In the case of blurred facial expression presentation on the background of positive emotional context, a slightly different picture was observed. That is, within the frontal region of the cortex the latencies of statistically significant difference included 300 msec ( $\Delta = 0.6 \mu\text{V}$ ,  $p < 0.05$ ) and

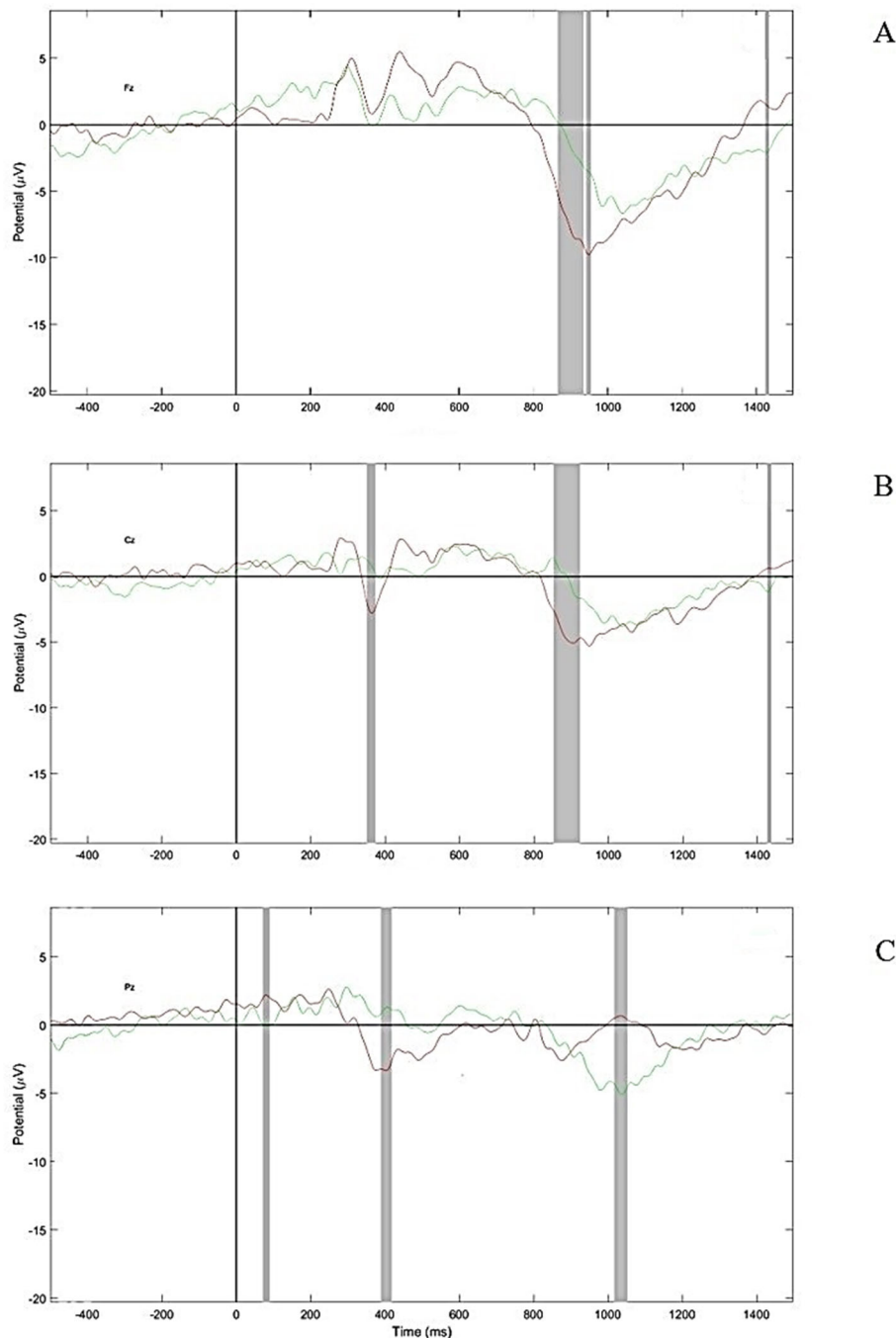
800–1000 msec ( $\Delta = 2.0 \mu\text{V}$ ,  $p < 0.05$ ) after rare stimulus was onset (Fig. 3). Notably, the female group demonstrated enhanced amplitude of the P300 component and delayed development of positive slow-wave (800–1200 msec). At the same time, the ERP data obtained from the parietal EEG-lead was characterized by the regions of statistically differences at the latencies of 200 msec ( $\Delta = 1.1 \mu\text{V}$ ,  $p < 0.05$ ) and 800–1000 msec ( $\Delta = 2.6 \mu\text{V}$ ,  $p < 0.05$ ), and the female group showed larger ERP amplitudes in both cases. Alongside with this evidence, the parietal grand average ERP obtained from the male group demonstrated enhanced amplitude at 200 msec and decreased amplitudes at the latency of 400–600 msec ( $\Delta = 2.3 \mu\text{V}$ ,  $p < 0.05$ ) compared to the female group.



**Fig. 3. Averaged ERP curves for blurred neutral face perception in the frontal (Fz, A), central (Cz, B), and parietal (Pz, C) areas, when presented in a positive context. Point 0 marks the beginning of stimulus demonstration. The response of the male group is marked with a green line, and the response of the female group is marked with a red line. The regions of statistically significant difference are marked with grey color ( $p < 0.05$ )**

The ERP data obtained during the exposition to negative blurred faces presented among neutral images demonstrated the areas of statistically significant amplitude increase for the negative component around 800–1000 msec

of latency, localized in the frontal and central cortical regions ( $\Delta = 5.1 \mu\text{V}$ ,  $p < 0.05$  and  $\Delta = 5.5 \mu\text{V}$ ,  $p < 0.05$ , correspondingly) (Fig. 4).

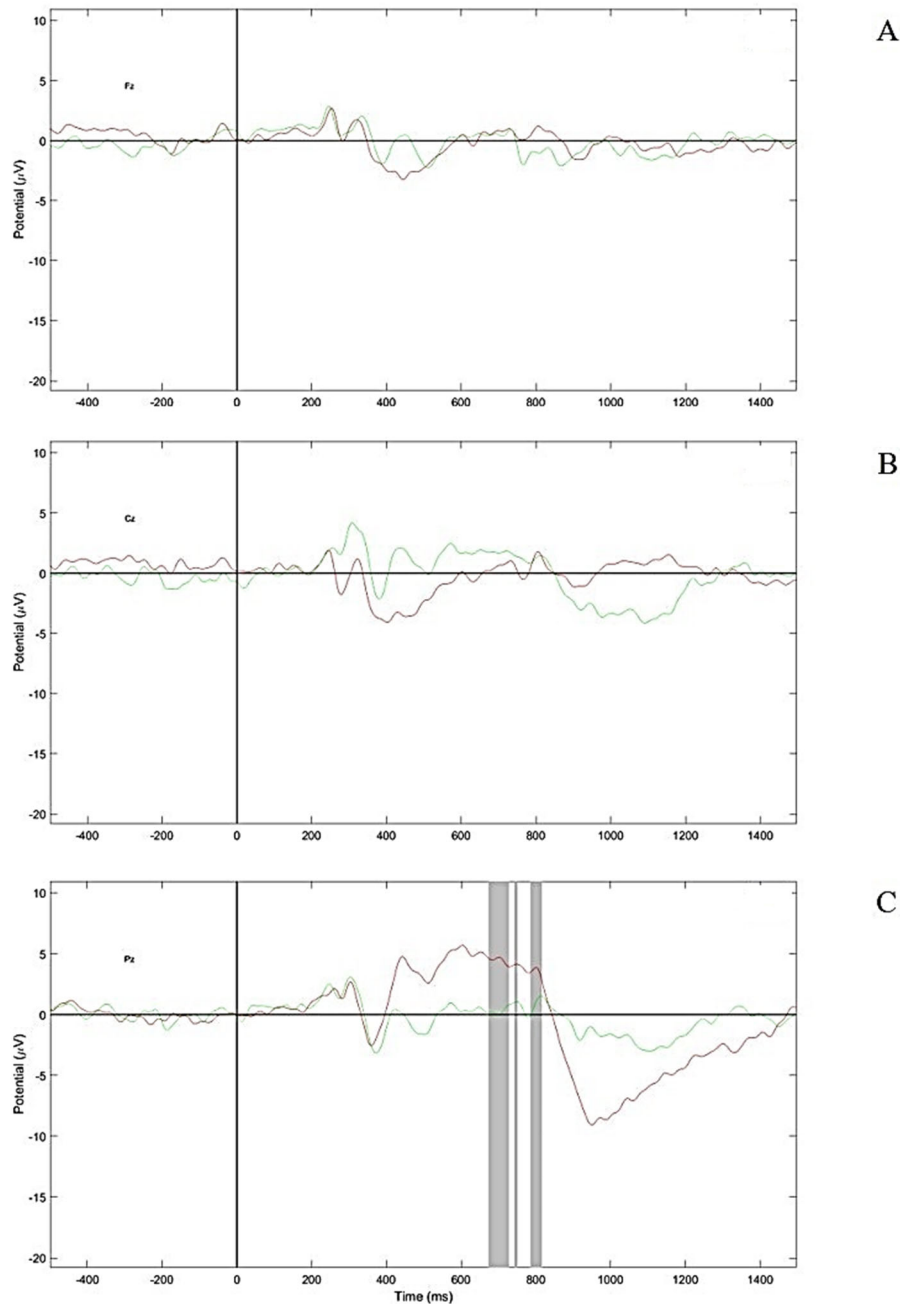


**Fig. 4. Averaged ERP curves for blurred negative face perception in the frontal (Fz, A), central (Cz, B), and parietal (Pz, C) areas, when presented in a neutral context. Point 0 marks the beginning of stimulus demonstration. The response of the male group is marked with a green line, and the response of the female group is marked with a red line. The regions of statistically significant difference are marked with grey color ( $p < 0.05$ )**

Furthermore, in the case of the blurred negative face presentation, the female group demonstrated larger amplitudes of N-400 negativity, located in the central and parietal regions of the cortex ( $\Delta = 1.7 \mu\text{V}$ ,  $p < 0.05$  and  $\Delta = 3.1 \mu\text{V}$ ,  $p < 0.05$ , correspondingly) (Fig. 4). Also, the N-400 assumption might be further supported by the difference observed at early latencies (around 100 msec), located within the parietal cortical region ( $\Delta = 0.9 \mu\text{V}$ ,  $p < 0.05$ ).

Lastly, it is important to note that this phenomenon was not observed when the rare stimuli consisted of positive blurred faces (Fig. 5). The only areas of the statistically significant differences were observed in the centro-parietal areas of the cortex within 600–800 msec after stimulus onset (LPP), with female group demonstrating larger amplitudes ( $\Delta = 4.2 \mu\text{V}$ ,  $p < 0.05$ ).





**Fig. 5. Averaged ERP curves for blurred positive face perception in the frontal (Fz, A), central (Cz, B), and parietal (Pz, C) areas, when presented in a neutral context. Point 0 marks the beginning of stimulus demonstration. The response of the male group is marked with a green line, and the response of the female group is marked with a red line. The regions of statistically significant difference are marked with grey color ( $p < 0.05$ )**

### Discussion and conclusions

First and foremost, we would like to point out the results of blurred neutral face perception, when primed with negative natural images, both in terms of early and late ERP components (Fig. 2). Speaking of the frontal cortical areas, generally, the time window between 100 and 200 msec is now seen as a transitional period between low- and high-level vision (Caharel et al., 2013). According to the current data, the negative ERP peak emerging at the latency of 200 msec, corresponds to the development of internal visual representation of the face (Rossion, 2014), which was more pronounced for the male group. We can also assume, that the difference observed in terms of the late positive potential (800–1000 msec), might reflect better emotion regulation for

the female group, as effective emotional reestimation and intended shift of attention focus reduce the amplitude of the LPP (Schienle, Unger, Schwab, 2022). As for the central cortical regions, larger P300 component amplitudes, observed in the male group, might depict the allocation of enhanced attention processes driven by rare stimuli (Marhöfer, Bach, Heinrich, 2015). Lastly, we have to mention the trend observed in the central parietal regions of the cortex within the male group, which is expressed in amplitude increase both at the early and medium latencies after the rare stimulus was onset. The ERP positive peak between 100 msec and 150 msec (P1) is often seen as a neuronal marker of stimulus detection, traits' assembling, and discrimination (Bublitzky, Schupp, 2011) when the increased

N400 amplitude might reflect larger perception fluency and recollection (Stróžak, Leynes, Wojtasiński, 2021).

The general ERP pattern, obtained during the blurred neutral stimuli presentation in the positive medium (Fig. 3), displayed the trends observed during negative context-mediated perception analysis. However, more regions of statistically significant differences were observed for the late components of the grand average ERP, all of them demonstrating the difficulties of rare stimuli discrimination and recollection, alongside enhanced emotional regulation characteristics for the female group (Stróžak, Leynes, Wojtasiński, 2021).

As for the reverse mode of presentation, when the blurred negative faces were presented as rare amongst the frequent neutral images, the enhanced amplitude of late negative component within the fronto-central cortical region (Fig. 4) might reflect that the female group was more inclined to retrodiction (i. e., infer which emotional expression the subject was viewing (Kang et al., 2018)).

Lastly, the late positive potential (LPP, 600–800 msec after stimulus onset) demonstrated the enhanced memory retrieval processes and perceptual knowledge consolidation in the female group, when blurred positive faces were onset (Fig. 4) (Taylor, Shehzad, MacCarthy, 2016). Furthermore, in the case of the blurred negative face presentation, the female group demonstrated larger amplitudes of N-400 negativity, located in the central and parietal regions of the cortex (Fig. 4). This evidence correlates with the modern view of the N-400 component, which was first discovered as a marker of linguistic processing, but is currently associated with morphed face emotion detection and decoding (Balconi, Pozzoli, 2005). In this case, the N-400 assumption might be further supported by the difference observed at early latencies (around 100 msec), located within the parietal cortical region, which depicts the enhanced external attention functioning at early stages of morphed negative stimuli processing in the female group (Hermann et al., 2004). Notably, no such tendency was observed when the rare stimuli group consisted of the blurred positive facial expressions (Fig. 5), which once again emphasizes the vital importance of accurate threat-reading directly from the facial cues (Bublitzky, Schupp, 2011).

In sum, we might assume, that participants from the female group were more prone to decoding and perceiving the emotion even from the subtle cues, present in the blurred images. At the same time, the male group demonstrated more pronounced decoding and recollection processes, when presented with blurred neutral stimuli. These findings fall in line with to-date data regarding the gender-specific differences in face perception strategies and emotional sensitivity hypothesis (Hoffmann et al., 2010), as women tend to perform better when processing emotional expressions, whilst men appear to show more accuracy in perceiving neutral faces (Skolnick, Bascom, Wilson, 2013).

Consequently, the female group generally tended to decoding and recollection mechanisms' enhancement when both positive and negative blurred stimuli were presented in the neutral context. Additionally, the female group was characterized by the increase of retrodiction mechanisms' function, when presented with morphed negative faces. The male group, on the other hand, demonstrated enhancement of processes, related to discrimination and recollection, with accompanying attentional resources involvement and greater cortical activation at the later stages of stimuli processing, when blurred neutral stimuli were presented

amongst emotional face expressions. However, no specific difference was observed in regards to context valence (positive or negative), when the participants were presented with blurred neutral images. This falls in line with to-date data on the gender-based differences in emotion perception strategies, as females tend to decode emotion-related cues, whilst men tend to focus more on neutral stimuli. Thus, the described regularity might indicate the differences in neurobiological mechanisms of behavior formation characteristic for men and women.

**Authors' contribution:** Mariia Chernykh – conceptualization, methodology, software, data curation, validation, formal analysis, writing – original draft preparation; Ihor Zyma – conceptualization, writing – review and editing, supervision.

#### References

- Almeida, J., Freixo, A., Tábuas-Pereira, M., Herald, S.B., Valério, D., Schu, G., Duro, D., Cunha, G., Bukhari, Q., Duchaine, B., & Santana, I. (2020). Face-Specific perceptual distortions reveal A view- and orientation-independent face template. *Current Biology*, 30(20), 4071–4077.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.07.067>
- Balconi, M., & Pozzoli, U. (2005). Morphed facial expressions elicited a N400 ERP effect: A domain-specific semantic module? *Scandinavian Journal of Psychology*, 46(6), 467–474. <https://doi.org/10.1111/j.1467-9450.2005.00478.x>
- Bradley, M.M., & Lang, P.J. (2020). *International affective picture system*. In *Encyclopedia of personality and individual differences* Springer International Publishing. (p. 2347–2350). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-24612-3\\_42](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24612-3_42)
- Bublitzky, F., & Schupp, H. T. (2011). Pictures cueing threat: Brain dynamics in viewing explicitly instructed danger cues. *Social Cognitive and Affective Neuroscience*, 7(6), 611–622. <https://doi.org/10.1093/scan/nsr032>
- Caharel, S., Leleu, A., Bernard, C., Viggiano, M.-P., Lalonde, R., & Rebaï, M. (2013). Early holistic face-like processing of Arcimboldo paintings in the right occipito-temporal cortex: Evidence from the N170 ERP component. *International Journal of Psychophysiology*, 90(2), 157–164. <https://doi.org/10.1016/j.ijpsycho.2013.06.024>
- Delorme, A., & Makeig, S. (2004). EEGLAB: an open source toolbox for analysis of single-trial EEG dynamics including independent component analysis. *Journal of Neuroscience Methods*, 134(1), 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2003.10.009>
- Feuerriegel, D., Churches, O., Hofmann, J., & Keage, H.A.D. (2015). The N170 and face perception in psychiatric and neurological disorders: A systematic review. *Clinical Neurophysiology*, 126(6), 1141–1158. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2014.09.015>
- Gao, Y., Lin, W., Zhang, M., Zheng, L., Liu, J., Zheng, M., En, Y., Chen, Y., & Mo, L. (2022). Cognitive mechanisms of the face context effect: An event related potential study of the effects of emotional contexts on neutral face perception. *Biological Psychology*, 108430. <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2022.108430>
- Herrmann, M.J., Ehlis, A.C., Ellgring, H., & Fallgatter, A.J. (2004). Early stages (P100) of face perception in humans as measured with event-related potentials (ERPs). *Journal of Neural Transmission*, 112(8), 1073–1081. <https://doi.org/10.1007/s00702-004-0250-8>
- Hoffmann, H., Kessler, H., Eppel, T., Rukavina, S., & Traue, H.C. (2010). Expression intensity, gender and facial emotion recognition: Women recognize only subtle facial emotions better than men. *Acta Psychologica*, 135(3), 278–283. <https://doi.org/10.1016/j.actpsy.2010.07.012>
- Kang, K., Schneider, D., Schweinberger, S.R., & Mitchell, P. (2018). Dissociating neural signatures of mental state retrodiction and classification based on facial expressions. *Social Cognitive and Affective Neuroscience*, 933–943. <https://hdl.handle.net/10454/17872>
- Kessler, R., Rusch, K.M., Wende, K.C., Schuster, V., & Jansen, A. (2021). Revisiting the effective connectivity within the distributed cortical network for face perception. *Neuroimage: Reports*, 1(4), 100045. <https://doi.org/10.1016/j.ynrp.2021.100045>
- Marhöfer, D.J., Bach, M., & Heinrich, S.P. (2015). Objective measurement of visual resolution using the P300 to self-facial images. *Documenta Ophthalmologica*, 131(2), 137–148. <https://doi.org/10.1007/s10633-015-9502-1>
- Neumann, M.F., & Schweinberger, S.R. (2008). N250r and N400 ERP correlates of immediate famous face repetition are independent of perceptual load. *Brain Research*, 1239, 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.08.039>
- Rossion, B. (2014). Understanding face perception by means of human electrophysiology. *Trends in Cognitive Sciences*, 18(6), 310–318. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2014.02.013>

Schienze, A., Unger, I., & Schwab, D. (2022). Changes in neural processing and evaluation of negative facial expressions after administration of an open-label placebo. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10567-4>

Skolnick, A.J., Bascom, K.L., & Wilson, D.T. (2013). Gender role expectations of disgust: Men are low and women are high. *Sex Roles*, 69(1-2), 72–88. <https://doi.org/10.1007/s11199-013-0279-y>

Stróžak, P., Leynes, P.A., & Wojtasiński, M. (2021). Distinct FN400/N400 memory effects for perceptually fluent and disfluent words. *Brain and Cognition*, 147, 105661. <https://doi.org/10.1016/j.bandc.2020.105661>

Taylor, J., Shehzad, Z., & McCarthy, G. (2016). Electrophysiological correlates of face-evoked person knowledge. *Biological Psychology*, 118, 136–146. <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2016.05.011>

Willinger, D., Karipidis, I.I., Beltrani, S., Di Pietro, S.V., Sladky, R., Walitza, S., Stämpfli, P., & Brem, S. (2019). Valence-Dependent coupling of prefrontal-amygdala effective connectivity during facial affect processing. *Eneuro*, 6(4), ENEURO.0079–19.2019. <https://doi.org/10.1523/eneuro.0079-19.2019>

Отримано редакцією журналу / Received: 06.09.23

Прорецензовано / Revised: 06.09.23

Схвалено до друку / Accepted: 05.10.23

Марія ЧЕРНИХ, асп.

ORCID ID: 0000-0001-5091-5071

e-mail: mariia.chernykh@knu.ua

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

Ігор ЗИМА, д-р біол. наук, доц.

ORCID ID: 0009-0006-2192-5346

e-mail: igzuma@gmail.com

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

### СПРИЙНЯТТЯ ВИДОЗМІНЕНИХ ОБЛИЧ: ДОСЛІДЖЕННЯ ПОТЕНЦІАЛІВ, ПОВ'ЯЗАНИХ З ПОДІЄЮ, ПІД ЧАС ОБРОБКИ ЕМОЦІЙНОГО ВИРАЗУ

**Вступ.** Зчитування емоційних сигналів з облич оточуючих людей вважається ключовим елементом успішної соціальної взаємодії. Утім, на сьогодні не існує єдиного погляду на базові принципи організації нейромеханізмів, відповідальних за сприйняття обличчя, що й обумовлює актуальність роботи. Метою дослідження було виділення більш тонких аспектів сприйняття обличчя, а також механізмів їхньої обробки та декодування.

**Методи.** Об'єктом дослідження виступили ефективні нейрональні мережі, що формуються під час обробки емоційногенних візуальних стимулів – людських облич, у їхньому природному вигляді та за умов внесення конфігураційних змін. У процесі дослідження розмиті вирази обличчя були представлені серед природних зображень обличчя різної емоційної валентності. Під час експозиції була записана електроенцефалограма, яка потім стала основою для розрахунку повних усереднених кривих потенціалів, пов'язаних з подією, зареєстрованих у прецентральної області кори головного мозку у двох групах, виділених за статтю.

**Результати.** Показано, що учасники із жіночої групи були більш схильні до декодування та сприйняття емоцій, навіть із тонких ознак, наявних у розмитих зображеннях. У той же час чоловіча група продемонструвала більш виражені процеси декодування та пригадування, коли їм пред'являли розмиті нейтральні стимули.

**Висновки.** Отримані результати узгоджуються з сучасними даними щодо гендерних відмінностей у стратегіях сприйняття обличчя та гіпотези емоційної чутливості, оскільки жінки зазвичай демонструють більшу успішність під час обробки емоційних виразів, тоді як чоловіки виявляють підвищену точність у сприйнятті нейтральних обличчя.

**Ключові слова:** електроенцефалографія, потенціали, пов'язані з подією, емоції, сприйняття обличчя.

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів. Спонсори не брали участі в розробленні дослідження; у зборі, аналізі чи інтерпретації даних; у написанні рукопису; в рішенні про публікацію результатів.

The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; in the decision to publish the results.

Наукове видання



# **ВІСНИК**

## **КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

### **БІОЛОГІЯ**

**Випуск 3(94)**

Редактор *Л. Львова*

**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<sup>1/8</sup>. Ум. друк. арк. 6,3. Наклад 300. Зам. № 223-10813.  
Гарнітура Arial. Папір офсетний. Друк офсетний. Вид. № БЗ.  
Підписано до друку 25.10.23

Видавець і виготовлювач  
ВПЦ "Київський університет"

Б-р Тараса Шевченка, 14, м. Київ, 01601, Україна

☎ (38044) 239 32 22; (38044) 239 31 72; тел./факс (38044) 239 31 28  
e-mail: [vpc@knu.ua](mailto:vpc@knu.ua); [vpc\\_div.chief@univ.net.ua](mailto:vpc_div.chief@univ.net.ua); [redaktor@univ.net.ua](mailto:redaktor@univ.net.ua)  
<https://vpc.univ.kiev.ua>

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 1103 від 31.10.02