



ISSN 1728-3817 (загальний)  
ISSN 1728-2624 (серійний)



# ВІСНИК

КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

## ПРОБЛЕМИ РЕГУЛЯЦІЇ ФІЗІОЛОГІЧНИХ ФУНКЦІЙ



Подано експериментальні дані про функціонування, будову, розвиток організмів людини, тварин і рослин, одержаних науковцями НДІ фізіології та біологічного факультету. Викладено також нові дані про патофізіологічні закономірності й біохімічні механізми регуляції процесів на клітинному та органному рівнях після впливу різноманітних фізико-хімічних чинників.

Для викладачів, наукових співробітників, аспірантів і студентів.

The experimental dates about functioning, content, development of human, animal, plant organisms achieved by scientists of research institute and biological faculty. Results of newly pathophysiological aspects and biochemical mechanisms of cell and organism processes regulation under the influence of different factors are presented.

For scientists, professors, aspirants and students.

**ВІДПОВІДАЛЬНИЙ РЕДАКТОР**

Л.І. Остапченко, д-р біол. наук, проф.

**РЕДАКЦІЙНА  
КОЛЕГІЯ**

М.Є. Кучеренко, д-р біол. наук, проф., акад. НАН України;  
Т.Л. Проценко, канд. біол. наук (відл. секр.); І.В. Якубцова (техн. секр.);  
В.М. Войціцький, д-р біол. наук, проф.; С.В. Демидов, д-р біол. наук,  
проф.; М.Е. Дзержинський, д-р біол. наук, проф.; М.С. Мірошниченко,  
д-р біол. наук, проф.; М.М. Мусієнко, д-р біол. наук, проф., чл.-кор.  
УААН; В.К. Позур, д-р біол. наук, проф.; І.Ю. Костіков, д-р біол.  
наук, доц.; В.В. Серебряков, д-р біол. наук, проф.; М.Ю. Макарчук,  
д-р біол. наук, проф.; В.П. Поліщук, д-р біол. наук, проф.

**Адреса редколегії**

01033, м. Київ-33, просп. акад. Глушкова, 2, корп. 12, біологічний фа-  
культет ☎ (38044) 266 93 67

**Затверджено**

Вченю радою біологічного факультету  
07.02.06 (протокол № 10)

**Атестовано**

Вищою атестаційною комісією України.  
Постанова Президії ВАК України  
№ 1-05/7 від 9.06.99

**Зареєстровано**

Міністерством інформації України.  
Свідоцтво про Державну реєстрацію КІ № 251 від 31.10.97

**Засновник  
та видавець**

Київський національний університет імені Тараса Шевченка,  
Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет"  
Свідоцтво внесено до Державного реєстру  
ДК № 1103 від 31.10.02

**Адреса видавця**

01601, Київ-601, б-р Т.Шевченка, 14, кімн. 43  
☎ (38044) 239 31 72, 239 32 22; факс 239 31 28

Наукова бібліотека  
ім. М. Максимовича  
**КНУ**  
ім. ТАРАСА ШЕВЧЕНКА



**11834JB**

45 - чит. зап. періодики та дисерт.

18.50

## ЗМІСТ

<b>Чернінський А., Піскорська Н., Зима І., Крижановський С.</b> Обумовлення різних патернів активації автономної нервової системи людини характером суб'єктивної оцінки рослинних ароматів.....	4
<b>Макарчук М., Чікіна Л.</b> Стан психофізіологічних функцій чоловіків і жінок за умов різної відповідальності за результати діяльності .....	6
<b>Янчук П., Комаренко В., Пасічніченко О., Русінчук Я., Терехов А.</b> Участь ендотеліну-1 у регуляції кровообігу, кисневого балансу та жовчосекреторної функції печінки .....	8
<b>Дворщенко К., Дворщенко О., Остапченко Л.</b> Загальний склад білків і рівень сукцинатдегідрогенази в мітохондріях клітин слизової шлунка при етаноловій виразці .....	10
<b>Тубальцева І., Макарчук М., Хиля В., Горбуленко Н., Лозова В., Васильєва А., Коваленко О.</b> Вплив адіахрому на поведінку щурів після іммобілізаційного стресу .....	12
<b>Весельський С., Пивоваренко Ю., Ляхов О.</b> Властивості нуклеїнових кислот у водних розчинах з різним електричним потенціалом .....	14
<b>Ковальова В., Гайда Л., Томачинська Л.</b> Кatalазна активність у слизовій шлунка за умов дії різних чинників.....	16
<b>Федорчук С., Горго Ю., Садовська Ю.</b> Оцінка ефективності діяльності за показниками психофізіологічних функцій у операторів систем стеження .....	17
<b>Михальченко В., Бобарикіна А., Ковтун О., Мінченко О.</b> Молекулярні механізми регуляції експресії генів 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-біфосфатази за умов гіпоксії.....	19
<b>Горго Ю., Палатний Т.</b> Дослідження спотворень полів ультразвукових випромінювачів у моделях біологічних тканин .....	25
<b>Давидовська Т., Богуцька К., Федоренко Т.</b> Регуляторні механізми скорочення скінованих гладеньких м'язів .....	28
<b>Кравченко В., Макарчук М.,</b> Вплив запахів ефірних олій лимона й лаванди на психофізіологічні функції обстежуваних різної статі .....	30
<b>Ільєнко М., Романюк В.</b> Мінливість і адаптивне значення отвору медіального надвиростка плечової кістки американської норки .....	33
<b>Синельник Т., Синельник О., Рибальченко В.</b> Значення функціональних мембраних порушень у холестазі під впливом хенодезоксихолевої кислоти .....	35
<b>Жолобак Н., Пенчук Ю., Карпов О., Молчанець О.</b> Особливості продукції інтерферонів у культурі клітин з використанням комплексного індуктора .....	37
<b>Радченко О., Степура Л., Собко В.</b> Перспективність застосування бензалконіум хлориду для видалення біоплівки та інактивації планктонних клітин <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	39
<b>Танасієнко О., Лісовенко Г., Трохименко Н., Черемшенно Н.</b> Підсилення ефективності протипухлинної вакцини за допомогою пробіотиків .....	41
<b>Проценко Т., Якубцова І., Чурілова Т., Осипенко К.</b> Вплив екстракту насіння фенугрека ( <i>Trigonella foenum graecum</i> ) на вміст моносахаридів глікопротеїнів дуоденального слизу щурів за умов розвитку виразкової хвороби дванадцяталої кишki .....	42
<b>Ємел'янов В., Ноздренко Д.</b> Зміни цитоплазматичної концентрації $Ca^{2+}$ у клітинах томатів .....	45
<b>Ємел'янов В., Семенець В., Ноздренко Д.</b> Участь кальцієвої сигнальної системи в індукованому накопиченні калози та зростанні хітиназної активності у клітинах томатів .....	47

---

**CONTENTS**

---

<b>Cherninsky A., Piskorska N., Zyma I., Kryzhanovsky S.</b>	
Subjective assessment of plant fragrances cause distinct patterns of human autonomic nervous system activity changes .....	4
<b>Makarchuk M., Chikina L.</b>	
State of psychophysiological functions of men and women under conditions of the responsibility for result.....	6
<b>Yanchuk P., Komarenko V., Pasichnichenko O., Rusinchuk Ya., Terekhov A.</b>	
The participation endotheline-1 in the regulation of the hepatic blood circulation, oxygen balance and bile secretory function .....	8
<b>Dvorschenko K., Dvorschenko O., Ostapchenko L.</b>	
The general composition of proteins and level of succinate dehydrogenase in mitochondria of cells of gastric mucosa at ethanol ulcer.....	10
<b>Tubaltseva I., Macarchuk M., Hylja V., Gorbuleko N., Lozova V., Vasyljeva A., Kovalenko O.</b>	
Adiachrom influence on a behavior of rats subjected to immobilization stress.....	12
<b>Vesel'sky S., Pivovarenko Yu., Lyakhov O.</b>	
Properties of nucleic acids in water solutions with various electrical potential .....	14
<b>Kovalyova V., Gayda L., Tomachinska L.</b>	
Activity of catalase in mucous stomach at the influence on different factors.....	16
<b>Fedorchuk S., Gorgo Yu., Sadovska Yu.</b>	
Estimation of effectiveness of activity on indexes of psychophysiological functions for operators of thermal power stations .....	17
<b>Mykhalchenko V., Bobarykina A., Kovtun O., Minchenko O.</b>	
Molecular mechanisms of the hypoxic regulation of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase expression .....	19
<b>Gorgo Yu., Palatny T.</b>	
The investigation of distortion of ultrasound transducers fields in biological tissues models.....	25
<b>Davidovska T., Bogutska K., Fedorenko T.</b>	
The regulatory mechanisms of the skinned smooth muscle contraction .....	28
<b>Kravchenko V., Macarchuk M.</b>	
An influence of lemon and lavender essential oils' odors on psychophysiological functions in persons of different sexes Ilyenko .....	30
<b>Ilyenko M., Romanyuk V.</b>	
Variability and adaptive sense of foramen of epicondile in dorsal epiphysis of humerus in American mink.....	33
<b>Syneinyk T., Syneinyk O., Rybaichenko V.</b>	
The functional membrane disturbance role in the chenodeoxycholic acid induced cholestasis .....	35
<b>Jolobak N., Pentchuk Yu., Karpov O., Molchanets O.</b>	
The peculiarities of interferon production in cell culture using complex inducers .....	37
<b>Radchenko O., Stepura L., Sobko V.</b>	
The perspective of the benzalkonium chloride application for biofilm removal and planktonic <i>Pseudomonas aeruginosa</i> inactivation.....	39
<b>Tanasienko O., Lisovenko G., Trohimenco N., Cheremshenko N.</b>	
The improvement of cancer autovaccine efficacy by probiotics .....	41
<b>Protsenko T., Yakubtsova I., Churilova T., Osypenko K.</b>	
Influence of extract fenugreek seeds ( <i>Trigonella foenum graecum</i> ) on content glycoprotein monosaccharides of duodenal mucous in rats at development of duodenal ulcer .....	42
<b>Emelyanov V., Nozdrenko D.</b>	
Changes in cytosolic $\text{Ca}^{2+}$ concentration in tomato cell.....	45
<b>Emelyanov V., Semenets V., Nozdrenko D.</b>	
The role $\text{Ca}^{2+}$ signaling system in callose accumulation and increasing of chitinase activity in tomato cell .....	47

## ОБУМОВЛЕННЯ РІЗНИХ ПАТЕРНІВ АКТИВАЦІЇ АВТОНОМНОЇ НЕРВОВОЇ СИСТЕМИ ЛЮДИНИ ХАРАКТЕРОМ СУБ'ЄКТИВНОЇ ОЦІНКИ РОСЛИННИХ АРОМАТІВ

*Установлено, що позитивна й негативна гедонічна оцінка запахів рослинних ефірних олій обумовлюють два різні патерни зрушень активності автономної нервової системи людини, які виявляються в динаміці показників варіабельності серцевого ритму.*

*Positive and negative hedonic assessment of plant ether oils' odors cause two distinct patterns of human autonomic nervous system activity shifts revealed in heart rate variability parameter's changes.*

**Вступ.** Нюховий аналізатор людини має тісні морфологічні й функціональні зв'язки з емоціогенними структурами мозку, що сприяє розвитку емоційних реакцій при сприйнятті олфактивних чинників. Згідно з моделлю, описаною у статті [9], обов'язковим компонентом функціональної системи сприйняття олфактивних стимулів є модально-специфічні сенсорні структури. Наступний етап обробки запахової інформації – це аналіз її біологічного значення, який здійснюється емоціогенними структурами й у найпростішому випадку полягає у формуванні оцінки за шкалою "подобається / не подобається" (*approach / withdrawal*). У свою чергу, емоційна активзація, як правило, супроводжується зрушеними у вегетативній сфері організму, характер яких залежить від типу емоції [5]. Відомо, що одним з найбільш динамічних та інформаційних способів характеристики діяльності автономної нервової системи (АНС) організму є аналіз варіабельності серцевого ритму (ВСР) [3]. Метою даної роботи було вивчення змін функціонування АНС людині за показниками ВСР при сприйнятті запахів рослинних ефірних олій в умовах направленої уваги.

**Об'єкт і методи дослідження.** В експериментах брали участь 67 добровольців – студентів київських закладів вищої освіти віком від 18 до 25 років, обох статей (24 жінки та 43 чоловіки), з нормальнюю нюховою чутливістю на момент проведення експерименту. Дослідження складалось з двох етапів. На першому етапі обстежуваним пропонувалася касета з десяти пробірок, усередині яких були смужки фільтрувального паперу з нанесеними на них ефірними оліями: лаванди, розмарину, іланг-ілангу, сосни альпійської, лимона, м'яти, анісу, полину гіркого, троянди та спиртової настоянки валеріані лікарської, яку вони повинні були ранжувати за ступенем приемності пропонованих ароматів. На другому етапі, який проходив в інший від попереднього день, проводилося психофізіологічне дослідження. Під час цього обстежуваним перебували в спеціальній екронованій, звуко- та світлоізольованій камері у зручному кріслі в напівлежачому стані із заплющеними очима. Далі учасникам повідомлялася інструкція щодо їхньої поведінки під час експерименту – за командою експериментатора відкрити пробірку та сприймати запах речовини, що міститься всередині. При цьому обстежуваним пропонувалися три пробірки: дві з одорантами (запахи ефірних олій, які зайніяли перше та останнє місце в тесті вибору) та одна пробірка з фільтрувальним папером, змоченим дистильованою водою, яку використовували як контрольну. Перебіг експерименту мав таку схему: 3 хв адаптації обстежуваного до умов експерименту, 3 хв запису фонової ЕКГ, 3 хв одоростимуляції (дійсної чи уявної). По закінченні цієї частини досліду учасникам експерименту пропонували заповнити спеціально розроблений бланк для оцінки запаху за його суб'єктивною приемністю / неприємністю та суб'єктивною шкалою

активаційного впливу. Указана процедура повторювалася тричі – з одорантом, який у попередньому тестуванні був розміщений на першій позиції, із контрольною пробіркою з дистильованою водою, та з одорантом, який у попередньому тестуванні був на останній позиції.

Для реєстрації кардіоінтервалограми знімався електрокардіографічний сигнал (II відведення за Ейнховеном), який після посилення подавався на прилад, що реєстрував час між двома суміжними R-лініями ЕКГ [4]. Зареєстрований масив кардіоінтервалів підлягав статистико-математичній обробці за алгоритмами аналізу варіабельності серцевого ритму, реалізованими нами у програмному середовищі Visual Basic for Applications пакету Microsoft Office 2000. Для характеристики процесів регуляції діяльності серцевої діяльності ми обрали показники варіабельності серцевого ритму, які, за даними Р. Баєвського зі співавт. [2], повністю їх характеризують. Так, середнє арифметичне значення масиву кардіоінтервалів (MNN), його похідна – ЧСС – і мода кардіоінтервалів відображають поточний рівень функціонування системи кровообігу, а отже – певною мірою й енергетичні потреби організму. Параметри SDNN і KB характеризують автономний контур регуляції діяльності серця – внутрішні процеси, пов'язані з автоматією, показник RMSSD характеризує парасимпатичні центральні впливи на діяльність серця, АМо – центральні симпатичні, а PNN<sub>50</sub> – ступінь переважання парасимпатичних механізмів над симпатичними. Індекс напруження регуляторних систем (IHPC) характеризує ступінь переважання центральних механізмів регуляції серцевої діяльності над внутрішніми (автономними).

Значущість відмін досліджуваних параметрів при порівнянні залежних вибірок оцінювали за допомогою критерію знакових рангових сум Вілкоксона. Для порівняння незалежних вибірок застосовували критерій Манна – Утні. Для аналізу результатів тестів вибору використовували критерій  $\chi^2$ . Указані процедури обчислювалися або у програмному пакеті Statgraphics 5.1 (Manugistics, Inc.), або в пакеті Microsoft Excel 2000.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Аналіз отриманих даних виявив, що характер змін ВСР суттєво залежав від суб'єктивної оцінки приемності пропонованих одорантів. Так, сприйняття суб'єктивно приемних запахів супроводжувалося зростанням ролі автономного контуру регуляції серцевої діяльності з паралельним зростанням парасимпатичного тонусу і зменшенням ролі симпатичної нервової системи (НС), що проявлялося в динаміці всіх показників ВСР, окрім MNN, Mo та ЧСС (табл. 1). На відміну від цього, при дії суб'єктивно неприємних запахів перерозподілу часток різних контурів регуляції не спостерігалося, проте було зареєстровано зрушення рівня функціонування системи кровообігу в бік більш інтенсивної діяльності (зниження MNN, Mo та відповідне зростання ЧСС). При цьому сприйняття запахів рослинних ефірних олій, оцінених як нейтральні

за шкалою гедонічності, не супроводжувалося змінами жодних показників ВСР (табл. 1). Це може бути поясненням поєднанням випадків хоч і слабкої, але гедонічної

оцінки різного знаку (оцінки "1" та "-1"), а отже – і різноспрямованих змін досліджуваних показників.

**Таблиця 1.** Зміни показників ВСР при пред'явленні пробірок з ефірними оліями у групах, виділених за суб'єктивною оцінкою ароматів

Групи		MNN, %	Mo, %	ЧСС, %	SDNN, %	КВ, %	RMSSD, %	AMo, %	PNN <sub>50</sub> , %	IHRС
Неприємні n = 43	+	27,9	23,3	60,5	53,5	58,1	48,8	51,2	48,8	51,2
	-	69,8	76,7	20,9	46,5	41,9	51,2	48,8	46,5	48,8
	p	**	**	**	–	–	–	–	–	–
Приємні n = 80	+	46,3	48,8	47,5	76,3	75,0	82,5	31,3	78,8	22,5
	-	53,8	51,3	41,3	23,8	23,8	17,5	68,8	18,8	77,5
	p	–	–	–	***	***	***	***	***	***
Нейтральні n = 24	+	41,7	33,3	45,8	58,3	54,2	58,3	54,2	66,7	41,7
	-	54,2	66,7	33,3	41,7	45,8	41,7	45,8	29,2	58,3
	p	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Активуючі, приємні n = 33	+	48,5	39,4	48,5	69,7	72,7	78,8	33,3	78,8	24,2
	-	51,5	60,6	42,4	30,3	27,3	21,2	66,7	21,2	75,8
	p	–	–	–	**	**	*	**	**	**
Активуючі, неприємні n = 29	+	24,1	20,7	65,5	51,7	51,7	44,8	62,1	41,4	51,7
	-	75,9	79,3	17,2	48,3	48,3	55,2	37,9	51,7	48,3
	p	**	**	**	–	–	–	–	–	–
Заспокійливі, приємні n = 22	+	40,9	54,5	59,1	81,8	81,8	86,4	31,8	77,3	18,2
	-	59,1	45,5	40,9	18,2	13,6	13,6	68,2	18,2	81,8
	p	–	–	–	***	***	***	**	**	**

Примітки: 1. Показано відсотки випадків, у яких спостерігалося збільшення (+) і зменшення (-) показників ВСР. 2. Зірочками позначено статистичну значущість відмін – p < 0,05 (\*), p < 0,01 (\*\*) і p < 0,001 (\*\*\*)

Аналіз суміщеної гедонічно-активаційної оцінки виявив, що суб'єктивне відчуття активації, пов'язане з дією одоранту, не позначалося на характері вегетативних зрушень. У даному випадку вирішальне значення мала гедонічна оцінка аромату: сприйняття суб'єктивно приємних запахів супроводжувалося однаковим патерном змін показників ВСР незалежно від оцінки ароматів за шкалою суб'єктивного активаційного впливу (табл. 1). Слід відмітити, що четверта група, наявність якої випливає з логіки поділу вибірки за обома шкалами (неприємні заспокійливі), була вкрай нечисленною ( $n < 5$ ), а тому нами не аналізувалася.

Отримані нами дані про зв'язок між характером змін ВСР під час сприйняття запахів ефірних олій і суб'єктивною гедонічною оцінкою ароматів виявилися дещо неочікуваними. У літературі є відомості про емоційний характер реагування людини на одоранти [7; 10], що підтверджується і самозвітами обстежуваних про власний емоційний стан, пов'язаний із сприйняттям пропонованих подразників у наших дослідах [6]. Відомо, що підвищення тонусу емоціогенних структур супроводжується вегетативними корелятами, які в разі використання їх як індикатора діяльності серцево-судинної системи можуть полягати як у підвищенні інтенсивності її функціонування (зростання ЧСС, артеріального тиску), так і в обернених змінах [5]. Та який би не був напрямок цих змін, якщо він обумовлений тонусом емоціогенних структур, то повинен відображати підвищення ролі центрального контуру регуляції серцевої діяльності [3], не має значення симпатичної чи парасимпатичної його частини. У наших дослідах при реагуванні на приємні одоранти переважали протилежні зміни – які вказували на зростання ролі автономного та зменшення центрального контуру регуляції серцевої діяльності (табл. 1). Це супроводжувалося зниженням ролі симпатичного відділу ВНС і збільшенням парасимпатичного тонусу. Ймовірно припустити, що зареєстровані зміни ВСР при сприйнятті гедонічно позитивних запахів були свідченням певної деактивації центральної нервової системи, яка супроводжувалася переведенням серцево-судинної системи в енергетично більш економний режим самостійного функціонування. При цьому особливо слід від-

міти збільшення тонусу парасимпатичного відділу ВНС, яке може бути ознакою переходу організму в режим накопичення енергії. Такі результати узгоджуються з даними, отриманими іншими авторами [8], які показали, що при позитивній суб'єктивній оцінці запаху жасминового чаю спостерігалося зростання парасимпатичної активації за показниками ВСР.

На відміну від приємних, аверзивні, суб'єктивно неприємні подразники (не тільки запахові) мали в еволюції вирішальне значення для забезпечення виживання організму, оскільки несли в собі інформацію про потенційну небезпеку для життєдіяльності, а тому потребували негайного реагування [1]. З цього погляду цілком зрозумілим є факт, що при сприйнятті неприємних запахів не спостерігалося змін функціонування вегетативної нервової системи, подібних до реакції на приємні запахи. У даному випадку активація системи негативно емоційного реагування зумовила переведення системи регуляції кровообігу в режим забезпечення організму енергією, що може йому знадобитися в разі виникнення реальної небезпеки (симпатичний тип реагування). Подібні дані було отримано й іншими авторами [7], які показали, що при сприйнятті неприємних одорантів спостерігалося зростання ЧСС, якого не відбувалося за позитивною оцінкою аромату. Проте, на відміну від отриманих нами даних, є відомості, що негативна оцінка певних запахів (жасминового чаю) супроводжувалася зростанням симпатичної активації серцево-судинної системи [8]. Відсутність такого ефекту в наших експериментах, імовірно, пояснюється когнітивною компенсацією, адже обстежувані знали, що вони перебувають у безпечній обстановці. Крім того, як показали дані опитування стосовно суб'єктивного сприйняття, пропоновані рослинні одоранти не сприймалися як аверзивні, а негативний характер їхнього сприйняття, скоріше, був обумовлений асоціативними зв'язками.

Відсутність же змін показників ВСР при нейтральній гедонічній оцінці (табл. 1) може інтерпретуватися двояко. По-перше, як ознака відсутності активації емоціогенних структур, відповідних за розвиток описаних вище для виражених гедонічних оцінок зрушень ВСР. По-друге, це могло бути наслідком сумісного

аналізу двох груп, в яких відбувалися різноспрямовані зміни описаних параметрів.

Слід зауважити, що приступаючи до аналізу отриманих даних, нами було сформульовано припущення, що вирішальним фактором, який обумовлює характер змін функціонування АНС, могла бути ступінь гедонічності оцінки запаху пропонованих одорантів незалежно від її знаку (шкалою оцінки цього фактора логічно вважати модуль суб'єктивної оцінки за шкалою  $\pm 5$ ). Аналіз змін показників ВСР при сприйнятті запахів, оцінених як дуже приемні чи дуже неприємні (оценки "-5", "-4", "4" і "5"), не дозволив виявити спільніх для цієї групи характеристик: зареєстровані зміни були об'єднанням описаних вище різноспрямованих змін при сприйнятті позитивних і негативних запахів. Таким чином, автори цієї статті не змогли виявити патернів активації АНС, які характеризували б ступінь емоційної активації при сприйнятті рослинних ароматів, натомість вирішальну роль мав знак суб'єктивної оцінки приемності.

**Висновок.** Позитивна й негативна гедонічна оцінка запахів рослинних ефірних олій супроводжуються різними патернами активації автономної нервової системи, які відповідним чином позначаються на характері змін показників варіабельності серцевого ритму.

1. Анахин П.К. Эмоции // БМЭ. – М., 1984. – Т. 35.
2. Баевский Р.М., Иванов Г.Г., Чирейкин Л.В. и др. // Вестн. аритмологии. – 2001. – № 24.
3. Баевский Р.М. Математический анализ изменений сердечного ритма при стрессе. – М., 1984.
4. Костенко С.С., Цибанко В.О. // Физiol. журнал. – 2000. – Т. 46, № 5.
5. Русалова М.Н. Экспериментальное исследование эмоциональных реакций человека – М., 1979.
6. Чернинский А.А., Зима И.Г., Макарчук Н.Е и др. // Нейробиология и биологическая психиатрия (Электрон. бюлл. Рос. нейробиол. общ., Российского общ. биopsихиатрии и Укр. общ. биол. психиатрии). – 2005. – № 2 (26).
7. Bensafi M., Rouby C., Farget V. et al. // Neurosc. Let. – 2002. – Vol. 319.
8. Inoue N., Kuroda K., Sugimoto A. et al. // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2003. – Vol. 67, № 6.
9. Long T.S. // Progress in Neurobiology – 1989. – Vol. 33.
10. Royet J.-P., Zald D., Versace R., et al. // The J. of Neuroscience. – 2000. – Vol. 20, № 20.

Надійшла до редакції 11.05.05

УДК 612.821:612.82/83

М. Макарчук, д-р біол. наук, Л.Чікіна, провід. інж.

## СТАН ПСИХОФІЗІОЛОГІЧНИХ ФУНКЦІЙ ЧОЛОВІКІВ І ЖІНОК ЗА УМОВ РІЗНОЇ ВІДПОВІДАЛЬНОСТІ ЗА РЕЗУЛЬТАТИ ДІЯЛЬНОСТІ

Досліджено стан психофізіологічних функцій у осіб жіночої та чоловічої статі за оптимальних умов та умов підвищеної відповідальності за результат діяльності. Виявлено, що статева різниця у стані психофізіологічних функцій існує за обох умов. При підвищенні відповідальності за результат діяльності ця різниця між чоловіками і жінками суттєво збільшується. Установлено, що за обох умов у чоловіків показник точності реакції на рухомий об'єкт вищий, ніж у жінок, а гальмівні процеси менш виражені.

*Research of the state psychophysiological functions for persons female and male under optimal conditions and conditions of the increased responsibility for outcome has defined, that sexual difference in a state psychophysiological functions exists under both conditions. At the increased responsibility for outcome of activity this difference between men and women is essentially increased. It is installed, that under both conditions for men the parameter of accuracy of response to the moved object is higher, than for women, and brake processes less expressed.*

**Вступ.** Дослідження психофізіологічних особливостей чоловіків і жінок приділяється недостатньо уваги [5]. Однак у літературі є дані про те, що статеві відмінності виявляються навіть при визначенні часу простоти сенсомоторної реакції, яка є найпростішим, доступним і в той же час достатньо точним психофізіологічним показником функціонального стану людини [1; 10]. Зокрема показано, що час простоти сенсомоторної реакції у чоловіків дещо менший, ніж у жінок, а у хлопчиків, відповідно, менший, ніж у дівчаток. Слід зазначити, що вказані вище відмінності виявляються не завжди [3].

Проведений у попередній нашій роботі [7] порівняльний аналіз стану психофізіологічних функцій у обстежуваних за різних умов відповідальності за результат діяльності виявив суттєвий, але неоднаковий вплив цього фактора на стан психофізіологічних функцій різних обстежуваних. Однак при цьому не було з'ясовано, як впливає високий рівень відповідальності за результат на стан фізіологічних функцій у чоловіків і жінок. Тому метою даної роботи було вивчити та порівняти стан психофізіологічних функцій у чоловіків та жінок за різних рівнів психоемоційного напруження, викликаних змінами відповідальності за результат діяльності.

**Об'єкт і методи дослідження.** Тестування стану основних психофізіологічних функцій обстежуваних проводили за допомогою спеціального комплексу комп'ютерних програм, які були розроблені на основі низки модифікованих методик, описаних у роботі [9]. У дослідженні як обстежувані брали участь 93 студенти

(32 особи чоловічої статі та 61 жіночої) віком 19–21 років, які проходили тестування в так званих "оптимальних умовах", коли результати тестування ніяк не впливали на їхню подальшу долю і були лише частиною наукових досліджень. Дві інші групи обстежуваних, які складалися з 161 абітурієнта (128 осіб чоловічої статі та 33 жіночої) віком 17–21 років і 153 слухачів (83 особи чоловічої статі й 70 жіночої) віком 23–25 років, проходили тестування за "умов високої відповідальності за результат", оскільки результати цього тестування були визначальними при оцінці обстежуваних на професійну придатність і цілком установлювали їхню подальшу професійну діяльність. У всіх обстежуваних визначали: коефіцієнт сили нервової системи (КС), функціональний рівень системи (ФРС), швидкість простоти сенсомоторної реакції (ШПСР), середню швидкість реакції вибору (ШРВ), функціональну рухливість нервових процесів (ФРНП) і працездатність головного мозку (ПГМ), показник точності реакції на рухомий об'єкт (РРО), показники збудження (ЗБУД), гальмування (ГАЛЬМ) та урівноваженості (УРІВН) нервових процесів, обсяг короткочасної пам'яті (ПАМ).

Результати та їх обговорення. У табл. 1 наведено показники стану основних психофізіологічних функцій чоловіків і жінок за різних умов діяльності.

Використавши непараметричний критерій Манна та Уїтні (U-тест), автори цієї статті, по-перше, провели порівняння відповідних психофізіологічних показників у чоловіків та жінок як за оптимальних умов проходження

тестування, так і за умов підвищеної відповідальності за результати діяльності, по-друге, з'ясували, які з цих показників у чоловіків і жінок є найчутливішими до психоемоційного напруження.

Проведений аналіз отриманих даних засвідчує, що як за оптимальних умов, так і за умов значного психоемоційного напруження показник точності реакції на рухомий об'єкт РРО у чоловіків достовірно ви-

щий ( $p<0,01$ ), ніж у жінок. При цьому час запізнення реакції у чоловіків-студентів і чоловіків-слухачів та-кож є меншим, ніж у жінок відповідних груп. Отримані результати загалом збігаються з літературними даними [5]. Що стосується випереджуvalьних реакцій, то лише за оптимальних умов виявлено вірогідну ( $p<0,01$ ) різницю для показника ЗБУД: у чоловіків він менш виражений, ніж у жінок.

**Таблиця 1. Стан психофізіологічних функцій у обстежуваних чоловіків і жінок за оптимальних умов та умов підвищеної відповідальності за результат**

Показники та їхні статистичні характеристики	Оптимальні умови діяльності		Умови підвищеної відповідальності за результати діяльності			
	Студенти (n = 93)		Абітурієнти (n = 161)		Слухачі (n = 153)	
	Чоловіки (n = 32)	Жінки (n = 61)	Чоловіки (n = 128)	Жінки (n = 33)	Чоловіки (n = 83)	Жінки (n = 70)
КС (відн. од.)	25 процентиль	1,00	0,98	0,97	0,96	0,9
	медіана	1,10	1,11	1,06	1,13	1,06
	75 процентиль	1,20	1,27	1,22	1,25	1,3
ФРС (с <sup>-2</sup> )	25 процентиль	4,25	4,07	4,05	3,54	4,02
	медіана	4,45	4,39	4,38	4,12* #	4,38
	75 процентиль	5,43	5,46	5,43	4,86	5,43
ШПСР (мс)	25 процентиль	209,61	203,04	220,48	229,83	210,96
	медіана	225,56	236	240 \$	270,09* #	239,57
	75 процентиль	243,70	268,61	285,13	297,39	276,52
ШРВ (мс)	25 процентиль	341,95	371,40	387,85	390,3	362
	медіана	369,15	408,10	399,55 \$	402,9	394
	75 процентиль	425,45	433,75	441,6	434,7	429,6
ШРВП (мс)	25 процентиль	337,21	365,77	360,19	379,42	360,38
	медіана	367,21	401,54	395,58	399,62	385,58
	75 процентиль	429,81	427,60	433,37	426,25	425,77
ШРВЛ (мс)	25 процентиль	345,73	370,63	376,46	387,5	364,58
	медіана	374,69	406,46	403,65 \$	410,21	407,5
	75 процентиль	420,73	439,38	446,98	429,27	437,5
ФРНП (мс)	25 процентиль	438	474	460	452	426
	медіана	520	590	568	522	490
	75 процентиль	744	740	748	598	574
ПГМ (%)	25 процентиль	12,25	8	11,5	6	9
	медіана	15,75	13	17	13*	13
	75 процентиль	25	19	25,5	21	21
РРО (відн. од.)	25 процентиль	7,5	15	5	9	7
	медіана	10	21*	10	16*#	9
	75 процентиль	17	31,5	19	21	18
ЗБУД (відн. од.)	25 процентиль	6	17	7	6	9
	медіана	14,5	26*	13	14	5
	75 процентиль	22,5	44	56,5	49,5	61
ГАЛЬМ (відн. од.)	25 процентиль	-11	-26	-8,5	-14	-9
	медіана	-7,5	-17*	-5 \$	-5 #	-4 \$
	75 процентиль	-6	-9,5	-2	-3	-1
УРІВН (відн. од.)	25 процентиль	1,2	0,88	1,73	0,65	1,27
	медіана	1,57	1,8	4,5 \$	5	3,5 \$
	75 процентиль	2,14	3,48	11,35	11,68	10
ПАМ (відн. од.)	25 процентиль	0,76	1,05	0,88	1,1	1,14
	медіана	1,37	1,64	1,34	1,73	1,72
	75 процентиль	2,20	2,93	2,04	2,12	2,42

Примітки: вірогідна різниця між відповідними показниками: \* p < 0,01 – у чоловіків і жінок; \$ p < 0,01 – у чоловіків-абітурієнтів і чоловіків-слухачів відносно чоловіків-студентів; # p < 0,01 – у абітурієнтів і слухачів жіночої статі відносно жінок-студентів.

До того ж нами було виявлено, що в чоловіків-абітурієнтів показник ФРСвищий, ніж у жінок-абітурієнтів. Це є одним із доказів наявності у чоловіків загалом більш високого тонусу ЦНС у порівнянні з жінками, і як наслідок – якінішої організації функціональної системи, яка реалізує певну реакцію [5]. Доказом цього припущення може бути виявлене нами достовірно вища ( $p<0,01$ ) швидкість простоти сенсомоторної реакції у чоловіків-абітурієнтів, ніж у жінок відповідної групи.

Однак слід відмітити, що представники чоловічої статі групи абітурієнтів у нашому дослідженні робили

значно більше помилок (показник ПГМ,  $p<0,01$ ), ніж жінки, що загалом не суперечить літературним даним [11].

Чутливими до наявності фактора психоемоційного напруження як у групі чоловіків-абітурієнтів, так і в групі чоловіків-слухачів виявилися показники ГАЛЬМ і УРІВН ( $p<0,01$ ). Так, в умовах значного психоемоційного напруження показник гальмування нервових процесів значно зменшувався в порівнянні з його значеннями за оптимальних умов діяльності. Щодо показника врівноваженості нервових процесів, то його зміни є переконливим свідченням того, що процеси збудження за умов

психоемоційного напруження значно переважають процеси гальмування.

Необхідно зазначити, що підвищення рівня відповідальності за результати роботи неоднаково змінювало ряд показників у чоловіків-абітурієнтів і чоловіків-слухачів. Так, за умов підвищеної відповідальності за результат показники ШПСР, ШРВ, ШРВЛ вірогідно знизилися ( $p<0,01$ ) у абітурієнтів, а у слухачів залишився незмінними.

У жінок також були виявлені показники стану психофізіологічних функцій, які достовірно змінювалися ( $p<0,01$ ) за умов психоемоційного напруження. Так, у абітурієнтів і слухачів жіночої статі точність реакції на рухомий об'єкт РРО за таких умов стала більш високою, гальмівні процеси стали менш вираженими, а показник урівноваженості нервових процесів на відміну від чоловіків залишився незмінним. У жінок-абітурієнтів ШПСР і ФРС знизилися, а в жінок-слухачів показник величини випереджувальних реакцій ЗБУД став менш вираженим, а показник ФРНП – більш високим.

Нами також виявлено достовірні відмінності ( $p<0,01$ ) у показниках ФРНП, ПГМ і ПАМ при їхньому порівнянні в абітурієнтів і слухачів чоловічої статі. У слухачів ФРНП і ПАМ виявилися більш високими, а показник ПГМ – більш низький, ніж у абітурієнтів. У жінок-слухачів показник ШПСР був вищий, ніж у жінок-абітурієнтів. На нашу думку, це можна пояснити тим, що слухачі, які є випускниками закладів вищої освіти, мають багатший досвід проходження іспитів і відбіркових тестувань, ніж абітурієнти – випускники середніх шкіл і училищ, і реакція слухачів на психоемоційне навантаження у них є менш вираженою, ніж у абітурієнтів, що, можливо, і є причиною вірогідно вищих психофізіологічних показників у слухачів.

Узагальнюючи отримані результати, хотілося б відзначити, що як у чоловіків, так і у жінок за різних умов проходження тестування показники точності реакції на рухомий об'єкт, збудження, гальмування та врівноваженості нервових процесів виявилися найбільш інформативними. Також знайдено достовірну різницю серед

указаних показників у представників чоловічої та жіночої статі як в оптимальних умовах, так і за умов підвищеної відповідальності за результат, які проникують значне психоемоційне напруження. Відомо, що час реакції на рухомий об'єкт є різновидністю часу простоти сенсомоторної реакції, але на відміну від неї відомостей про РРО та його складові небагато [6; 2; 8]. Тому наше дослідження є актуальним і доповнює існуючу літературні дані [2], які стверджують, що показник РРО та його складові можуть слугувати надійним індикатором функціонального стану ЦНС людини.

**Висновки.** За умов різної відповідальності за результат діяльності у чоловіків та жінок неоднаково змінюються стан властивостей психофізіологічних функцій. Зокрема у чоловіків найбільш інформативними є показники гальмування та врівноваження нервових процесів, меншою мірою – показники швидкості простоти сенсомоторної реакції та швидкості реакції вибору. У жінок найбільш інформативними є показники точності реакції на рухомий об'єкт і гальмування нервових процесів, меншою мірою – показники збудження нервових процесів, функціонального рівня системи, швидкості простоти сенсомоторної реакції, функціональної рухливості нервових процесів.

1. Бойко Е.И. Время реакции человека. – М., 1964.
2. Дубровина З.В., Блинова Л.Т., Макарова Л.П. // Физиология человека. – 1980. – Т. 6, № 6. – С. 1076–1084.
3. Зайцев А.В., Лупандин В.И., Сурнина О.Е. // Физиология человека. – 1999. – Т. 25, № 6. – С. 34.
4. Лейтес Н.С. Результаты определения уровня уравновешенности основных нервных процессов двигательными методиками // Типологические особенности высшей нервной деятельности человека. – М., 1963. – Т. 3. – С. 155–163.
5. Лоскутова Т.Д. // Физиол. журнал СССР. – 1975. – Т. LXI, № 1. – С. 3–11.
6. Лупандин В.В., Лупандин В.И. // Журн. высшей нерв. деят. – 1994. – Т. 44, вып. 3. – С. 610–6137.
7. Макарчук М.Ю., Чікіна Л.В., Філімонова Н.Б. // Вісн. КНУ ім. Т. Шевченка. Біологія. – 2004. – Вип. 42. – С. 37–39.
8. Сурнина О.Е., Лебедєва Е.В. // Физиол. человека. – 2001. – Т. 27, № 4. – С. 56–60.
9. Філімонова Н.Б. Комп'ютерна експрес-методика для вивчення психофізіологічного стану людини // Культура здоров'я. Зб. наук.-метод. праць. – Харсон, 2000. – С. 204–209.
10. Шошоль Р. Время реакции // Экспериментальная психология. – М., 1966. – С. 314.
11. Kerr B., Blanchard C., Miller K. // J. Exp. Child Psychology. – 1980. – Vol. 29, № 3. – P. 52.

Надійшла до редакції 25.10.05

УДК 612.018 : 612.351.5 + 612.26

П. Янчук, д-р біол. наук, В. Комаренко, канд. біол. наук, О. Пасічніченко, канд. біол. наук, Я. Русінчук, асп., А. Терехов, лаб.

## УЧАСТЬ ЕНДОТЕЛІНУ-1 У РЕГУЛЯЦІЇ КРОВООБІГУ, КИСНЕВОГО БАЛАНСУ ТА ЖОВЧОСЕКРЕТОРНОЇ ФУНКЦІЇ ПЕЧІНКИ

Установлено, що ендотелін-1 (ET-1) зумовлює звуження ворітних судин печінки, підвищення в ній рівня  $pO_2$ , та пригнічення жовчовиділення. Вазомоторний ефект на ворітні вени ET-1 частково здійснюється через  $\alpha$ -адренорецептори (можливо, завдяки участі посередника, зокрема норадреналіну, який синтезується ендотеліоцитами під впливом ET-1), ймовірно, через специфічні ET-рецептори. Через останні, належно, реалізуються впливи ET-1 і на тканинне дихання печінки.

*It was shown that the endothelin-1 evokes constriction of the liver portal vessels, increase in  $pO_2$  and decrease in bile secretion. Vasomotor effect of endothelin-1 on portal veins realizes partially through  $\alpha$ -adrenoreceptors (with possible participation of a messenger such as noradrenaline, which synthesizes in endothelium under the ET-1 action), or through specific ET-receptors, which mediate ET-1 action on oxygen consumption.*

**Вступ.** Ендотелін-1 (ET-1) – ендотеліозалежній фактор, якому притаманна сильна судинозвужувальна дія. Припускається, що існує новий опосередкований ендотелієм механізм контролю діяльності серцево-судинної системи, який реалізується шляхом синтезу і виділення ендотеліну. Разом з цим, ендотеліоцити не єдині клітини в організмі, які можуть синтезувати ендотелін. Таку здатність мають нейрони, астроцити, макрофаги, гладенькі м'язи судин, гепатоцити [2; 5; 8]. Дія ендотеліну на артеріальні судини організму досліджується більш-менш регулярно, тоді як його вплив на судинне русло печінки –

орган, що має специфічне подвійне кровозабезпечення і якому притаманна висока метаболічна активність у зв'язку з виконуваними важливими функціями, лишається до цього часу майже не вивченим. Зустрічаються лише поодинокі роботи з цього питання [7; 10]. Щодо впливу ET-1 на кисневий гомеостаз печінки, то такі дані в науковій літературі донедавна були відсутні взагалі. Нічого невідомо про дію ET-1 на одну з найважливіших функцій печінки – жовчовиділення. У зв'язку з цим метою роботи було дослідити дію ET-1 на кровообіг, кисневий баланс і жовчовидільну функцію печінки.

Об'єкт і методи дослідження. У гострих дослідах на наркотизованих щурах (уретан – 1г/кг, або тіопентал натрію – 80мг/кг) реєстрували тиск крові в сонній артерії та у ворітній вені електроманометром ЕМТ-31, кровонаповнення печінки – реографом РГ-4-01, локальний кровотік у печінці визначали методом кліренсу водню з електрохімічною його генерацією [3] – поляграфом LP-9. За допомогою останнього приладу реєстрували й напруження кисню в печінці. Усі показники записували на реєстраторі Н071.6М. ET-1 (1мкг/кг), фентоламін (2–4 мг/кг) уводили тваринам внутрішньопортально.

В іншій серії дослідів записували скорочення ізольованої смужки ворітної вени (ВВ) щура, яку закріплювали в плексигласовій камері та перфузували розчином Тіроде. Реєстрували скорочення ВВ за допомогою пристрою, що складався з механотрона 6МХ1С, підсилювача постійного струму, осцилографа С1-64А та реєстратора Н338. Досліджувані речовини вводили в перфузат, що омивав препарат із швидкістю 2–3 мл/хв.

Для перевірки розподілу на нормальність було використано W-тест Шапіро – Уілкса, тест Левена, перевірку ексцесу й асиметрії. Імовірність похибки першого роду  $\alpha > 0,05$ . Оскільки наші дані виявилися нормально розподіленими, ми розраховували середнє значення (M) і похибку середнього значення ( $\pm m$ ). Порівняння вибірок проводилося за допомогою t-критерію Стьюдента.

**Результати та їх обговорення.** Вихідні значення досліджуваних показників у щурах у дослідах *in vivo* становили: системний артеріальний тиск (САТ) –  $94,3 \pm 5,2$  мм рт. ст., тиск у ворітній вені (Твв) –  $5,6 \pm 0,2$  мм рт. ст., кровонаповнення печінки (КНП) –  $23,3 \pm 0,3$  мл/100 г маси органа; локальний кровотік (ЛК) –  $114,9 \pm 9,1$  мл/100г • хв, напруження кисню в печінці ( $pO_2$ ) –  $24,8 \pm 0,6$  мм рт. ст.

Уведення ендотеліну-1 (1мкг/кг) викликало підвищення САТ на 19 % і Твв на 28 % та зменшення КНП на 39 % і ЛК на 23 % ( $p < 0,05$ ). Це свідчить про те, що ET-1 звужує як артеріальні, так і ворітні судини печінки. Підтвердженням цьому слугують також досліди *in vitro*, в яких ET-1 у концентрації  $2 \cdot 10^{-9}$  моль/л викликав тонічне скорочення ізольованих препаратів ворітної вени із силою  $0,7 \pm 0,1$  мН, тобто на 12 % потужніше від сили вихідного натягу препаратів ( $p < 0,01$ ). Поряд із звуженням судин печінки та зменшенням її кровопостачання, ET-1 призводив до підвищення рівня напруги кисню в залозі на 18 % і зменшення жовчовиділення на 25 % ( $p < 0,01$ ).

Печінка – орган, що має подвійне кровопостачання. По ворітній вені до печінки надходить 70–90 % від загальної кількості крові, що надходить до органа, а решта

(10–30 %) – по печінковій артерії [4]. Артеріальна кров насичена киснем на 94–97 %, тоді як кров у ворітній вені – на 35–60 %. Але незважаючи на те, що оксигеназа порталної крові значно менша, ніж артеріальної, більша за об'ємом кількість крові, яка надходить до печінки по ворітній вені, виявляється вирішальною в плані забезлечення органа киснем [1]. Тому, як правило, зменшення кровотоку в печінці супроводжується зниженням рівня напруженості кисню в ній. Проте в наших дослідах поряд із зменшенням локального кровотоку і кровонаповнення печінки у відповідь на введення ET-1 спостерігалось зростання рівня напруженості кисню в залозі. Цей факт можна пояснити лише припущенням, що ендотелін-1 пригнічує інтенсивність тканинного дихання в печінці. На користь цього певною мірою свідчить і зареєстроване нами під час дії ET-1 пригнічення такого киснезалежного процесу, як жовчовиділення. До речі, за результатами експериментів *in vivo*, отриманими групою американських дослідників на чолі з Паксіаном [9] ендотелін-1 при внутрішньопортальному введенні викликає зменшення споживання кисню печінкою, тоді як застосування IRL1620 (агоніста ET<sub>B</sub>-рецепторів) не впливало на рівень споживання кисню органом.

У подальших дослідженнях було вирішено з'ясувати роль  $\alpha$ -адренорецепторів у реалізації звужувальної дії ендотеліну-1 на судини печінки, адже раніше нами була виявлена можливість участі зазначених рецепторів у констрикторних реакціях внутрішньопечінкових ворітніх судин на ацетилхолін [6]. Проведені нами експерименти показали, що внутрішньопортальне введення фентоламіну (2–4 мг/кг), частково блокує реакції Твв, КНП і ЛК на ET-1. Наочним прикладом цьому є рис. 1, на якому чітко видно, що до введення фентоламіну ендотелін-1 підвищував тиск у ворітній вені на 28 % і зменшував кровонаповнення печінки на 39 % ( $p < 0,01$ ), тоді як на фоні блокади  $\alpha$ -адренорецепторів Твв зростав лише на 19 %, а КНП зменшувалось на 27 %, до того ж відмінність між цими реакціями статистично вірогідна ( $p < 0,05$ ). Це свідчить про те, що реалізація звужувального впливу ендотеліну-1 на ворітні судини, принаймні частково, здійснюється шляхом активації  $\alpha$ -адренорецепторів. Цілком можливо, що цей ефект ET-1, як і в описаному нами випадку з ацетилхоліном [6], відбувається за участю посередника, імовірно, норадреналіну, який синтезується ендотеліоцитами під впливом ET.

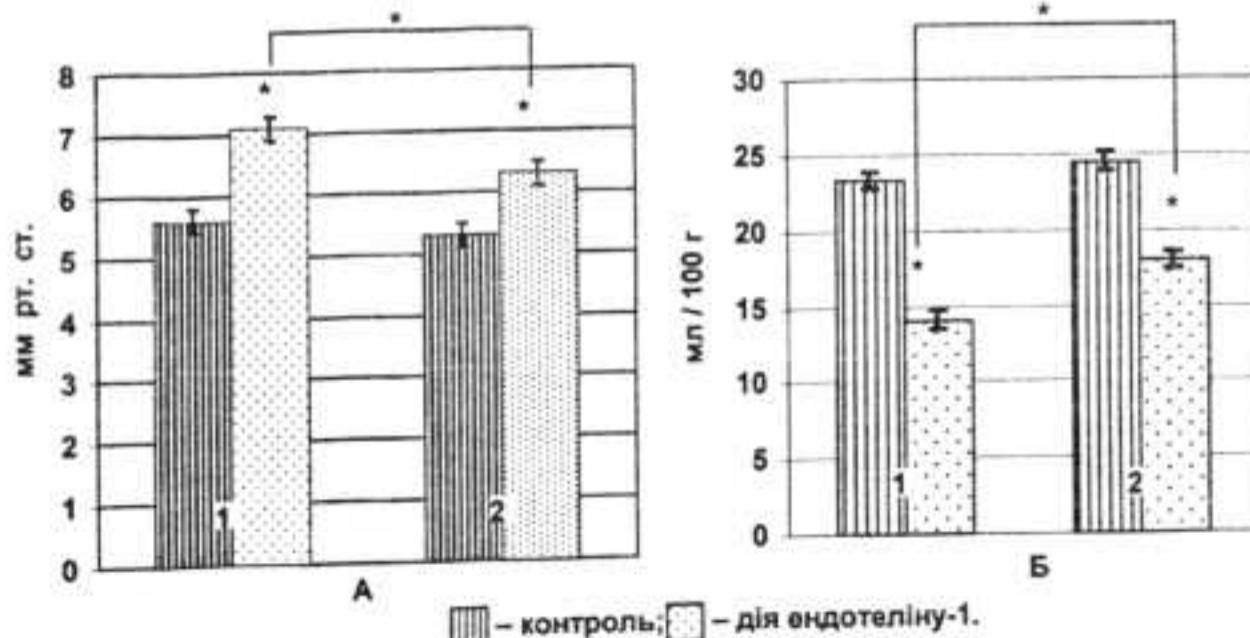


Рис. 1. Вплив внутрішньопортального введення ендотеліну-1 на тиск у ворітній вені (А) і кровонаповнення печінки (Б) щура до (1) і після (2) блокади  $\alpha$ -адренорецепторів фентоламіном  
\* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$

Разом з тим, блокада  $\alpha$ -адренорецепторів фентоламіном не змінювала реакції напруженості кисню в печінці щурів у відповідь на введення ET-1. Можливо, ендотелін-1 зумовлює вплив на дихання гепатоцитів через специфічні ендотелінові рецептори.

**Висновки.** Результати наших досліджень свідчать про те, що ET-1, так само як і в артеріальних судинах організму, виявляє звужувальну дію на ворітні судини печінки, зумовлюючи підвищення тиску у ворітній вені, зменшення локального кровотоку в печінці та її кровонаповнення. Поряд з цим, ET-1 призводить до підвищення рівня напруги кисню в печінці та пригнічує інтенсивність жовчовиділення. Свій вазомоторний ефект на ворітні вени ET-1 частково здійснює через їхні  $\alpha$ -адренорецептори (можливо, завдяки участі посередника, зокрема норадреналіну) і, ймовірно, через специфічні ендотелінові рецептори. За участю

останніх, напевно, реалізуються впливи ендотеліну-1 і на тканинне дихання печінки.

1. Березовский В.А. Напряжение кислорода в тканях животных и человека. – К., 1975.
2. Минушкина Л.О., Затейщикова Д.А., Сидоренко Б.А. // Кардиология. – 2003. – № 9. – С. 67–71.
3. Москаленко Ю.Е., Демченко И.Т., Буров С.В., Митрофанов В.Ф. // Физиол. журн. СССР им. И.М. Сеченова. – 1974. – № 4. – С. 850–853.
4. Парин В.В., Мирсон Ф.З. Очерки клинической физиологии кровообращения. – М., 1964.
5. Патарая С.А., Преображенский Д.В., Сидоренко Б.А., Масленко В.П. // Кардиология. – 2000. – № 6. – С. 78–85.
6. Янчук П.І., Пасічніченко О.М., Комаренко В.І. та ін. // Вісн. Київ. ун-ту ім. Т. Шевченка. Біологія. – 2004. – Вип. 42. – С. 39–41.
7. Kaneda K., Ekataksin W., Sogawa M. et al. // Hepatology. – 1998. – Vol. 27, № 3. – P. 735–747.
8. Levin E.R. // The new england journal of medicine. – 1995. – Vol. 333, № 6. – P. 356–363.
9. Paxian M., Keller S.A., Baveja R. et al. // Microcirculation. – 2004. – № 11 (5). – P. 435–449.
10. Wang H.G., Shibamoto T., Miyahara T. // American J. of physiol. – 2004. – Vol. 273. – G1036–G1043.

Надійшла до редакції 27.09.05.

УДК 577.112.083:577.152.1:616.33-002.44

К. Дворщенко, канд. біол. наук, О. Дворщенко, мол. наук. співроб.,  
Л. Остапченко, д-р біол. наук

## ЗАГАЛЬНИЙ СКЛАД БІЛКІВ І РІВЕНЬ СУКЦИНАТДЕГІДРОГЕНАЗИ В МІТОХОНДРІЯХ КЛІТИН СЛИЗОВОЇ ШЛУНКА ПРИ ЕТАНОЛОВІЙ ВИРАЗЦІ

**Визначено склад білків у мітохондріях клітин слизової оболонки шлунка на ранньому етапі розвитку етанолової виразки. Виявлено деградацію фракції білків з молекулярною масою 113 кДа. Показано одночасне зниження ферментативної активності сукцинатдеідрогенази на 14 % порівняно з контролем.**

**It fixed composition of proteins in mitochondria of cells of gastric mucosa at early stage of development of ethanol ulcer. It is revealed a degradation of a fraction of proteins with molecular weight 113 kDa. Is shown simultaneous decrease of enzymatic activity of succinate dehydrogenase on 14 % in comparison with the control.**

**Вступ.** Незважаючи на інтенсивне дослідження виразкової хвороби шлунка, дотепер не існує чіткого уявлення про природу, етіологію та патогенез цього захворювання. У зв'язку з тим, що виразкова хвороба є одним з найпоширеніших захворювань, дослідження механізмів ініціації та розвитку даної патології є актуальним проблемою сьогодення [3; 8].

Особливе місце у виникненні патологічних змін епітеліальних клітин слизової шлунка при виразковій хворобі посідають мітохондрії, які відіграють основну роль у біоенергетичних процесах клітини [7]. Цілісність структури цих органел щільно пов'язана з їхньою функціональною активністю. Серед них важливим є стан білків мітохондрій, роль яких є провідною у клітинному метаболізмі.

Відображенням стану енергетичного обміну в організмі є рівень ферментативної активності сукцинатдеідрогенази, яка каталізує реакцію одного з важливих етапів циклу трикарбонових кислот, унаслідок чого при окисненні 1 моля сукцинату синтезується 2 моля АТФ. У зв'язку з цим, дослідження стану мітохондрій, зокрема загального складу білків і ферментативної активності сукцинатдеідрогенази є важливим для розуміння розвитку патології в епітеліальних клітинах шлунка при виразковій хворобі.

Метою роботи було дослідити ферментативну активність сукцинатдеідрогенази та стан загального складу білків мітохондрій клітин слизової оболонки шлунка при етаноловій виразці.

**Об'єкт і методи досліджень.** В експериментальних дослідженнях використовували щурів лінії Вістар вагою 180–230 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Етанолова модель виразки шлунка створювалась пероральним уведенням 80 % етилового спирту

загальноприйнятим методом [4]. Отримання загальної фракції клітин слизової оболонки шлунка проводили за методом [2]. Мітохондрії отримували шляхом диференційного центрифугування у 0,25 моль/л сахарозі.

Аналіз білкового складу клітин слизової шлунка проводили за допомогою електрофорезу у 10 %-му поліакриламідному гелі за методом Леммлі [6]. Для оцінки результатів електрофорезу використовували програму TotalLab 1.10.

Ферментативну активність сукцинатдеідрогенази визначали згідно з методом, описаним у роботі [1].

**Результати та їх обговорення.** Декапітацію щурів проводили через 1 год після введення етилового спирту тваринам. Показано, що при етаноловій виразці відбуваються зміни в загальному складі білків мітохондрій клітин слизової оболонки шлунка порівняно з контрольними тваринами. Здійснюється гідроліз фракції білків з молекулярною масою 113 кДа (рис. 1). Отже, уже на початковій стадії розвитку виразки, викликаної етиловим спиртом, у мітохондріях клітин слизової оболонки шлунка відбувається деградація групи білків, що може призводити до структурно-функціональних змін цих органел.

Для дослідження енергетичного стану мітохондрій загальної фракції клітин слизової оболонки шлунка на ранньому етапі виникнення етанолової виразки нами була визначена активність сукцинатдеідрогенази, яка є важливим показником енергетичного обміну в організмі. Установлено зниження на 14 % ферментативної активності сукцинатдеідрогенази в мітохондріях клітин слизової шлунка при гострій моделі етанолової виразки, що відповідно спричинює падіння рівня АТФ і послаблення енергетичного обміну в епітеліальних клітинах шлунка [5].

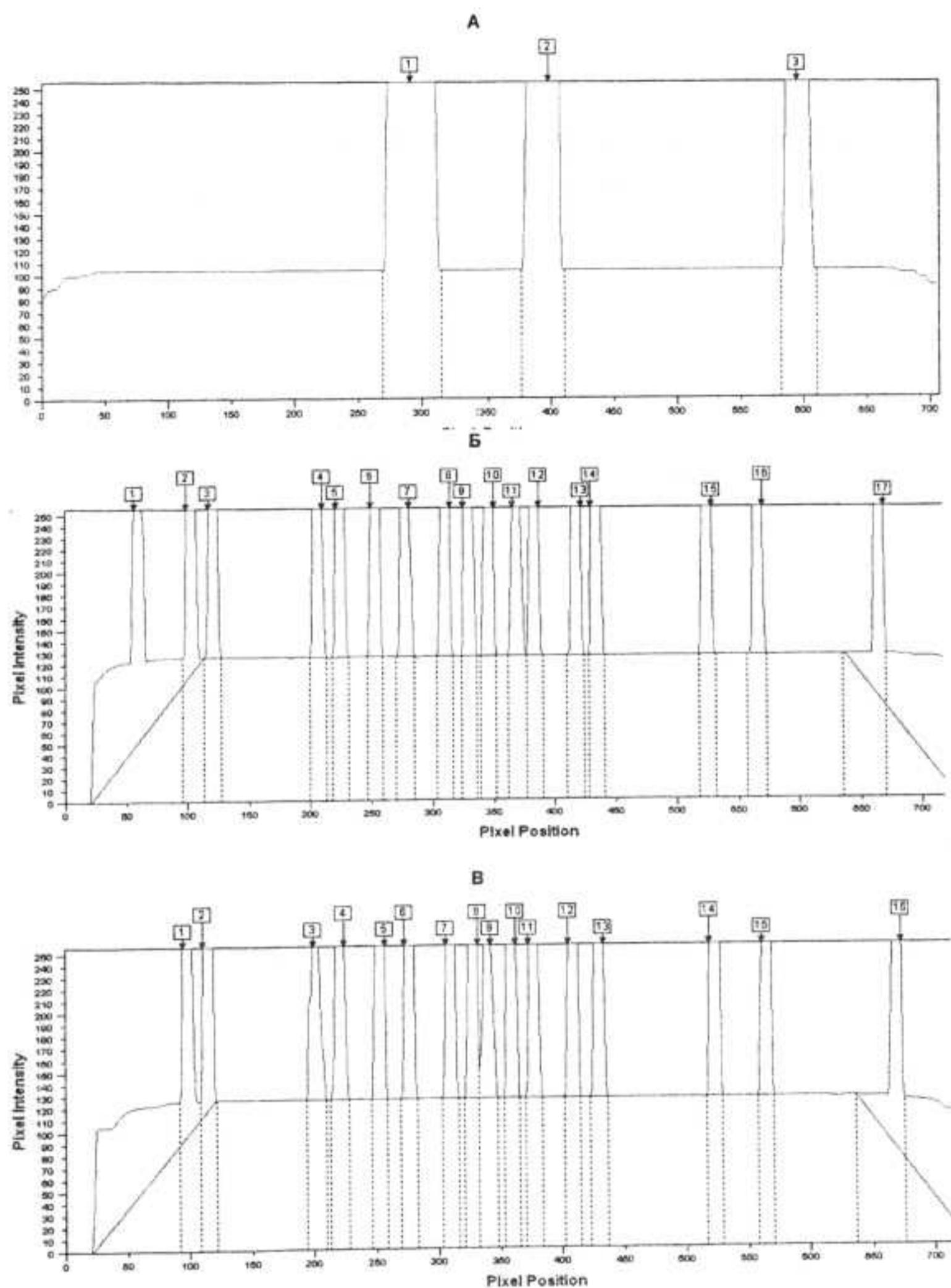


Рис. 1. Денситограма білків мітохондрій клітин слизової оболонки шлунка:  
А – стандарти, Б – контроль, В – етанолова виразка.

**Висновки.** Згідно з отриманими результатами вже на ранньому етапі розвитку етанолової виразки відбувається порушення структурно-функціонального стану мітохондрій епітеліальних клітин слизової оболонки шлунка, що виявляється в деградації групи білків мітохондрій і зниженні активності сукцинатдегідрогенази.

1. Прохорова М.И. Методы биохимических исследований. – Ленинград, 1982. 2. Таиров М.М., Берсимбаев Р.И., Ареутинская С.В., Салганик Р.И. // Биохимия. – 1983. – Т. 48, № 6. 3. Филиппов Ю.А., Шмидель

3. Н. Петречук П.Н., Скирда И.Ю. // Гастроэнтерология. – 1999. – Вып. 28. 4. Cao H., Wang M., Jia J. et al. // J. of health science. – 2004. – Vol. 50, № 1. 5. Dvorschenko K.O., Kovalyova V.A., Ostapchenko L.I. // Neurohumoral and cellular regulatory mechanisms of digestion processes: Second internat. conf., Kyiv, 2005. – Kyiv, 2005. 6. Laemmli U.K. // Nature. – 1970. – Vol. 227. 7. Szewczyk A., Wojtczak L. // Pharmacol. Rev. – 2002. – Vol. 54, № 1. 8. Vouillamoz D., Viani F., Jomod P. et al. Peptic diseases // Rev. Med. Suisse. – 2005. – Vol. 1(3).

УДК 612.821

I. Тубальцева, асп., М. Макарчук, д-р біол. наук, В. Хиля, д-р хім. наук,  
Н. Горбуленко, інж., В. Лозова, А. Васильєва, О. Коваленко, студ.**ВПЛИВ АДІАХРОМУ НА ПОВЕДІНКУ ЩУРІВ ПІСЛЯ ІММОБІЛІЗАЦІЙНОГО СТРЕСУ**

Досліджено вплив біофлавоноїду адіахрому на відновлення природної поведінкової активності щурів після гострого іммобілізаційного стресу. Показано, що з часом у тварин, які приймали адіахром, швидше відновлюються локомоторна та дослідницька активність, що може свідчити про участь антиоксидантних речовин у запобіганні патологічних наслідків стресу та зумовленого ним розвитку порушень поведінки.

*The effects of the acute immobilization stress on a behavior of rats under the bioflavonoid adiachrom administration are described in this article. Exposure to stress induces the impairment of antioxidant defenses, leading to oxidative damage. The obtain data shows that antioxidant administration can decrease the impair consequences of the stress and attenuate the developing of stress-related behavioral activity's inhibition.*

**Вступ.** Відомо, що хронічний стрес відіграє вирішальну роль у патогенезі ментальних порушень, включаючи тривожність та депресію, а також за певних умов є причиною виникнення ряду захворювань внутрішніх органів [4; 7]. У розвитку патологічних станів будь-якої етіології практично завжди виникає гіпоксичний стан того чи іншого ступеня, що й визначає в багатьох випадках тяжкість і кінець патологічного процесу [2; 8]. Саме гіпоксія, в основі якої лежить патологічне окиснення  $O_2$ , є пусковим моментом різних порушень. Стабільність природної антиоксидантної активності слугує одним з основних показників нормального гомеостазу і при виснаженні антиоксидантів та антиоксидантних ферментів процеси вільнопардикального окиснення виходять з-під контролю. За таких умов важливе значення у профілактиці та лікуванні різноманітних стресобумовлених порушень відводиться антистресорній терапії, перспективним напрямком якої вважається використання антиоксидантних засобів [3; 5; 6; 9]. Ефективна та теоретично обґрунтована фармакотерапія вимагає глибокого вивчення фізіологічних і біохімічних механізмів дії застосованих препаратів. Саме тому метою даного дослідження була порівняльна оцінка впливу адіахрому (препарату класу біофлавоноїдів) на поведінку у відкритому полі щурів, які попередньо піддавалися дії іммобілізаційного стресу.

**Об'єкт і методи дослідження.** Досліди було проведено на 33 білих безпородних щурах-самцях масою 160–200 г, які утримувались у віварії за стандартних умов. Усі тварини були розподілені на три групи. Щурів першої та другої груп іммобілізували протягом 24 год. Тварини першої та третьої групи упродовж двох тижнів до іммобілізації щурів першої та другої груп разом з їхнім споживали адіахром у дозі 25 мг/кг. На перший, третій, п'ятий, сьомий та чотирнадцятий день після іммобілізації всі експериментальні тварини проходили тест "відкрите поле", який проводився за стандартною методикою в першій половині дня. У відкритому полі впродовж 3 хв реєстрували рівень загальної рухової активності – локомоції (кількість перетнутих квадратів), два показники орієнтуально-дослідницької активності (кількість підйомів на задні лапи та кількість перетнутих внутрішніх квадратів), а також вегетативні маркери стресу – кількість актів уринації і кількість болюсів.

Для обробки отриманих результатів використовували пакет програм "Статистика" 4.5, оцінюючи достовірність різниці за непараметричним критерієм Манна – Уйтні.

**Результати та їх обговорення.** Тестування щурів усіх груп у відкритому полі на перший день після застосування іммобілізації, не дали підстав говорити про значний вплив застосування адіахрому, оскільки поведінкові

розбіжності між щурами першої та другої групи, які зазнавали іммобілізаційного стресу, були практично відсутні. Проте тварини цих двох груп достовірно відрізнялися за своєю поведінкою від щурів третьої групи за деякими реєстрованими ознаками. Як видно з табл. 1, щури першої та третьої групи достовірно ( $p<0,01$ ) відрізнялися за тривалістю актів грумінгу. Це дозволяє говорити про можливе посилення загальної стресованості іммобілізованих тварин порівняно з групою, яка не зазнала експериментального стресу. У той же час щури другої та третьої груп достовірно розрізнялися за рівнем дефекації (відповідно,  $0,42\pm1$  та  $2,1\pm2,02$  болюсів,  $p<0,03$ ). Отримані нами результати щодо змін рівня дефекації у щурів, які зазнали іммобілізаційного стресу, загалом не узгоджується з літературними даними про посилення інтенсивності дефекації при посиленні стресу [1; 5]. Подібний характер змін дефекації в іммобілізованих тварин може бути пояснений багатьма факторами, серед яких можна відзначити значні зміни функціонування шлунково-кишкового тракту в таких тварин у період іммобілізації.

На третій день після моделювання стресового стану нами було виявлено, що в умовах відкритого поля щури першої групи мали вірогідно нижчу локомоторну активність, ніж тварини третьої ( $21,45\pm14,55$  та  $40\pm20,3$  відповідно,  $p<0,03$ ), у той же час достовірно відрізняючись за цим показником від тварин другої групи за рівнем уринації ( $8,18\pm7,97$  у першій і  $1,75\pm2,67$ ,  $p<0,03$ , у другій групі тварин).

На п'ятий день після іммобілізації достовірні відмінності в поведінці тварин усіх груп майже зникали, якщо не брати до уваги значно збільшену щодо щурів третьої групи кількість перетнутих внутрішніх квадратів у щурів першої експериментальної групи (табл. 1). Це певною мірою може свідчити про збільшення рівня дослідницької активності цих тварин [1].

Тестування на сьомий день після стресу виявило зниження локомоторної активності щурів другої групи щодо нестレスованих тварин третьої групи ( $27,67\pm26,16$  перетнутих квадратів у другій і  $39,20\pm10,3$ ,  $p<0,04$  у третьій групі щурів). При цьому частота актів грумінгу у тварин першої групи була вірогідно нижчою, ніж у тварин другої ( $0,82\pm0,98$  відносно  $1,83\pm1,27$ ,  $p<0,03$ ). Останнє можна пов'язати зі збільшенням у стресованих тварин, що отримували адіахром, кількості повних, неперервних актів грумінгу, в яких стадії плавно змінюють одна одну без зациклення.

На чотирнадцятий день стресовані тварини першої та другої груп демонстрували вірогідне пригнічення кількості вставань на задні лапи порівняно з щурами третьої групи. У той же час у щурів другої групи вірогідно знижувалася кількість перетнутих зовнішніх квадратів у порівнянні

з нестресованими тваринами. Так, кількість вставань у першій групі становила  $2,09 \pm 3,18$ , а в третій –  $6,20 \pm 4,52$  ( $p < 0,02$ ), тоді як у другій групі цей показник був  $0,92 \pm 1,44$  проти  $6,20 \pm 4,52$  у третій ( $p < 0,002$ ). Вірогідно менша ( $p < 0,002$ ) кількість перетнутих зовнішніх квадратів щурими другої групи порівняно з нестресованими (табл. 1)

разом з пригніченням кількості вставань, на нашу думку, можуть свідчити про розвиток стрес-індукованого поведінкового дефіциту в цих тварин, дещо більше виражено-го, ніж у щурів, які піддавалися антистресовій терапії шляхом уведення адіахрому.

**Таблиця 1. Динаміка поведінкової активності стресованих щурів в умовах застосування біофлавоноїду адіахрому**

Показники	Групи	Дні				
		Перший	Третій	П'ятий	Сьомий	Чотирнадцятий
Внутрішні квадрати	I	$2 \pm 1,55$	$0,55 \pm 0,82$	$2,45 \pm 3,30^{***}$	$0,18 \pm 0,60$	$0,27 \pm 0,90$
	II	$2 \pm 2,04$	$1,08 \pm 1,24$	$0,83 \pm 1,4$	$0,17 \pm 0,58$	0
	III	$4 \pm 2,75$	$0,80 \pm 1,03$	$0,30 \pm 0,67^{***}$	$0,4 \pm 0,84$	$0,3 \pm 0,67$
Зовнішні квадрати	I	$27,27 \pm 16,94$	$21,45 \pm 14,55^{***}$	$27,73 \pm 35,26$	$25,64 \pm 24,97$	$22,18 \pm 22,07$
	II	$28,42 \pm 13,51$	$36,67 \pm 23,88$	$41,50 \pm 23,03$	$27,67 \pm 26,16^{****}$	$10,42 \pm 10,41^*$
	III	$39,20 \pm 25,34$	$40,00 \pm 20,30^{***}$	$40,10 \pm 21,36$	$39,20 \pm 10,30^{****}$	$43,30 \pm 23,37^*$
Стійки	I	$5,18 \pm 3,87$	$3,55 \pm 2,54$	$3,36 \pm 5,28$	$5,09 \pm 6,55$	$2,09 \pm 3,18^{**}$
	II	$4,83 \pm 2,92$	$4,75 \pm 5,15$	$4,75 \pm 3,47$	$4,08 \pm 3,92$	$0,92 \pm 1,44^*$
	III	$13 \pm 9,68$	$6,2 \pm 4,08$	$6,70 \pm 5,68$	$5,10 \pm 2,38$	$6,20 \pm 4,52^{**}, *$
Частота грумінгу	I	$1,82 \pm 1,08$	$1,82 \pm 1,66$	$1,64 \pm 1,96$	$0,82 \pm 0,98^{***}$	$1,09 \pm 1,22$
	II	$2,75 \pm 1,14$	$1,92 \pm 1,24$	$1,83 \pm 1,59$	$1,83 \pm 1,27^{***}$	$0,67 \pm 0,89$
	III	$2,5 \pm 1,96$	$2,30 \pm 2,11$	$1,08 \pm 1,48$	$1,60 \pm 1,07$	$0,60 \pm 0,84$
Час грумінгу	I	$48,09 \pm 28,22^*$	$19,82 \pm 13,54$	$10,18 \pm 16,23$	$11,18 \pm 19,17$	$11,91 \pm 14,50$
	II	$37,50 \pm 29,05$	$18,67 \pm 17,02$	$18,17 \pm 15,44$	$18,92 \pm 14,29$	$9,83 \pm 15,50$
	III	$16,4 \pm 11,72^*$	$16,30 \pm 14,59$	$24,00 \pm 27,53$	$12,50 \pm 11,68$	$10,90 \pm 20,49$
Дефекація	I	$0,73 \pm 1,85$	$2,91 \pm 2,51$	$2,27 \pm 2,15$	$2,45 \pm 2,16$	$2,55 \pm 1,92$
	II	$0,42 \pm 1^{***}$	$3,33 \pm 1,78$	$2,33 \pm 2,27$	$1,83 \pm 2,37$	$2,83 \pm 1,70$
	III	$2,1 \pm 2,02^{***}$	$1,90 \pm 2,28$	$1,80 \pm 1,48$	$0,90 \pm 1,60$	$2,40 \pm 1,84$
Уринація	I	$3,45 \pm 4,01$	$8,18 \pm 7,97^{***}$	$3,18 \pm 4,51$	$3,45 \pm 5,03$	$2,55 \pm 3,78$
	II	$3,33 \pm 3,80$	$1,75 \pm 2,67^{***}$	$1,42 \pm 3,18$	$1,00 \pm 2,49$	$0,33 \pm 0,89$
	III	$5,5 \pm 4,84$	$5,8 \pm 7,02$	$2,50 \pm 4,70$	$0,50 \pm 1,27$	$1,00 \pm 1,70$

Примітки: I – група Іммобілізація+Адіахром; II – група Іммобілізація; III – група Адіахром; \* –  $p < 0,01$ ;

\*\* –  $p < 0,02$ ; \*\*\* –  $p < 0,03$ ; \*\*\*\* –  $p < 0,04$ .

Аналізуючи отримані дані, можемо припустити, що хронічне двотижневе застосування біофлавоноїду адіахрому в дозі 25 мг/кг певним чином впливає на поведінкові та вегетативні показники щурів, у яких моделюється гострий стрес шляхом іммобілізації. Рухова активність тих тварин, яким давали адіахром у ранній післястресорний період, пригнічується дещо значніше, ніж тих, які не зазнавали його впливу. Однак у подальшому перші продемонстрували більш значне посилення рухової активності щодо нестресованих, ніж ті тварини, які не отримували адіахром. При цьому спостерігалися значні відмінності між обома стресованими групами у змінах рівня дослідницької поведінки, особливо виражені у другій половині експерименту. Стосовно такого важливого поведінкового домену, як грумінг, необхідно зазначити, що широко відомі протиріччя та складності в його реєстрації й особливо інтерпретації не дозволяють нам зробити однозначні висновки щодо флюктуацій його показників протягом експерименту. Проте ймовірна його асоціація з іншими поведінковими реакціями також підтверджує те, що на перших етапах після іммобілізації адіахромом навіть дещо посилює наслідки стресу, але

надалі дозволяє тварині швидше відновити нормальний рівень поведінкової активності, особливо локомоторної та дослідницької.

Слід відмітити, що описані неузгодженості можуть бути пояснені як неадекватністю використаної дози речовини, так і недостатньою кількістю застосованих тест-систем, необхідних для ефективного виявлення рівню стресованості в різних груп тварин на різних стадіях експерименту.

1. Калуев А.В. Стресс, тревожность и поведение (актуальные проблемы моделирования тревожного поведения у животных). – Киев, 1998.
2. Никонов В.В. // Справ. спец. – 2005. – № 15–16. – С. 24–25.
3. Савченко Л.В. // Фармакол. и токсикол. – 1991. – Вып. 26. – С. 73–79.
4. Esch T., Srefano G.B., Fricchione G.L. // Neuroendocr. letters. – 2002. – № 2. – Р. 199–208.
5. Cryan J.F., Markou A., Lucki I. // Trends in Pharmacological Sciences. – 2002. – Vol. 23, № 5. – Р. 238–245.
6. Huk I., Brovko维奇 V., Nanobashvili I. et al. // Br. J. Surg. – 1998. – Vol. 85, № 8. – Р. 1080–1085.
7. McCracken A. // Stress News. – 2001. – Vol. 13, № 3. – Р. 578–583.
8. Vendemiale G., Grattagliano I., Altomare E. // Int. J. Clin. Lab. Res. – 1999. – Vol. 29, № 2. – Р. 49–55.
9. Yamamoto T., Kikuchi T., Uwahodo Y. // Brain Res. – 2002. – Vol. 934, № 2. – Р. 49–55.

Надійшла до редакції 29.09.05



джені води, а не розчинених у ній речовин. Порівняння наведених спектрів (рис. 1, а, б) свідчить, що при контакті з ПАР вода набуває позитивного заряду, а з ПІР – негативного.

Таким чином, на підставі УФ-спектрів поглинання водних розчинів можна визначити знак електричного заряду води та розчинених у ній речовин (протилежний за знаком заряду води).

Вигляд УФ-спектрів поглинання водних розчинів НК залежить від того, яка вода використовувалась для приготування розчину. Зокрема, пік з максимумом поблизу 205 нм, який вважається характеристичним [8], з'являється лише після набуття водою позитивного заряду (рис. 2). Напевно, поява цього піка пов'язана з виникненням позитивного заряду у води в процесі розчинення НК (і негативного – у самої НК).

Такий розподіл зарядів підтверджується електрофоретичними дослідженнями, під час яких молекули НК за будь-яких умов рухаються до аноду [5], тобто є аніонами.

Знак і величина електричного потенціалу води, яка використовується для приготування розчинів НК, впливає не лише на вигляд УФ-спектрів поглинання, а й на

розчинність та властивості НК. Так, у воді з позитивним потенціалом більшим за 20 мВ ДНК розчиняється за кілька хвилин без перемішування. У воді з негативним потенціалом більшим за 30 мВ, ДНК не розчиняється навіть після інтенсивного перемішування. Впливу потенціалу води на розчинність РНК нами не виявлено.

Знайдені нами відмінності у властивостях ДНК і РНК дозволяють запропонувати методи їхнього розділення, які не потребують спеціального обладнання і вимагають значно менших затрат часу, ніж загальновживані [5].

Після барботування воднем протягом 1 год з водних розчинів ДНК (0,1–1,2 мг/мл) кімнатної температури спостерігається випадання осаду. Поглинання  $A_{260}$  надосадової рідини становить 0,03–0,04 о. о., що на два-три порядки менше, ніж поглинання вихідних розчинів ДНК. При збільшенні часу барботування розчинів ДНК поглинання  $A_{260}$  зменшується до тисячних часток о. о. За тих самих умов з розчинів РНК (poly(rA), poly(rU)) осад не випадає. Промивання осаду ДНК дегазованою дистильованою водою дозволяє повністю відокремити його від РНК.

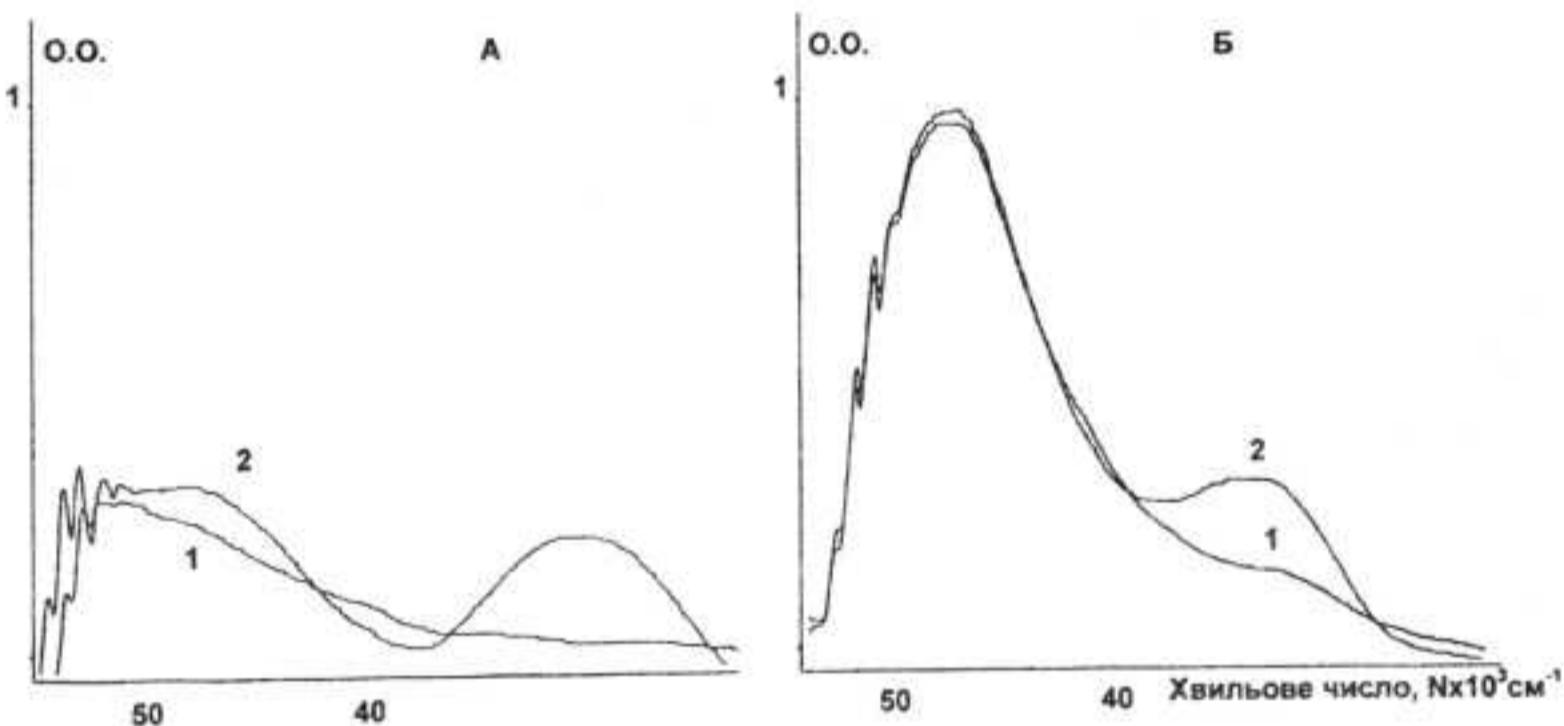


Рис. 2. УФ-спектр поглинання ДНК у воді, потенціал якої майже не змінився в процесі розчинення ДНК (а): 1 – вода; 2 – водний розчин ДНК. УФ спектри поглинання води з позитивним зарядом та розчину ДНК у цій же воді проти повітря (б): 1 – вода; 2 – водний розчин ДНК. Якщо як розчин порівняння використовується вода з таким самим позитивним потенціалом, що й у досліджуваного розчину ДНК, максимум у ділянці 205 нм на спектрі не виявляється

**Висновки.** Неконтрольована зміна потенціалу води та водних розчинів може відбуватися за лабораторних умов. Виявлені залежності УФ-спектрів поглинання води та водних розчинів від знаку їхніх потенціалів і поверхневої активності дозволяють запропонувати простий метод контролю електричного потенціалу розчинів.

Виникнення потенціалу у води призводить до зміни її властивостей як розчинника. Поява в незарядженої води позитивного потенціалу при контакті з НК, напевно, є наслідком розподілу зарядів між об'ємною водою та гідратною оболонкою НК, який відбувається в процесі розчинення НК [7].

Наявність такого розподілу зарядів між гідратною оболонкою НК та об'ємною водою підтверджується даними електрофоретичних досліджень, згідно з якими молекули НК за будь-яких умов рухаються до аноду [5].

Для визначення концентрації НК спектральними методами за поглинанням її розчину при 260 нм, необхідно використовувати кювету порівняння розчином, оптична густина якого дорівнює оптичній густині досліджуваного розчину НК при 205 нм (рис. 2).

Осаджувальну дію на ДНК води, що має негативний потенціал, можна порівняти з висолюючим впливом аніонів на біополімери. Відомо, що висолююча дія визначається величиною заряду аніонів [7].

Поява у позитивно зарядженої води піку з максимумом 205 нм, що збігається з положенням піку на наведених у літературі спектрах водних розчинів НК [3], вимагає, на наш погляд, перегляду уявлень про природу виникнення характеристичних піків НК [5]. Зокрема, поява максимумів в районі 200 нм на УФ-спектрах поглинання розчинів ДНК залежить від поверхневої активності розчинених речовин.

- Гамеева О.С. Физическая и коллоидная химия. – М., 1977.
- Генчик Р. Биомембранные. Молекулярная структура и функции. – М., 1997.
- Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. – М., 1987.
- Некрасов Б.В. Основы общей химии. – Спб., 2003.
- Остперман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование. – М., 1981.
- Пресман А.С. Электромагнитные поля и живая природа. – М., 1968.
- Фридрихсберг Д.А. Курс коллоидной химии. – Л., 1974.
- Шабарова З.А., Богданов А.А. Химия нуклеиновых кислот и их компонентов. – М., 1978.

УДК 577.391:311

В. Ковальова, канд. біол. наук, Л. Гайда, асп.,  
Л. Томачинська, канд. біол. наук

## КАТАЛАЗНА АКТИВНІСТЬ У СЛИЗОВІЙ ШЛУНКА ЗА УМОВ ДІЇ РІЗНИХ ЧИННИКІВ

**Установлено, що препарати природного походження – амівіт і сквален нормалізують активність каталази в клітинах слизової оболонки шлунка щурів за умов етанолової моделі виразки**

**The intensification of the lipid peroxidation and the depression activity catalase at the model experiment's stomach ulcer in the mucosae cells of Wistar rats. Ammivit and scvalen normalization activity catalase.**

**Вступ.** Деградація екстрацелюлярного матриксу й порушення мембранистої структури клітин слизової оболонки шлунка викликана розбалансуванням рівноваги між ендогенними гастропротективними і зовнішніми агресивними чинниками, що призводить до розвитку виразкової хвороби шлунка, є серйозною медичною проблемою. Хоча механізм кислотної секреції парієальними клітинами шлунка тепер достатньо вивчений, механізм утворення виразки шлунка все ще повністю не з'ясований. Серед причин шлункового виразкоутворення найпоширенішими є пошкодження, викликані використанням нестероїдних протизапальних препаратів, впливом стресу, зловживанням спирту, які в значній мірі опосередковуються генерацією активних форм кисню, особливо, гідроксил радикала, хоча пускові механізми в цих випадках є фактороспецифічними. Важливим чинником, від якого залежить концентрація вільних радикалів у клітинах організму, є функціонування антиоксидантного ферменту – каталази, що прискорює процес розкладу пероксиду водню до води та ін. [1].

Значна кількість лікарських препаратів досить ефективна при лікуванні підвищеної кислотності й виразкової хвороби шлунка, але їхне використання не позбавлено побічних ефектів і рецидивів. Тому пошук речовин з противиразковою активністю, які володіють селективною ефективністю при лікуванні ацидоzu та виразкової хвороби шлунка, як і раніше, є актуально.

Метою даної роботи було визначити активність каталази в клітинах слизової оболонки шлунка щурів у динаміці експериментальної виразки та дослідити вплив препаратів природного походження – амівіту та сквалену на ці процеси.

**Об'єкти й методи дослідження.** У дослідах використовували щурів лінії Вістар масою 150 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Модель експериментальної виразки шлунка у щурів створювали за методом, описаним у роботі [2, с. 528]. Слизову оболонку шлунка піддавали гомогенізації в трис-НСІ буфері ( $\text{pH}=7,4$ ) у співвідношенні 1:10 при 0 °C. Активність каталази в гомогенаті слизової оболонки шлунка оцінювали за методом, описаним у статті [3]. Усі показники перераховано на 1 мг білка. Амівіт уводили по 50 мкл 2 рази на добу *per os*. Сквален – довга аліфатична гідрофобна молекула, завдяки чому він має високу здатність до вбудовування в клітинну мембрану. Крім того, він є проміжним продуктом у реакціях біосинтезу холестеролу, важливого компоненту мембраниного бішару, попередника деяких вітамінів і гормонів.

Цей препарат сьогодні розглядають як речовину з антиокиснювальними, протипухлинними, імуностабілізуючими та ранозагоювальними властивостями. Сквален уводили одноразово в комбінації з амівітом.

**Результати та їх обговорення.** Процеси пероксидації ліпідів (ПОЛ) є ключовим чинником (зазвичай у патогенетичному значенні) розвитку виразки шлунка, оскільки це давно доведено для всіх процесів запалення незалежно від локалізації та етіологічних чинників. Порушення антиоксидантної рівноваги зумовлено змінами в механізмі антирадикального захисту. Кatalаза відіграє провідну роль в антиоксидантній системі. Це зумовлено здатністю каталази деградувати пероксид водню, розриваючи при цьому ланцюг перетворення супероксид-аніона на гідроксил радикал. Кatalази, виділені з різних джерел, є білками з консервативними амінокислотними послідовностями. Пероксид водню – субстрат каталази – здатний вільно проникати крізь гідрофобні мембрани [4].

Дослідження рівня активності каталази в клітинах слизової оболонки шлунка щурів показало, що етанолова виразка призводить до суттєвих зрушень в антиоксидантній захисній системі щурів. Згідно з отриманими результатами встановлено, що в динаміці етанолової моделі виразки активність каталази знижується вже на першу добу в 1,8 рази, а на третю – у 2,5 рази порівнюючи з контролем і в подальшому залишається зниженою (табл. 1). Отримані результати свідчать про те, що в динаміці етанолової експериментальної виразки шлунка знижується здатність антиоксидантної системи до інактивації пероксиду водню, надлишок якого утворюється внаслідок ферментативної та не ферментативної дисмутації кисню і супроводжується накопиченням продуктів пероксидації, що й було встановлено нами експериментально. Одержані результати обумовлюють необхідність використання прямих антиоксидантів для компенсації процесів пероксидації за даної патології. Після введення антиоксидантів природного походження амівіту і сквалену було встановлено нормалізацію активності каталази на п'яту добу у тварин з ерозивно-виразковими ушкодженнями слизової, викликаними етанолом. Можна передбачати, що підвищення резистентності слизової оболонки шлунка під впливом антиоксидантів відбувається за рахунок гальмування розвитку структурних пошкоджень і виникнення відповідних функціональних змін у мембрахах клітин, які були викликані етанолом.

Таблиця 1. Активність каталази в клітинах слизової оболонки шлунка щурів за дії різних чинників,  $M \pm m$ ,  $n = 10$

Групи тварин	Активність каталази, Нмоль/мг хв
Контроль	19,0 ± 2,0
Етанолова модель	11,5 ± 1,1*
Контроль (3 доби)	19,5 ± 1,8
Контроль + амівіт (3 доби)	19,3 ± 1,9
Етанол (3 доби)	6,9 ± 0,7*
Етанол + амівіт (3 доби)	6,8 ± 0,7
Контроль (5 діб)	19,3 ± 2,0
Контроль + амівіт (5 діб)	18,8 ± 1,9
Контроль + амівіт + сквален (5 діб)	19,5 ± 2,0
Етанолова модель (5 діб)	7,0 ± 0,5*
Етанол + амівіт (5 діб)	19,0 ± 1,9*
Етанол + амівіт + сквален (5 діб)	21,9 ± 2,1*
Контроль (7 діб)	14,2 ± 0,5
Контроль + амівіт (7 діб)	16,7 ± 1,0
Контроль + амівіт + сквален (7 діб)	18,2 ± 1,8
Етанолова модель (7 діб)	13,0 ± 1,5*
Етанол + амівіт (7 діб)	15,2 ± 1,3*
Етанол + амівіт + сквален (7 діб)	17,3 ± 1,6*

\* – при  $p < 0,05$  різниці достовірні щодо контролю.

**Висновки.** Дослідження впливу біологічно активних речовин на активність каталази при виразкоутворенні показало, що сквален і амівіт характеризуються корегуючим антиоксидантним та цитопротекторним потенціалом і можуть бути рекомендовані до використання при створенні засобів комплексного лікування виразкової хвороби.

1. Арун А.И., Григорьев П.Я., Исаков В.А., Яковенко Е.П. Хронический гастрит. – Амстердам, 1993. – С. 18–64. 2. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Метод. рекомендації / За ред. чл.-кор. АМН України О.В. Стефанова. – К., 2001. – С. 528. 3. Костюк В.А., Потапович А.И., Лунец Е.Ф. // Вопр. мед. хімии. – 1984. – Т. 30. – С. 125–127. 4. Чеварі С., Чаба И., Секей И. // Лаборат. дело. – 1985. – № 11. – С. 687–691.

Надійшла до редакції 18.10.05

УДК 612.821:612 82/83

С. Федорчук, інж. I кат., Ю. Горго, д-р біол. наук,  
Ю. Садовська, канд. біол. наук

## ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ ДІЯЛЬНОСТІ ЗА ПОКАЗНИКАМИ ПСИХОФІЗІОЛОГІЧНИХ ФУНКЦІЙ У ОПЕРАТОРІВ СИСТЕМ СТЕЖЕННЯ

Досліджено реакцію на рухомий об'єкт і функціональну рухливість нервових процесів у зв'язку з ефективністю операторської діяльності в операторів теплових електростанцій. Виявлено, що ефективність операторської діяльності пов'язана з точністю реакції на рухомий об'єкт і не пов'язана з функціональною рухливістю нервових процесів і врівноваженістю нервових процесів.

*It is researched a response on moved plant and functional motility of nervous processes in connection with effectiveness of operator activity for operators thermal power stations. It is detected, that effectiveness operator activity for operators of thermal power stations it is connected to an exactitude of a response on moved plant and it is not linked to functional motility of nervous processes and steadiness of nervous process.*

**Вступ.** Професія людини-оператора автоматизованих систем управління висуває специфічні вимоги до психофізіологічних характеристик людини [1; 2; 3]. Деякі дослідники вирішальне значення для операторських професій у більшості практичних ситуацій надають швидкості й точності реакції оператора та їхньої залежності від наявного функціонального стану людини [3].

Взаємозв'язок елементарних операцій, що входять у загальний процес виконання відповідної дії на сигнал, ускладнює і дослідження реакцій людини-оператора, і визначення розрахунковим шляхом надійності її складних відповідних дій. Тому єдиним достовірним методом визначення ступеня надійності дій оператора залишається експериментальний метод.

У даній роботі в операторів електростанцій оцінювали функціональну рухливість нервових процесів (ФРНП) за швидкістю розпізнання сигналу, який вимагав термінової відповіді на нього, та показники реакції на рухомий об'єкт (РРО). Ефективність опера-

торської діяльності визначалася за оцінками експертів (середнім балом – СБ) під час проведення професійного тестування на повномасштабному тренажері пульта управління технологічними процесами теплових електростанцій.

**Об'єкт і методи дослідження.** Методика даного дослідження функціональної рухливості нервових процесів була заснована на тому, що зменшуючи час експозиції подразників, які вимагали відповідної рухової реакції, можна досягти межі безпомилкових реакцій обстежуваного. Саме цей час експозиції і визначав кількісно (мс) ФРНП головного мозку (чим менша ця величина, тим вища ФРНП) [6].

При оцінці результатів використовували такі показники [5]:

- відсоток помилкових реакцій вибору до загальної кількості пред'явленіх сигналів (ВПР);

• урівноваженість нервових процесів (ВП) визначалася як відсоток помилкових реакцій тільки на "гальмівний" сигнал до загальної кількості всіх сигналів;

• мінімальна експозиція пред'явлення сигналів, досягнута досліджуваним під час тестування (як ФРНП);

• номер сигналу виходу на мінімальну експозицію (С).

Основним показником точності реакції на рухомий об'єкт вважали середню арифметичну величину часу відхилення реакції досліджуваного від моменту перетинання двох рухомих ліній – ТР. Цей показник не відбивав фактор "випередження-запізнення", оскільки вираховувався за модулем. За одиницю відхилення використовували величину відхилення в мілісекундах. Стійкість отриманого результату, а також ступінь відпрацювання та автоматизації навичок оцінювалися за коефіцієнтом варіації точності РРО – ВР [7].

Для детальнішої інтерпретації результатів тестування окремо визначалися середні арифметичні величини запізнілих і випереджувальних реакцій – критерії запізнення (КЗ) і випередження (КВ), а також коефіцієнти варіації цих показників (ВЗ і ВВ). Коефіцієнт балансу РРО (КБР) визначався як відношення середнього арифметичного запізнілих реакцій до середнього арифметичного випереджувальних реакцій. За співвідношенням коефіцієнтів варіації показників ВЗ і ВВ визначався коефіцієнт балансу варіативності РРО – КВР [7].

**Результати та їх обговорення.** У роботі як обстежувані брали участь 147 операторів-чоловіків енергопідприємств віком 22–40 років. Ефективність операторської діяльності визначалася в нашому дослідженні за експертними оцінками (середнім балом) під час проведення професійного тестування на повномасштабному тренажері пульта управління технологічними процесами теплової електростанції. Статистичну обробку даних проводили за допомогою методів непараметричної статистики.

Проведений кореляційний аналіз отриманих результатів не виявив вірогідного зв'язку показника ефективності операторської діяльності з такими показниками реакції на рухомий об'єкт, як ВР, КЗ, КВ, ВЗ, ВВ, КБР

і КВР. Кореляційний аналіз виявив вірогідний зв'язок ( $p < 0,05$ ) середнього балу, який визначав ефективність роботи операторів, з показником точності реакції на рухомий об'єкт ( $r_s = -0,22$ ).

Крім того, кореляційний аналіз отриманих результатів не виявив вірогідного зв'язку середнього бала з вимірюваннями нейродинамічними показниками, такими як ВПР, ВР, ФРНП і С.

З метою дослідження психофізіологічних функцій операторів з різним рівнем ефективності операторської діяльності обстежені ( $n=147$ ) за середнім балом були розподілені на три групи: успішних операторів з оцінкою 8,87–10,00 ( $n=48$ ), неуспішних операторів з оцінкою 0,00–5,00 ( $n=20$ ) та група "середніх" операторів з оцінкою 5,01–8,86 ( $n=79$ ).

У табл. 1 подано результати тестування нейродинамічних якостей і реакції на рухомий об'єкт у групах успішних і неуспішних операторів.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою методів непараметричної статистики. Порівняння результатів тестування за вимірюваннями показниками здійснювали за критерієм Манна – Утні. Групи успішних і неуспішних операторів відрізнялись між собою за критерієм випередження та коефіцієнтом балансу РРО. У групі успішних операторів час випереджувальних реакцій був значно більшим, ніж у групі неуспішних операторів. Крім того, за співвідношенням середнього часу запізнілих реакцій і середнього часу випереджувальних реакцій критерій випередження превалював саме у групі успішних операторів (групи достовірно відрізнялись за коефіцієнтом балансу РРО). Успішні оператори відрізнялися від неуспішних за коефіцієнтом балансу РРО: реакції випередження превалювали над реакціями запізнення. У групі неуспішних операторів, на відміну від групі успішних операторів, реакції запізнення превалювали над реакціями випередження.

Таблиця 1. Показники психофізіологічних функцій у операторів теплових електростанцій з різним рівнем ефективності операторської діяльності

Показники	Успішні оператори ( $n = 48$ )	Неуспішні оператори ( $n = 20$ )
	Середнє арифметичне, $M \pm t$	Середнє арифметичне, $M \pm t$
Точність реакції на рухомий об'єкт	0,073 ± 0,002	0,069 ± 0,004
Варіативність РРО	32,66 ± 1,74	30,61 ± 2,39
Критерій запізнення	0,102 ± 0,003	0,102 ± 0,004
Критерій випередження	0,131 ± 0,006*	0,098 ± 0,007*
Варіативність запізнілих реакцій	24,33 ± 1,71	23,28 ± 2,84
Варіативність випереджувальних реакцій	33,43 ± 1,98	25,67 ± 2,99
Коефіцієнт балансу РРО	0,883 ± 0,036*	1,139 ± 0,071*
Коефіцієнт балансу варіативності РРО	0,88 ± 0,10	0,94 ± 0,17
Відсоток помилкових реакцій	24,19 ± 0,75	25,91 ± 1,32
Урівноваженість нервових процесів	2,91 ± 0,38	2,77 ± 0,48
Функціональна рухливість нервових процесів	510,00 ± 12,41	539,44 ± 21,31
Номер сигналу виходу на мінімальну експозицію	78,38 ± 1,57	80,56 ± 2,03
Середній бал	9,31 ± 0,06*	4,23 ± 0,25*

\* –  $p < 0,05$

Згідно з результатами деяких дослідників [4] більшості досліджуваних у РРО властива тенденція до випередження. Той факт, що визначене співвідношення реакцій запізнення і випередження зафіксовано саме в групі успішних операторів, підтверджує наше попереднє припущення про зумовленість превалювання випереджувальних реакцій у операторів-енергетиків професійним стилем діяльності.

Розбіжностей між виділеними групами за вимірюваннями нейродинамічними показниками в даному дослідженні не виявлено.

**Висновки.** Ефективність операторської діяльності в операторів систем стеження пов'язана з точністю реакції на рухомий об'єкт. У групі успішних операторів час випереджувальних реакцій був значно більшим, ніж у групі неуспішних операторів. Успішні оператори відрізнялися від неуспішних за коефіцієнтом балансу РРО: реакції випередження превалювали над реакціями запізнення. У групі неуспішних операторів, на відміну від групі успішних операторів, реакції запізнення превалювали над реакціями випередження.

знялись від неуспішних за балансом РРО: реакції випередження превалювали над реакціями запізнення.

У групі неуспішних операторів реакції запізнення превалювали над реакціями випередження. Ефективність операторської діяльності не пов'язана з такими нейродинамічними якостями людини-оператора, як функціональна рухливість нервових процесів і врівноваженість нервових процесів.

1. Гордо Ю.П. Психофізіологія (прикладні аспекти) : Навч. посіб. – К., 1999.
2. Гордо Ю.П., Чайченко Г.М. Основи психофізіології : Навч. посіб. – Харсон, 2002.
3. Ільїн Е.П. Дифференціальна психофізіо-

логія. – СПб., 2001. 4. Лейтес Н.С. Результаты определения уравненностей основных нервных процессов тремя двигательными методиками // Типологические особенности ВНД человека / Отв. ред. Б.М. Теплов. – М., 1983. – Т. 3. – С. 155–163. 5. Макарчук М.Ю., Федорчук С.В., Тараненко В.І. // Вісн Київ. ун-ту ім. Т. Шевченка. Біологія. – 2005. – Вип. 45. 6. Методичні розробки до спецпрактикуму з фізіології вищої нервової діяльності для студентів біологічного факультету та факультету соціології і психології (спеціальності "Фізіологія людини і тварини" та "Психологія") / Упоряд. Г.М. Чайченко, Л.Г. Томліна. – К., 1994. 7. Федорчук С.В., Тараненко В.І., Гордо Ю.П. // Вісн. Київ ун-ту ім. Т. Шевченка. Біологія. – 2005. – Вип 46. – С. 67–68.

Надійшла до редакції 27.09.05

УДК 577.112.7:616-006.04:616.24

В. Михальченко, асп., А. Бобарикіна, інж. I кат.,  
О. Ковтун, інж. I кат., О. Мінченко, д-р біол. наук

## МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ РЕГУЛЯЦІЇ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ 6-ФОСФОФРУКТО-2-КІНАЗИ/ФРУКТОЗО-2,6-БІСФОСФАТАЗИ ЗА УМОВ ГІПОКСІЇ

**Розглянуто й детально проаналізовано нові дані про молекулярні механізми регуляції експресії ключового ферменту регуляції гліколізу – 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази (ФФКФБ), яка представлена багатьма ізоформами й кодується чотирма різними генами. Розглянуто механізми регуляції експресії основних ізоформ ФФКФБ при гіпоксії та роль HIF у посиленні їхньої експресії.**

**A family of bifunctional 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB) enzymes is responsible for maintaining the cellular levels of fructose-2,6-bisphosphate and controls glycolysis. The existence of multitude isoforms of one bifunctional enzyme PFKFB with different kinetic and regulatory properties plays a key role in the regulation of glycolysis in hypoxia via HIF-dependent mechanism.**

**Вступ.** 6-фосфофрукто-2-кіназа/фруктозо-2,6-бісфосфатаза (ЕС 2.7.1.105/ЕС 3.1.3.46; ФФКФБ) – є одним із ключових ферментів, який контролює гліколіз як у нормальніх умовах, так і при різних патофізіологічних станах, у тому числі при гіпоксії. Вивчення молекулярних механізмів чутливості процесів гліколізу в клітинах до гіпоксії є важливою проблемою біохімії та молекулярної біології, оскільки дозволяє виявити внесок цих ферментів у регуляцію росту злокісних пухлин і виявити потенційні підходи для розробки протипухлинних препаратів. Гіпоксія істотно змінює характер біохімічних процесів в організмі, значно посилює гліколіз, що сприяє забезпеченню клітин організму енергією в умовах зниження рівня кисню. У даній роботі проаналізовано наявні в літературі дані про гени ФФКФБ, механізми регуляції їхньої експресії, механізми індукції гліколізу при гіпоксії та роль ФФКФБ як ключового ферменту регуляції гліколізу в механізмах адаптації клітин до умов гіпоксії.

**Гени ФФКФБ та їхня експресія.** ФФКФБ є групою ізоферментів, синтез яких кодують чотири гени – ФФКФБ-1, 2, 3 та 4 (*Pfkfb* 1–4). Ці гени містяться в різних хромосомах і кодують синтез ізоферментів 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази з різними кінетичними та регуляторними властивостями [16]. Відомо, що ізофермент 1-го типу (ФФКФБ-1) – печінковий і м'язовий, 2-го типу (ФФКФБ-2) – серцевий, 3-го типу (ФФКФБ-3) – виявлений у всіх органах і 4-го типу (ФФКФБ-4) – тестикулярний [16]. Але їхня тканинна локалізація не є абсолютною – у багатьох тканинах і лініях клітин виявлено експресію всіх або декількох ізоферментів ФФКФБ [10–14]. Така множинна експресія ізоферментів свідчить про те, що кожний ізофермент, можливо, відіграє важливу роль за певних фізіологічних чи патофізіологічних умов, роблячи певний внесок у органну специфічність перебігу гліколізу [11–13].

Ген ФФКФБ-1 у геномі людини, миші та щура локалізується в X-хромосомі (Xq27-28 – у людини та Xq22-q31

– у щура) і кодує синтез ізоферменту, який спочатку був виявлений у печінці й тому був названий печінковим. Потім була виявлена експресія мРНК ФФКФБ-1 у скелетних м'язах, серці та в деяких інших органах [11; 16]. Треба відмітити, що найбільш виражена експресія даного гена показана в скелетному м'язі, а в міокарді та печінці рівень експресії мРНК ФФКФБ-1 є меншим [11]. Низький рівень експресії мРНК цього ізоферменту було показано в легенях, нирках та мозку [11]. Установлено, що промоторна ділянка та N-кінцева частина гена ФФКФБ-1 є різною в печінці та скелетних м'язах. Ген ФФКФБ-1 у процесі ембріогенезу перебудовується і утворює ізоформу м'язового типу, який містить 13 екзонів і відрізняється від печінкового типу тільки по першому екзону. Є також дані, що ФФКФБ-1 у сім'янках відрізняється від ізоферменту печінки. Перший екзон ізоформи печінки, на відміну від ізоформи м'язів, містить серин-32, що фосфорилується протеїнкіназою А. У скелетних м'язах ген ФФКФБ-1 кодує ізофермент з укороченою на 20 амінокислотних залишків N-кінцевою ділянкою [16]. Фосфатазна та кіназна активності ізоформи печінки регулюються фосфорилуванням. Фосфорилування N-кінця ізоферменту печінки сАМФ-залежною протеїнкіназою веде до інактивації кінази та активації фруктозо-2,6-бісфосфатази.

Промотор гена 6-фосфофрукто-2-кіназа/фруктозо-2,6-бісфосфатази-1 м'язів містить TATA блок, два сайти зв'язування транскрипційного фактора NF-1 та один сайт HNF-6. У проксимальній частині промотору гена ФФКФБ печінки також знайдено можливі сайти зв'язування транскрипційного фактора NF-1. Виявлено експресію ФФКФБ-1 і в сітківці ока щурів. Аналіз N-кінцевої ділянки мРНК ФФКФБ-1 із сітківки ока щурів показав наявність змін нуклеотидів і замін амінокислот, порівняно з описаною раніше ізоформою ФФКФБ-1 з печінки. У N-кінцевій регуляторній ділянці ФФКФБ-1 сітківки відсутній залишок серин-32, який є сайтом фосфорилю-

вання, що відіграє надзвичайно важливу роль у регуляції 6-фосфофрукто-2-кіназої активності даного біфункціонального ферменту. Детальне вивчення експресії даної ізоформи мРНК ФФКФБ-1 у різних органах у нормі та при патології може мати важливе наукове та практичне значення, оскільки вона являє собою природну домінант/негативну конструкцію ФФКФБ-1.

Ген 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-2 кодує ізофермент, який спочатку було ідентифіковано в серці. Ген ФФКФБ-2 у геномі людини та миші міститься в хромосомі 1 (1q31 – у людини), а в геномі щура – у 13-й (13q24-q25). Послідовність гена ФФКФБ-2 містить 15 екзонів. Ген не має класичного TATA елемента, але містить сайт зв'язування транскрипційного фактора SP-1 на 5'-кінці, який, можливо, стимулює транскрипцію гена у разі відсутності TATA елемента. Було показано, що мРНК ФФКФБ-2 людини має термінуючий TAG кодон на 30 нуклеотидів раніше термінуючого кодону в ізоформі серця бика. Унаслідок цього білок ФФКФБ-2 людини на 10 амінокислотних залишків коротше, ніж гомолог бика. Ініціуючий кодон ATG у мРНК ФФКФБ-2 ідентифікований в екзоні 2.

При вивченні структури гена 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-2 стало відомо, що він містить екзони, що скупчені у 3 групи, які розділяють довші інtronи. Одна група містить екзони 1 і 2, а друга група – екзони 3-7, які кодують послідовність 6-фосфофрукто-2-кінази та N-кінцевої регуляторної ділянки. Третя група має екзони 8-15, які кодують послідовність фруктозо-2,6-бісфосфатази та C-кінцевої регуляторної ділянки. Визначення первинної структури інtronів та 5'- і 3'-кінцевих ділянок ФФКФБ-2 виявило наявність послідовностей, що повторюються в межах гена. У них є короткі елементи розсіяних послідовностей нуклеотидів, що повторюються (SINEs), середньо повторювані (MERs) та прості послідовні повтори (SSRs). 5'-кінець гена ФФКФБ-2 щура кодує 5 варіантів екзону 1, а саме: 1a, 1a', 1b, 1c та 1d, які використовуються для утворення чотирьох різних мРНК [15]. На сьогодні вже відомо, що 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатаза-2 посилено експресується не тільки в серці, але й у мозку та легенях. Низький рівень експресії ФФКФБ-2 виявлено в нирках, печінці, скелетних м'язах і сім'яниках [11].

6-фосфофрукто-2-кіназа/фруктозо-2,6-бісфосфатаза-2 – ключовий фермент регуляції гліколізу в серці. Було показано, що в серці мишей концентрація Ф-2,6-P<sub>2</sub> підвищується при посиленій фізичній роботі та після стимуляції адреналіном або інсуліном. Адреналін, інсулін і фізичне навантаження підвищують рівні фруктозо-2,6-бісфосфату через активацію кіназої активності ФФКФБ-2 [9]. У всіх трьох випадках така активація найбільш вірогідно відбувається внаслідок фосфорилювання специфічною протеїнкіназою трьох консервативних положень у карбоксильному домені – серин-466, треонін-475 та серин-485 [9; 15]. Ці регуляторні положення зберігаються також у ізоформі ФФКФБ-2 людини, тобто регуляція цього ферменту в серці людини та мишей подібна. Відомо, що фосфорилювання серину-466 в ізоферменті серця людини AMP-кіназою приводить до активації кіназої активності [9; 18]. Установлено, що посилення експресії ізоформи 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази, дефіцитної за 6-фосфофрукто-2-кіназою, у серці призводить до гіпертрофії міокарда, порушує функцію міозитів і зменшує чутливість до інсуліну [3].

Ген 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-3 кодує ізофермент, який був ідентифікований у багатьох органах. Ген ФФКФБ-3 у геномі людини міститься в хромосомі 14 (1q21-q24), у геномі миші – у 2-й, а в геномі щура – у 17-й хромосомі [16]. Структуру гена ФФКФБ-3 добре вивчено. Ген охоплює більше 26 т. п. н., які містять як мінімум 16 екзонів. Розмір екзонів від 23 до 208 п. н., причому найбільший за розміром інtron має 10280 п. н. Ізофермент ФФКФБ, що кодується геном ФФКФБ-3, складається з 505 амінокислотних залишків

і має молекулярну масу 58849. ФФКФБ-3 є також гомодимерним білком, що має два окремих каталітичних центри на кожній субодиниці: один для 6-фосфофрукто-2-кінази, а інший для фруктозо-2,6-бісфосфатазої активності. Шляхом альтернативного сплайсингу екзону 15 може утворюватися менша за розміром ізоформа ФФКФБ-3 з Mr 54000 у результаті зміни рамки зчитування і вкорочення С-кінцевої ділянки. Фосфорилювання більшої ізоформи (Mr 58000) протеїнкіназою А і С приводить до активації 6-фосфофрукто-2-кінази без впливу на фруктозо-2,6-бісфосфатазну активність. Менша ізоформа ФФКФБ-2 (54000) не фосфорилюється протеїнкіназами А і С. Фосфорилювання С-кінців ізоферменту деякими протеїнкіназами веде до активації 6-фосфофрукто-2-кінази. Було показано, що більша ізоформа ФФКФБ-3 експресується майже в усіх органах, а менша є індуцибельною ізоформою й індукується зокрема в пухлинах при злоякісному рості. Остання відрізняється від основної ізоформи присутністю багатьох копій послідовності AUUA й містить онкогеноподібний регуляторний елемент.

Показано, що пухлинні клітини конститутивно експресують індуцибельну ізоформу ФФКФБ *in vitro*. Підвищена експресія даної ізоформи ФФКФБ спостерігається в багатьох первинних пухлинах. Припускають, що експресія індуцибельної ізоформи ФФКФБ сприяє посиленій проліферації клітин. Високі рівні експресії даної ізоформи ФФКФБ у злоякісних пухлинах, можливо, є поясненням феномена Варбурга, який спостерігається у трансформованих клітинах, хоча дані останніх років указують на те, що майже всі ізоферменти ФФКФБ роблять свій внесок в ефект Варбурга. Разом з тим, роль різних ізоферментів ФФКФБ в ефекті Варбурга значною мірою залежить від типу клітин, тобто є клітинно-специфічною [12–14]. Було також показано, що в S-фазі клітинного циклу експресія індуцибельної ізоформи ФФКФБ значно підвищується. Відмічено низький рівень експресії даної ізоформи ФФКФБ у нормальніх тканинах людини в порівнянні з більшістю неопластичних клітин. Показано, що пригнічення експресії індуцибельної ізоформи ФФКФБ значно зменшує ріст пухлин у експериментальних тварин.

При дослідженні послідовності 5'-промоторної ділянки гену ФФКФБ-3 установлено наявність великої кількості сайтів для зв'язування різноманітних транскрипційних факторів, які відіграють важливу роль у регуляції експресії гена фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-3. Так, у регуляторній ділянці гена виявлено елемент, подібний до TATA, а також GC-збагачені ділянки і можливі сайти зв'язування для рецептора естрогенів, транскрипційних факторів SP-1 і AP-2. Потенційна послідовність (5'-RCGTG-3'), що зв'язує транскрипційний фактор HIF, знайдена в декількох позиціях 5'-регуляторній ділянці гена ФФКФБ-3 людини, але функціональний залежний від гіпоксії елемент ідентифікований у дистальній ділянці гена [10]. Було встановлено,

що зв'язувальний транскрипційний фактор HIF елемент локалізується 5'-кінцевій ділянці та являє собою єдиний мотив, який відповідає за посилення транскрипції в умовах гіпоксії [5]. ФФКФБ-3 характеризується відсутністю сайта фосфорилювання серину в NH<sub>2</sub>-кінці молекули, що унеможливлює зниження кіназної активності в результаті фосфорилювання і саме тому ФФКФБ-3 має найвище кіназно/фосфатазне співвідношення. ФФКФБ-3 потужно експресується в різних органах організму та в багатьох лініях клітин, у тому числі й трансформованих клітинах [10–13]. Високе кіназно/фосфатазне співвідношення в 6-фосфофрукто-2-кіназі/фруктозо-2,6-бісфосфатазі-3 значною мірою зумовлює високу швидкість гліколізу в пухлинних клітинах. Експресію гена ФФКФБ-3 стимулюють cAMP-залежні протеїнкінази [16].

Крім описаних вище двох ізоформ ФФКФБ-3 (конститутивна та індуцибельна), які відрізняються за 23-ма нуклеотидними залишками у С-термінальному домені гена та за довжиною С-кінця ферменту, виявили ряд інших варіантів ФФКФБ-3, що є результатом альтернативного сплайсингу про-мРНК. Так, Кесслер і Ескріч [7] описали 6 сплайс-ізоформ ФФКФБ-3 у мозку людини. Ванатанбе та співавт. виявили 8 сплайс-варіантів ФФКФБ-3 у серці та мозку мишей. Варіабельна ділянка цих сплайс-ізоформ складається з 7 додаткових екзонів (A-G) і кодує С-кінцеву частину ферменту ФФКФБ-3, що містить сайти фосфорилювання для протеїнкінази A і C. Роль цих ізоформ ФФКФБ-3 у різних тканинах і клітинах ще не відома. У мозку людини виявили 6 сплайс-ізоформ, які були позначені як ізоформи UB12K1-6. Вони відрізняються карбоксильними кінцями. Експресія 6-фосфофрукто-2-кіназі/фруктозо-2,6-бісфосфатазі-3 показана в плаценті, мозку, сім'яниках, печінці, нирках, скелетних м'язах та багатьох лініях ракових клітин [10–16; 18].

Ген 6-фосфофрукто-2-кіназі/фруктозо-2,6-бісфосфатазі-4 кодує ізофермент, який було ідентифіковано спочатку в сім'яниках щурів та людини, і вважалась специфічною для цієї тканини [16]. Ген ФФКФБ-4 в геномі людини міститься в хромосомі 3 (3р22–р21), у геномі миши – у 9-й, а в геномі щура – у 8-й хромосомі (8q32). На сьогодні структура гена ФФКФБ-4 добре вивчена. Дослідження структури гена ФФКФБ-4 людини показало, що ген містить 14 екзонів і 13 інtronів, які охоплюють 45 т. п. н. на третьій хромосомі. При дослідженні 5'-кінцевої ділянки, що має розмір близько 7400 п. н., було ідентифіковано мінімальну промоторну одиницю, яка має декілька GC-збагачених ділянок і ETF-послідовності на ділянці перших 141 нуклеотидів, які визначають базальну експресію та GATA-елемент. Дві послідовності 5'-TTTAAA-3' та 5'-TATAAA-3' подібні до тих, що описані в інших генах, були визначені в позиціях –1257 та –1744. Послідовність, що зв'язує транскрипційний фактор HIF і відповідає за індукцію експресії гена в умовах гіпоксії, знаходиться на відстані 293–300 пар нуклеотидів від GATA сайту, місця ініціації транскрипції даного гена [12]. Відомо, що в клітинах меланоми лінії DB-1 присутні дві мРНК ізоферменту ФФКФБ-4 (ФФКФБ-4 та ФФКФБ-4s), експресія яких стимулюється гіпоксією і які, можливо, відіграють важливу роль в ефекті Варбурга. ФФКФБ-4s є ізоформою, що утворюється в результаті альтернативного сплайсингу. Установлено, що мРНК ФФКФБ-4s містить вставку між першим і другим екзоном, розміром 148 пар нуклеотидів, і, можливо, не виявляє активності 6-фосфофрукто-2-кінази, має високу активність фруктозо-2,6-бісфосфатази [15].

Останніми роками невеликий базальний рівень експресії мРНК ФФКФБ-4 виявлено у великій кількості ракових клітин, а також у нормальній тканині грудної залози людей [12–14]. Так, експресію ФФКФБ-4 установлено в ракових клітинах ліній PC-3, HeLa, гепатом Hep3B і HepG2, карциномах грудної залози ліній MCF7, T47D, SKBR-3, BT549 і MDA-MB-468 та легень ліній A549. Відомо, що експресія ізоферменту 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-4 значно підвищена у злоякісних пухлинах грудної залози та прямої кишки [15]. Разом з тим, треба відмітити, що рівень експресії ФФКФБ-4 в нормальній тканині прямої кишки значно більший порівняно з нормальнюю тканиною грудної залози. Отже, ген ФФКФБ-4 експресується у клітинах різних органів і в різних лініях трансформованих клітин, причому його експресія різко посилюється при злоякісному рості, особливо в злоякісних пухлинах легень і грудної залози [13]. Експресія ФФКФБ-4 у ракових клітинах і посиленна експресія в злоякісних пухлинах свідчить про важливу роль 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-4 в ефекті Варбурга.

Таким чином, ген ФФКФБ-4 експресується не лише в сім'яниках, а й у клітинах інших органів та в різних лініях ракових клітин. Експресія гена ФФКФБ-4 залежить від гіпоксії і дія гіпоксії на транскрипцію даного гена ФФКФБ-4 відбувається через залежний від гіпоксії елемент у промоторній зоні гена, який контролюється транскрипційним комплексом HIF.

Отже, існують різні тканиноспецифічні ізоферменти ФФКФБ, які, незважаючи на велику структурну подібність, мають суттєві відмінності в молекулярній масі, кінетичних і регуляторних параметрах. Усі ізоферменти є гомодимерами, що містять субодиниці молекулярною масою порядку 54000–60000. При порівнянні амінокислотної послідовності різних ізоферментів, виявилось, що більша частина послідовності кіназних і фосфатазних доменів дуже консервативна, а послідовність кінців NH<sub>2</sub> і COOH варіює. Наприклад, ізоферменти печінки та м'язів: в ізоферменті м'язів відсутні 23 амінокислоти на NH<sub>2</sub> кінці, причому наступні 9 амінокислот відрізняються від таких в ізоферменті печінки. У результаті ізофермент м'язів має підвищену фосфатазну активність. Треба відмітити, що NH<sub>2</sub> та COOH кінці ізоферментів містять сайти фосфорилювання для регуляції кіназної та фосфатазної активностей. Наприклад, фосфорилювання NH<sub>2</sub> кінця ізоферменту печінки протеїнкіназою А інгібує кіназну активність та активує фосфатазну активність [16]. Ці спостереження вказують на важливу роль кінцевих пептидів у регуляції каталітичних активностей ізоферментів ФФКФБ.

Молекулярні механізми регуляції гліколізу 6-фосфофрукто-2-кіназою/фруктозо-2,6-бісфосфатазою. Механізми регуляції гліколізу є досить складними та багатогранними, але ключову роль у регуляції гліколізу відіграє фруктозо-2,6-бісфосфат, відкритий 25 років тому Герцом і Ван Шафтінгом. Концентрація цієї регуляторної сполуки в клітинах контролюється біфункціональним ферментом кіназою/фруктозо-2,6-бісфосфатазою [16, 20]. Установлено, що фруктозо-2,6-бісфосфат є найпотужнішим з відомих нині активаторів фосфофруктокінази-1 – ключового ферменту гліколізу. Біосинтез фруктозо-2,6-фосфату з фруктозо-6-фосфату та АТФ і його розпад до фруктозо-6-фосфату здійснюється ФФКФБ і регулюється концентрацією фруктозо-6-фосфату та гормонами [16]. ФФКФБ перебуває під алергічним контролем фруктозо-6-фосфату – при під-

вищенні концентрації фруктозо-6-фосфату, яка спостерігається у випадку надлишку глюкози, відбувається стимуляція 6-фосфофрукто-2-кіназної та інгібування фруктозо-6-фосфатазної активності. З іншого боку, при зниженні концентрації глюкози глюкагон стимулює утворення цАМР; останній активує цАМР-залежну протеїнкіназу, яка у свою чергу інгібує фосфофрукто-кіназну активність та індукує фруктозо-2,6-бісфосфатазну активність ФФКФБ шляхом фосфорилювання. Таким чином, у разі надлишку глюкози збільшується концентрація фруктозо-2,6-бісфосфата, який активує фосфофруктокіназу-1 та інгібує фруктозо-1,6-бісфосфатазу. У результаті спостерігається стимуляція гліколізу [16]. Отже, ФФКФБ є біфункціональним ферментом, фосфорилювання якого цАМР-залежною протеїнкіназою знижує кіназну та збільшує фосфатазну активності, що призводить до зменшення фруктозо-2,6-бісфосфата [16].

Мономер біфункціонального ферменту містить 2 ділянки з коровими 6-фосфофрукто-2-кіназним і фруктозо-2,6-бісфосфатазним доменами в центральній частині та дві регуляторні ділянки, що розташовані на кінцях. Кінцеві ділянки ФФКФБ можуть проявляти регуляторні функції ферменту при зміні (конформації) третинної структури у відповідь на численні впливи. 6-фосфофрукто-2-кіназна та фруктозо-2,6-бісфосфатазна активності ФФКФБ розташовані в різних активних центрах молекули ферменту, що обумовлено існуванням двох різних доменів. С-кінцева ділянка бере участь у підтриманні фруктозо-2,6-бісфосфатазної активності, N-кінцева ділянка відіграє основну роль в регуляції 6-фосфофрукто-2-кіназної активності, а також при взаємодії субодиниць ферменту і створення гомодимеру, а це є необхідною умовою для прояву кіназної активності. Рівень фруктозо-2,6-бісфосфата регулюється співвідношенням 6-фосфофрукто-2-кіназної та фруктозо-2,6-бісфосфатазної активності, які залежать від фізіологічних або патологічних станів клітини. Співвідношення 6-фосфофрукто-2-кіназної до фруктозо-2,6-бісфосфатазної активності у клітині визначаються типами присутніх ізоформ ферменту, концентраціями деяких метаболітів і пост-трансляційними модифікаціями ферментів, в основному їхнім фосфорилюванням [19].

Отже, 6-фосфофрукто-2-кіназа/фруктозо-2,6-бісфосфатаза головний регуляторний фермент гліколізу, що характеризується наявністю як 6-фосфофрукто-2-кіназної, так і фруктозо-2,6-бісфосфатазної активностей. Завдяки наявності двох незалежних каталітических доменів ФФКФБ каталізує синтез і розщеплення фруктозо-2,6-бісфосфата, активатора ключового ферменту гліколізу – фосфофруктокінази-1.

Значною мірою гліколіз посилюється в умовах гіпоксії, а також в різноманітних клітинах при їхньому злойкісному переродженні. Детальне вивчення механізмів регуляції експресії різних генів ФФКФБ у різних типах клітин, і зокрема в ракових, є надзвичайно актуальною проблемою, оскільки дозволяє виявити внесок цих ферментів у регуляцію гліколізу в нормі та за різних патологічних станів, в тому числі й при рості злойкісних пухлин.

**Молекулярні механізми активації гліколізу та ФФКФБ при гіпоксії.** Гліколіз є одним з основних метаболіческих процесів, що активується при гіпоксії. Остання спостерігається як на високогірї, тобто при зниженному парціальному тиску кисню в повітрі, так і у звичайних умовах, при нормальному парціальному тиску кисню в атмосфері. На високогірї весь організм, усі його клітини пере-

бувають в умовах гіпоксії й адаптація до такої відбувається на рівні всього організму. На перших етапах гіпоксії, у зв'язку зі зниженням забезпеченням організму киснем, посилюється дихання, змінюється тиск крові, індукується еритропоез, а також і різноманітні біохімічні процеси, які є важливими для адаптації організму до умов гіпоксії. Відомо, що в зазначених умовах значно знижується утворення енергії за рахунок окислювального фосфорилювання внаслідок нестачі кисню, що компенсується посиленням процесів транспорту глюкози та її метаболізму гліколітичним шляхом.

При нормальному парціальному тиску кисню в повітрі локальна гіпоксія спостерігається як за фізіологічних процесів, так і при патофізіологічних станах організму. Так, за фізіологічних умов локальна гіпоксія спостерігається в скелетних м'язах у разі фізичних навантажень. При виражених і тривалих фізичних навантаженнях відбувається збільшення об'єму м'язової тканини, що приводить до розвитку гіпоксичного стану в ній. При цьому ініціюються процеси утворення нової сітки капілярів, спостерігається активація процесів метаболізму, зокрема гліколізу, направлених на адаптацію клітин до умов гіпоксії та виходу з цього стану. Але здебільшого локальна гіпоксія спостерігається при різноманітних патологіях – у злойкісних пухлинах, при травмах, інфаркті міокарду, інсультах, при хронічних запаленнях, у склеротичних бляшках кровоносних судин, у ретині при ускладненнях цукрового діабету, у суглобах при ревматоїдному артриті та деяких інших патологіях.

Гіпоксія є своєрідним ключем до розшифровки ряду тонких молекулярних механізмів регуляції процесів обміну речовин і дає можливість глибше зрозуміти молекулярні механізми перебігу ряду фізіологічних і патологічних процесів в організмі (хронічних запалень, злойкісного росту, при інфаркті міокарду та ряді інших захворювань). Адаптація організму до гіпоксії досить складна і багатогранна. Значною мірою вона ініціюється унікальним сенсорним механізмом контролю рівня кисню, що знаходиться в кожній клітині тіла. Гіпоксія є важливим компонентом формування та росту більшості злойкісних пухлин [8]. Ключовим фактором регуляції транскрипції, що опосередковує адаптацію клітин до гіпоксії, як також і перебіг деяких патологічних процесів, є HIF (транскрипційний фактор, що індукується при гіпоксії), який виражено активується в умовах гіпоксії та індукує процеси транскрипції, зв'язуючись із специфічними послідовностями регуляторних ділянок певних генів [2]. Механізми активації транскрипційного фактора HIF досить складні не лише при гіпоксії, а й при різноманітних патологічних процесах, що супроводжуються локальною гіпоксією. Клітини злойкісних пухлин мають високу гліколітичну активність при нормальному рівні кисню. Цей феномен був описаний Варбургом багато років тому. У ряді злойкісних пухлин і деяких лініях трансформованих клітин виявлено посилену експресію генів ФФКФБ-2, ФФКФБ-3 та ФФКФБ-4 і показано їхню участь в ефекті Варбурга [10–12; 14].

Для адаптації до гіпоксії необхідна активація генів, які змінюють обмін речовин таким чином, щоб компенсувати дефіцит кисню. На системному рівні підвищення еритропоетину сприяє утворенню гемоглобіну та підвищує ємність перенесення кисню в циркулюючій крові. На клінічному рівні гіпоксія активує гени деяких факторів антігенезу, що сприяє локальній циркуляції крові. На клінічному рівні відсутність кисню стимулює експресію переносників глюкози та гліколітичних ферментів.

Здатність перелаштовуватись від аеробного дихання до гліколізу необхідна для виживання клітин в умовах гіпоксії. Треба зазначити, що різні органи і тканини організму мають різну чутливість до гіпоксії, як також і свої особливості механізмів адаптації до гіпоксії.

Реакція клітини на недостатню кількість кисню має особливе значення для розуміння патологічних процесів, що відбуваються в організмі. Тонкий баланс між потребою в кисні та його доставкою порушується при різних захворюваннях. Найважливішу роль у цих процесах відіграє чутливий до кисню транскрипційний комплекс HIF, який контролює транскрипцію великої групи генів. HIF вважається основним транскрипційним фактором регуляції експресії генів, які відповідають за реакцію організму чи клітин людини та тварин на недостачу кисню. Активація HIF забезпечує швидкі й адекватні відповіді на гіпоксичний стрес, посилює експресію генів, що регулюють процес адаптації до умов гіпоксії, шляхом взаємодії транскрипційного комплексу HIF зі специфічними нуклеотидними послідовностями, HIF-залежними регуляторними елементами, у регуляторних ділянках генів [1; 2; 4; 6; 17].

Комплекс HIF є гетеродимером, що складається з однієї а-субодиниці (HIF-1 $\alpha$ ) та однієї  $\beta$ -субодиниці (HIF-1 $\beta$ ). HIF-1 $\alpha$  існує у вигляді декількох ізоформ (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$ ) з різними біологічними властивостями, які кодуються трьома генами. HIF- $\alpha$  субодиниці мають структурно подібні ДНК-зв'язувальні сайти, але відрізняються по трансактиваційним доменам, а це означає, що вони можуть мати унікальні гени-мішенні. HIF-1 $\beta$  була названа *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT/HIF-1 $\beta$ )* [2]. Як а-, так і  $\beta$ -субодиниці належать до базисної родини транскрипційних факторів, що мають у своєму складі мотив типу "спіраль – петля – спіраль" (*helix-loop-helix; HLH*) і зони гомології  $\beta$ HHL\Per-ARNT-Sim (Pas домен). Наявність домену  $\beta$ HHL визначає належність до великої родини димерних еукаріотичних факторів транскрипції, в яких домен HLH відповідає за димеризацію, зв'язування з ДНК і взаємодію з РНК-полімеразою [2].

Субодиниця HIF-1 $\alpha$  є чутливою до кисню. Вона – мішень для чутливих до кисню сигнальних шляхів. Якщо рівень кисню в клітинах організму нормальній, то активність транскрипційного комплексу HIF надзвичайно низька через низький рівень білка HIF-1. Причиною цього є те, що в присутності кисню HIF-1 $\alpha$  постійно розщеплюється. В умовах гіпоксії кількість HIF-1 $\alpha$  різко зростає переважно за рахунок стабілізації цього білка [1; 6].

Субодиниця HIF-1 $\beta$  є нечутливим до кисню ядерним білком, який може утворювати комплекси з різними а-субодиницями HIF у різних системах генної регуляції. Рівень як HIF-1 $\alpha$ , так і HIF-2 $\alpha$  субодиниць при гіпоксії значно збільшується за рахунок пригнічення їхнього розщеплення. HIF- $\alpha$  субодиниці переносяться в ядро, з'єднуються із субодиницею HIF-1 $\beta$ , і транскрипційний комплекс HIF, що утворюється, зв'язується зі специфічною мішенню в регуляторній зоні залежних від гіпоксії генів.

Тепер уже відомо, що різні форми а-субодиниць можуть мати різні функції. Так, відмічено, що один із HIF-комплексів, до складу якого входить HIF-3 $\alpha$  та HIF-1 $\beta$ , може виступати як інгібітор HIF-залежної транскрипції. Біохімічне порівняння HIF-1 $\alpha$  та HIF-2 $\alpha$  показало, що ці білки мають дуже близькі біохімічні властивості, але кожна субодиниця контролює також і певні біологічні функції. Наприклад, у процесі ембріогенезу HIF-1 $\alpha$  має відношен-

ня до контролю васкуляризації, а HIF-2 $\alpha$  – до продукції катехоламінів. Існують дані про те, що в культурі ендотеліальних клітин легень людини білки HIF-1 $\alpha$  і HIF-2 $\alpha$  однаково активувались гіпоксією (експозиція протягом 4 год у газовому середовищі з 0,5 % O<sub>2</sub>) на посттрансляційному рівні. Разом з тим, вони по-різному реагували на тривалу гіпоксію: стимуляція білка HIF-1 $\alpha$  зникала через зменшення стабільності її мРНК, тоді як стимуляція HIF-2 $\alpha$  залишалась високою та стабільною. Відомо, що HIF-2 $\alpha$  існує тільки у вищих хребетних і експресується у трансформованих клітинах кровоносних судин, паренхімних клітинах та інфільтраційних макрофагах. Це є підтвердженням специфічності роботи генів-мішень.

Останнім часом виявлено залежність експресії всіх ізоферментів 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-біфосфатази від гіпоксії як в окремих органах (*in vivo*, 7 % кисню протягом 6 год), так і в різних лініях клітин (*in vitro*, 1 % кисню упродовж 6 год). Проте ця залежність має чітко виражений тканино-чи клітинно-специфічний характер [10–14]. Відомо, що більшість ефектів гіпоксії можливо спостерігати і при нормальному рівні кисню, інкубуючи клітини з речовинами, які конкурують з іонами заліза (хелатори іонів заліза або сполуки, що конкурують з іонами заліза), або з інгібіторами пролілгідроксилаз HIF (аналоги оксоглютарату).

Було показано, що експресія генів ФФКФБ-3 та ФФКФБ-4 значно посилюється у відповідь на речовини, що моделюють гіпоксію при нормальному рівні кисню, зокрема на діметилоксалілгліцин, дезфериоксамін і хлорид кобальту [10–13]. Це є підтвердженням того, що відповідь на гіпоксію у цих генів залежить від активності комплексу HIF, оскільки всі ці речовини зменшують активність пролілгідроксилаз HIF. При гіпоксії посилюється експресія в усіх основних органах, крім скелетних м'язів, у мишей в умовах *in vivo*. Виражену індукцію експресії гена ФФКФБ-3 було виявлено в головному мозку, легенях, сім'янниках, нирках, печінці й міокарді [11]. У скелетних м'язах експресія гена ФФКФБ-3 при гіпоксії знижувалась, що може пояснюватися особливостями регуляції експресії генів ФФКФБ чи структурою регуляторної промоторної ділянки цих генів [11; 16].

Активація гена ФФКФБ-3 під впливом гіпоксії є абсолютно залежною від активності транскрипційного комплексу HIF-1, оскільки в дефіцитних щодо HIF-1 $\alpha$  клітинах (ембріональні фібробласти мишей) не спостерігається змін в експресії ФФКФБ-3, як і деяких відомих HIF-залежних генів (переносника глюкози Glut1 та ендотеліального фактора росту судин VEGF), тоді як у нормальних фібробlastах спостерігалась виражена індукція всіх цих генів за умов гіпоксії [10].

Недавно було показано, що при гіпоксії спостерігається також значне посилення експресії мРНК 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-біфосфатази-4 як у клітинах аденокарциноми передміхурової залози лінії PC-3 та грудної залози ліній MCF7, T47D, SKBR-3, BT549 та MDA-MB-468, так і в клітинах ліній HeLa, Hep3B, HepG2 і клітинах карциноми легень лінії A549. Крім того, показано, що дезфериоксамін і хлорид кобальту, які здатні модулювати ефекти гіпоксії, також посилюють експресію мРНК ФФКФБ-4 в деяких різних за походженням лініях трансформованих клітин. При дослідженнях механізмів регуляції експресії гена ФФКФБ-4 з використанням діметилоксалілгліцину, який модулює гіпоксію, пригнічує активність пролілгідроксилаз HIF, було показано, що гіпоксія індукує експресію гена ФФКФБ-4 через HIF-залежний механізм [12; 13].

Більше того, було встановлено, що експресія гена ФФКФБ-4 значно посилюється в злойкісних пухлинах грудної залози, легень і прямої кишки, а також у лініях ракових клітин з різних органів. Вона є залежною від гіпоксії й механізм індукції експресії гена ФФКФБ-4 є HIF-1-залежним і реалізується через специфічну послідовність нуклеотидів (CGCGTGCC) у 5'-регуляторній зоні гена ФФКФБ-4, яка була ідентифікована в гені ФФКФБ-3 людини з допомогою репортерних систем і сайт-специфічного мутагенезу [12]. Таким чином, ген ФФКФБ-4 посилено експресується в різних злойкісних пухлинах і в клітинах різних клітинних ліній. Його експресія значно індукується при гіпоксії. Також було показано, що хелатор заліза дезферооксамін і хлорид кобальту мають подібний ефект на експресію мРНК ФФКФБ-4 у пухлинних клітинних лініях [12].

Вивчення експресії генів ФФКФБ-1 та ФФКФБ-2 в різних органах мишів при гіпоксії показало, що індукція експресії цих генів спостерігається лише в деяких органах [11]. Виражена індукція експресії генів ФФКФБ-1 і ФФКФБ-2 була відмічена лише в сім'яниках, тоді як в інших органах або не змінювалась, або дещо посилювалась. Так, експресія гена ФФКФБ-1 посилювалась у печінці та скелетних м'язах, а в нирках, серці й головному мозку – істотно не змінювалась [11]. Експресія гена ФФКФБ-2 посилювалась у легенях, а також у печінці, а у скелетних м'язах – навпаки, знижувалась подібно до генів ФФКФБ-3 та ФФКФБ-4 [11]. Ці дані свідчать про те, що експресія генів ФФКФБ-1 і ФФКФБ-2 є залежною від гіпоксії в умовах *in vivo* лише в деяких органах, тобто має виражену органоспецифічність.

Подібні результати були отримані також в експериментах *in vitro* на різних лініях трансформованих клітин. Результати проведених досліджень показали, що гіпоксія посилює експресію гена ФФКФБ-1 у культурі клітин аденокарциноми легень лінії A<sub>549</sub> та HeLa, тоді як експресія гена ФФКФБ-2 збільшується значно меншою мірою і виявлена лише в культурі клітин аденокарциноми грудної залози лінії MCF-7 та HeLa. Отже, експресія гена ФФКФБ-2, як і гена ФФКФБ-1, в умовах гіпоксії *in vivo* теж є тканиноспецифічною [11].

В експериментах *in vitro* з речовинами, що моделюють ефекти гіпоксії (кобальт, дезферооксамін і диметилоксалілгліцин), було встановлено, що ці речовини мають подібний до гіпоксії вплив на експресію генів ФФКФБ-1 та ФФКФБ-2 в клітинах ліній HeLa, MCF7 та A<sub>549</sub> [11].

Отже, усі чотири гени ФФКФБ є залежними від гіпоксії як в умовах *in vivo*, так і в окремих лініях клітин. Вплив гіпоксії на їхню експресію різний і проявляється тканиноспецифічно. Установлено також, що регуляція експресії ізоферментів ФФКФБ залежить від транскрипційного фактора HIF, ключового фактора регуляції транскрипції залежних від гіпоксії генів, що опосередковує молекулярні механізми адаптації клітин до гіпоксії. Його рівень у клітинах постійно контролюється специфічними пролігідроксилазами, що є сенсорами кисню. Вони контролюють розщеплення а-субодиниці транскрипційного комплексу HIF, але при гіпоксії їхня активність знижується і саме тому кількість pHIF-1α збільшується. HIF також активується факторами росту та онко-

генами, які стимулюють проліферацію клітин, тим самим посилюючи їхнє забезпечення киснем. Каскади фосфорилювання, такі як метаболічні шляхи мітогенактивованої протеїнкінази МАРК і фосфоінозитид-3-кінази PI3K, активуються факторами росту і посилюють трансляцію HIF-1α мРНК. Підвищена експресія HIF-1α зареєстрована при всіх онкологічних захворюваннях людини. Це підтверджується вивченням експресії HIF-1α в біопсіях пухлинних тканин, а також у видалених із організмів пацієнтів пухлинах і оточуючих нормальними тканинах. Збільшення рівня HIF-1α та активності транскрипційного комплексу HIF посилює експресію генів ФФКФБ та інтенсивність гліколізу.

Таким чином, HIF-1 опосередковує ключові фізіологічні відповіді на гіпоксію, у тому числі й індукцію генів ФФКФБ і гліколізу. Подальше вивчення ролі HIF-1 та ізоферментів ФФКФБ у регуляції різноманітних процесів у нормі та за патології може привести до розробки нових стратегій і методів лікування найбільш розповсюджених хвороб.

**Висновки.** 6-фосфофрукто-2-кіназа/фруктозо-2,6-бісфосфатаза є одним із ключових ферментів, який контролює гліколіз як у нормальніх умовах, так і при різних патофізіологічних станах, у тому числі при гіпоксії та злойкісному рості. ФФКФБ представлена багатьма ізомірами, синтез яких кодується чотирма генами, експресія яких посилюється при гіпоксії та злойкісному рості і має органо- та клітинно-специфічний характер регуляції. Індукція експресії генів ФФКФБ значно посилює гліколіз, що сприяє забезпеченням клітин організму енергією в умовах зниження рівня кисню та адаптації клітин до умов гіпоксії.

- Appelhoff R. J., Tian Y.-M., Raval R.R. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279, № 37. – P. 38458–38465.
- Bilton R., Booker G.W. // *Eur. J. Biochem.* – 2003. – Vol. 270. – P. 791–798.
- Donti R., Ye G., Wu C., Lange A.J. // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279, № 46. – P. 48085–48090.
- Elvidge G.P., Glenny L., Appelhoff R.J. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol. 281, № 222. – P. 15215–15226.
- Fukasawa M., Takayama E., Shinohara N., Okumura A. // *J. Biochem.* – 2004. – Vol. 138, № 3. – P. 273–277.
- Ivan M., Kondo Z.K., Yang H. et al. // *Science*. – 2001. – Vol. 292. – P. 464–468.
- Kessler R., Eschrich K. // *Mol. Brain Res.* – 2001. – Vol. 87. – P. 190–195.
- Lu H., Forbes R. A., Verna A. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – № 26. – P. 23111–23115.
- Marsin A., Bertrand L., Rider M. H., Deprez I. // *Curr. Biol.* – 2000. – Vol. 10. – P. 1247–1255.
- Minchenko A.G., Leshchinsky I., Openanova I. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277, № 6. – P. 6183–6187.
- Minchenko O., Openanova I., Caro J. // *FEBS Lett.* – 2003. – Vol. 554. – P. 264–270.
- Minchenko O., Openanova I., Minchenko D. et al. // *FEBS Lett.* – 2004. – Vol. 576, № 1. – P. 14–20.
- Minchenko O.H., Openanova I.L., Ogura T. et al. // *Acta Biochim. Pol.* – 2005. – Vol. 52. – P. 881–888.
- Minchenko O., Ochiai A., Openanova I. et al. // *Biochimie*. – 2005. – Vol. 87. – P. 1005–1010.
- Minchenko O.H., Ogura T., Openanova I.L. et al. // *Mol. Cell. Biochem.* – 2005. – Vol. 280, № 1–2. – P. 227–234.
- Okar D., Manzano A., Navarro-Sabaté A. et al. // *Trends Biochem. Sci.* – 2001. – Vol. 26, № 1. – P. 30–35.
- Pugh C.W., Ratcliffe P.J. // *Nat. Med.* – 2003. – Vol. 9. – P. 677–684.
- Rider M.H., Bertrand L., Vertommen D. et al. // *Biochem J.* – 2004. – 381. – P. 561–578.
- Watanabe F., Furuya E. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2001. – Vol. 282. – P. 803–810.
- Wu C., Okar D., Stoekman A.K. et al. // *Endocrinology*. – 2004. – Vol. 145, № 2. – P. 650–658.

Надійшла до редакції 23.10.05

УДК 57.08

Ю. Горго, д-р біол. наук, Т. Палатний, асп.

## ДОСЛІДЖЕННЯ СПОТВОРЕНЬ ПОЛІВ УЛЬТРАЗВУКОВИХ ВИПРОМІНЮВАЧІВ У МОДЕЛЯХ БІОЛОГІЧНИХ ТКАНИН

Розроблено методику моделювання та оцінки змін значень акустичної інтенсивності полів ультразвукових випромінювачів за дії на об'єкти малого розміру. Виявлено, що в разі впливу на об'єкти розміром порядку 1 мм–1 см (мозок, печінка, м'язи, шкіра щура) істотно послаблюється середнє значення акустичної інтенсивності внаслідок спотворення та інтерференції ультразвукового поля. На частоті 0,9–1,1 МГц послаблення становить 20 %, на частоті 2,4 МГц – 50 % як для плоских випромінювачів з концентруючою насадкою, так і для сферичних фокусуючих випромінювачів.

*The method of modelling and assessing the changes of acoustic intensity distribution of ultrasound transducers during the influence on biological objects with relatively small size was developed. We revealed the significant attenuation of spatial average acoustic intensity during the influence on objects having size in the range of 1mm-1cm (rat brain, liver, muscles, skin) due to distortion and interference of ultrasound field. Attenuation scores 20 % when ultrasound frequency is in the range 0,9-1,1MHz and up to 50 % at 2,4 MHz. These results are the same for thin-plate ultrasound transducers as well as for spherical focusing ones.*

**Вступ.** Ультразвук застосовують у біології та медицині на протязі багатьох років. В останні десятиріччя досліджується обворотна та необоротна дія ультразвуку, який здатен локально змінювати функціональний стан або здійснювати температурну деструкцію вибраних ділянок тканин різних органів. Вплив ультразвуку на біологічні тканини залежить від потужності, частоти, тривалості й режиму дії: неперервний, імпульсний, модульований, а також температури та рівня перфузії самої тканини [7–9]. Вплив на тканини може здійснюватись у широкому діапазоні частот. Нижня гранична частота близько 500 кГц визначається технічними можливостями: при менших частотах неможливо отримати чітко локалізоване ультразвукове. Верхня межа частотного діапазону – близько 3 МГц визначається значним поглинанням високочастотного ультразвукового сигналу при проходженні крізь проміжні шари: матеріали насадки випромінювача, контактне мастило, біологічні тканини. Відповідно, діапазон використаних нами частот становив 1–2,5 МГц [6].

Адекватний ультразвуковий вплив на біологічні тканини можна вважати перспективним підходом як у експериментальних біологічних дослідженнях, так і в розробці методик лікування низки патологічних процесів. Але при цьому виникають певні ускладнення контролюваного впливу на внутрішні органи, які можуть значно поглинати та спотворювати ультразвукове поле. Зокрема, при дослідженні дії ультразвуку на мозок, м'язи, шкіру та внутрішні органи щурів, унаслідок малого розміру об'єктів та їхньої акустичної неоднорідності, виникають значні спотворення ультразвукового поля й відхилення реальних значень акустичної інтенсивності від обчислених [6]. Метою даної роботи є оцінка акустичної інтенсивності ультразвукового поля, що створюється плоскими та фокусуючими випромінювачами в біологічних тканинах з урахуванням можливих спотворень унаслідок відбиття, заломлення та інтерференції. Для цього оцінювали значення акустичної інтенсивності ультразвукового поля різних випромінювачів у ванні з дегазованою водою та в акустичній моделі біологічної тканини.

**Об'єкт і методи досліджень.** Досліджувались зміни усередненої по площі акустичної інтенсивності плоских і фокусуючих ультразвукових випромінювачів у акустичній моделі біологічних об'єктів відносно малого розміру від 1 мм до 1 см. Для отримання ультразвуку в діапазоні частот 0,5–2,5 МГц і потужністю до 20 Вт/см<sup>2</sup> нами розроблено й виготовлено генератор і випромінювачі з різними резонансними частотами в межах досліжуваного діапазону. Для точних вимірювань розподілу акустичного тиску ультразвукового поля випромінювачів вико-

ристовувався виготовлений нами пристрій, детально описаний у роботі [6]. Вимірювання сумарної акустичної потужності випромінювачів проводилось за допомогою вимірювача акустичної потужності ИМУ-3. За допомогою описаної методики у ванні з дегазованою водою отримано записи просторового розподілу амплітуди акустичного тиску плоских і фокусуючих ультразвукових випромінювачів у діапазоні частот від 0,5 до 2,5 МГц.

У біологічних об'єктах відбувається зміна акустичної інтенсивності внаслідок відбиття та інтерференції в біооб'єктах малого розміру. Реальний розподіл акустичної інтенсивності в біологічних тканинах може відрізнятись від ідеального в результаті інтерференції, що виникає при відбитті ультразвуку від поверхонь досліджуваного об'єкта невеликого розміру (мозок, печінка, стегно, стінка шлунка, шкіра щура), а також від кісток, хрящів і сухожиль. Також спотворення виникає внаслідок акустичного поглинання та розсіювання ультразвуку в м'яких біологічних тканинах [1–3; 5].

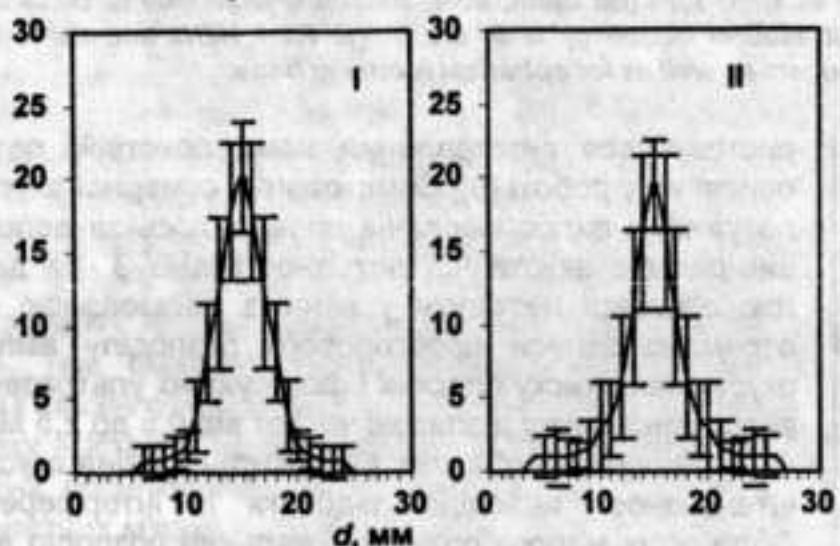
Для дослідження відхилення значень акустичної інтенсивності у зразках біологічних тканин малого розміру (1 мм–1 см) унаслідок багаторазового відбиття ультразвуку від поверхонь та інтерференції, від значень, обчислені у дегазованій воді, використовувався пристрій [4], який складався з ультразвукового датчика, закріпленого на рейках. Датчик переміщувався у пластиковій ванні у двох взаємно перпендикулярних напрямках. У бічній стінці ванни розташоване заукопроникне вікно, затягнуте лавсановою плівкою. Ззовні до вікна притискається ультразвуковий випромінювач, установлений горизонтально. Із внутрішньої сторони до мембрани притискалась акустична модель тканини. Акустична модель біологічної тканини являла собою поліетиленовий пакетик 4 × 4 см, заповнений дегазованою водою. Товщина пакетика з водою в місці контакту з випромінювачем і ультразвуковим датчиком змінювалась від 0 см до 1,2 см. Поверхня акустичної моделі біологічної тканини є різницею фаз води – повітря і повністю відбиває ультразвук. Таким чином створюються умови, за яких ультразвукові коливання, виходячи з насадки випромінювача, багаторазово відбиваються від стінок пакета під різними кутами і створюють інтерференційну картину. У результаті цього явища реальне значення акустичної інтенсивності всередині пакета може відрізнятись від розрахованого у ванні, заповненої дегазованою водою. Ультразвуковий датчик розташовувався напроти випромінювача вздовж його осі з іншого боку акустичної моделі й переміщувався за діаметральним вектором (*d*) – поперек осі розповсюдження ультразвуку. Ультразвукове поле плоских випромінювачів з концентруючими насадками записувалось на відстані 0, 3, 6 і 9 мм

від поверхні насадки. Ультразвукове поле фокусуючих випромінювачів записувалось у площині фокусної плями на відстані 12 мм від робочої поверхні насадки. Місце контакту п'єзокерамічного елемента й поверхні пакета змочувалось краплею води, яка переміщувалась разом з датчиком.

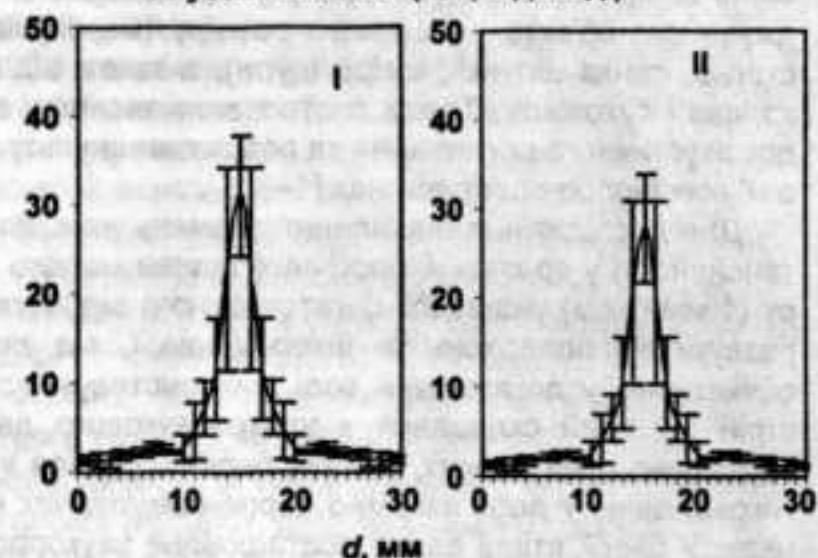
**Результати та їх обговорення.** За допомогою описаної методики в акустичній моделі біологічної тканини отримано записи просторового розподілу амплітуди акустичного тиску плоских ультразвукових випромінювачів з концентруючими насадками на частотах 1,1 МГц

і 2,4 МГц на відстанях 0, 3, 6 і 9 мм від поверхні насадки й фокусуючих випромінювачів ЦТС-13 (2,4 МГц) і № 2 (0,9 МГц) на відстані 12 мм від робочої поверхні насадки в площині фокусної плями. Для плоских випромінювачів з резонансними частотами 1,1 МГц та 2,4 МГц з концентруючими насадками для обчислень використовуються криві розподілу акустичного тиску, усереднені для відстані 0–9 мм від поверхні насадки. Для фокусуючих випромінювачів використовуються усереднені криві розподілу акустичного тиску в центрі фокальної плями на відстані 12 мм від поверхні насадки (рис. 1).

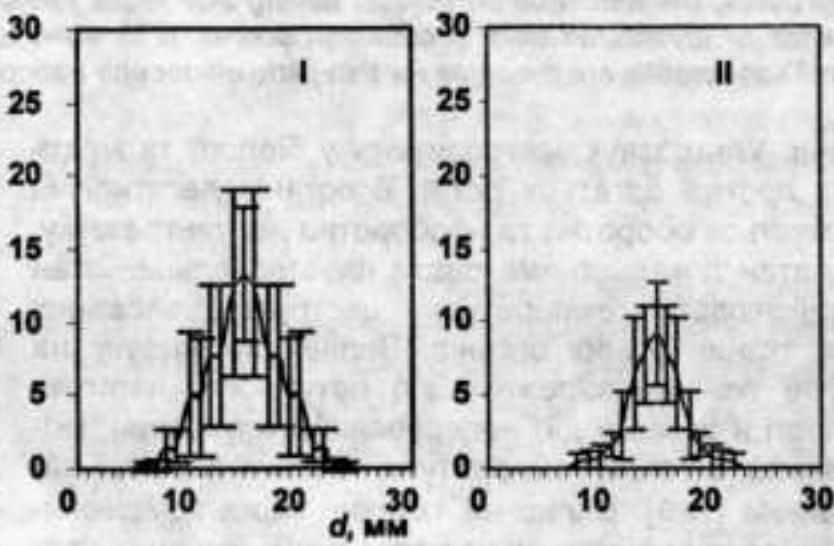
Плоский випромінювач 1,1 МГц  
Акустичний тиск ( $\bar{P}$ , відн. од.)



Фокусуючий випромінювач №2, 0,9 МГц  
Акустичний тиск ( $\bar{P}$ , відн. од.)



Плоский випромінювач 2,4 МГц  
Акустичний тиск ( $\bar{P}$ , відн. од.)



Фокусуючий випромінювач ЦТС-13, 2,4 МГц  
Акустичний тиск ( $\bar{P}$ , відн. од.)

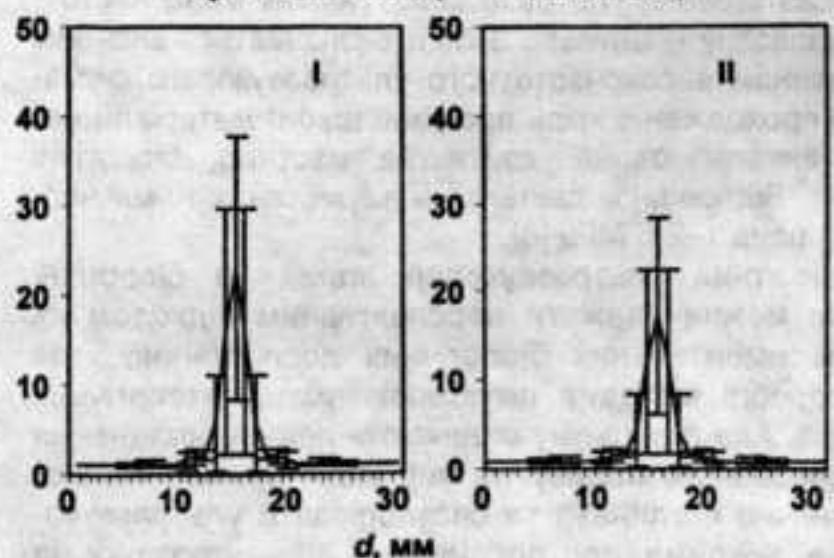


Рис. 1. Криві розподілу акустичного тиску плоских випромінювачів з концентруючими насадками, усереднені для відстаней 0, 3, 6 і 9 мм від поверхні насадки та фокусуючих випромінювачів, усереднені для відстані 12 мм від робочої поверхні насадки в площині фокусної плями:  
I – у ванні з дегазованою водою; II – на акустичній моделі біологічної тканини

На основі кривих розподілу акустичного тиску у ванні з дегазованою водою можна побудувати просторовий розподіл інтенсивності акустичного сигналу й оцінити значення акустичної інтенсивності  $I$  ( $\text{Вт}/\text{см}^2$ ) у будь-якій точці ультразвукового поля випромінювача. Задача розрахунку акустичної інтенсивності у кожній точці поля полягає у вимірюванні відносних значень акустичного тиску в кожному  $i$ -му з  $N$  фрагментів поля і нормуванні отриманого розподілу за інтегральною акустичною потужністю  $W$  ( $\text{Вт}$ ), виміряній поплавковим інтегральним вимірювачем ультразвукової потужності ІМУ-3. Оскільки розподіл сигналу симетричний відносно осі напрямку розповсюдження ультразвуку, фрагменти розподілу являють собою ряд концентричних кол. Значення акустичної інтенсивності  $I_i$  у кожному  $i$ -му фрагменті розрахувалось за виведеною нами формулою:

$$I_i = \frac{W p_i^2}{\sum_i p_i^2 S_i}. \quad (1)$$

Довірча межа сумарної похибки визначалась згідно з правилами обчислення похибок результатів прямих і непрямих вимірювань [9]. Діаметр центрального фрагмента узято рівним 1 мм; радіус кожного наступного фрагмента більший за попередній також на 1 мм. Криві розподілу акустичного тиску випромінювачів з насадками та фокусуючими випромінювачів розділено на 15 фрагментів (центральне коло та 14 концентричних кол). Виконавши обчислення за формулою (1), отримаємо розподіли акустичної інтенсивності випромінювачів при різних значеннях інтегральної акустичної потужності  $W$ , виміряній поплавковим вимірювачем ІМУ-3.

Для плоских випромінювачів з концентруючими насадками значення акустичної інтенсивності  $I_{\text{SATR}}$ ,  $\text{Вт}/\text{см}^2$

усереднені для центральної області діаметром 5 мм Для фокусуючих випромінювачів значення акустичної інтенсивності  $I_{SATP}$ , Вт/см<sup>2</sup> обчислені для центральної області діаметром 3 мм. Середнє значення акустичного тиску  $\bar{P}$  (у відносних одиницях) також розрахувалось у центральній області діаметром 5 мм для плоских випромінювачів і 3 мм для фокусуючих.

Поправковий коефіцієнт для спотворення ультразвукового поля  $K$  розрахувався за формулою

$$K_C = \frac{I_{SATP1}}{I_{SATP2}} = \frac{\bar{P}_1}{\bar{P}_2}, \quad (2)$$

**Таблиця 1.** Послаблення акустичного тиску та акустичної інтенсивності в моделі біологічної тканини внаслідок відбиття та інтерференції

	Плоскі випромінювачі з насадками		Фокусуючі випромінювачі	
	Випромінювач 1,1 МГц	Випромінювач 2,4 МГц	Випромінювач №2, 0,9 МГц	Випромінювач ЦС-13, 2,4 МГц
$\bar{P}_2$ , відн. од.	14,4 $\Delta = 0,5$	9,5 $\Delta = 0,6$	23,7 $\Delta = 2,0$	16,8 $\Delta = 2,7$
$\bar{P}_1$ , відн. од.	13,0 $\Delta = 0,7$	7,0 $\Delta = 0,4$	21,3 $\Delta = 1,9$	12,6 $\Delta = 2,0$
$\bar{P}_1 / \bar{P}_2$	0,9	0,75	0,9	0,75
$K_C$	0,8	0,5	0,8	0,5

Отже, в акустичній моделі зразка біологічної тканини або органу малого розміру, в якій відбувається багатократне відбиття ультразвуку від зовнішніх стінок та інтерференція, спостерігається послаблення середньої за площею акустичної інтенсивності  $I_{SATP}$ . Для плоского випромінювача з концентруючою насадкою та ефективним діаметром ультразвукового поля 5 мм на резонансній частоті 1,1 МГц і фокусуючого випромінювача № 2 з резонансною частотою 0,9 МГц виявлено 20 %-ве послаблення акустичної інтенсивності  $I_{SATP}$ . Для випромінювача з концентруючою насадкою та ефективним діаметром ультразвукового поля 5 мм з резонансною частотою 2,4 МГц й фокусуючого випромінювача ЦС-13 з резонансною частотою 2,4 МГц виявлено 50 %-ве послаблення акустичної інтенсивності  $I_{SATP}$ .

При дослідженні дозованої дії ультразвуку на біологічні тканини необхідно було враховувати можливі зміни

де  $\bar{P}_1$  – усереднений за площею акустичного тиску (в умовних одиницях) у моделі біологічної тканини,  $\bar{P}_2$  – усереднений за площею акустичного тиску (в умовних одиницях) у ванні з дегазованою водою характеризує розбіжність значень акустичного тиску в реальних та ідеальних умовах,  $I_{SATP1}$  – усереднена за площею акустичної інтенсивності в моделі біологічної тканини,  $I_{SATP2}$  – усереднена за площею акустичної інтенсивності, обчислена у ванні з дегазованою водою. Результати обчислень наведено в табл. 1.

**Таблиця 1.** Послаблення акустичного тиску та акустичної інтенсивності в моделі біологічної тканини внаслідок відбиття та інтерференції

	Плоскі випромінювачі з насадками		Фокусуючі випромінювачі	
	Випромінювач 1,1 МГц	Випромінювач 2,4 МГц	Випромінювач №2, 0,9 МГц	Випромінювач ЦС-13, 2,4 МГц
$\bar{P}_2$ , відн. од.	14,4 $\Delta = 0,5$	9,5 $\Delta = 0,6$	23,7 $\Delta = 2,0$	16,8 $\Delta = 2,7$
$\bar{P}_1$ , відн. од.	13,0 $\Delta = 0,7$	7,0 $\Delta = 0,4$	21,3 $\Delta = 1,9$	12,6 $\Delta = 2,0$
$\bar{P}_1 / \bar{P}_2$	0,9	0,75	0,9	0,75
$K_C$	0,8	0,5	0,8	0,5

значень акустичної інтенсивності внаслідок поглинання ультразвуку біологічними тканинами. Поправочний коефіцієнт на поглинання ультразвуку  $K_p$  розраховується за формулою згідно з роботами [2, 3]:

$$K_p = \frac{I}{I_0} = e^{-2ax}, \quad (3)$$

де  $I_0$  (Вт/см<sup>2</sup>) – початкова акустична інтенсивність, у даному випадку – обчислена у ванні з дегазованою водою;  $I$  (Вт/см<sup>2</sup>) – акустична інтенсивність на відстані  $x$  (см) від джерела ультразвуку в біологічній тканині,  $\alpha$  (см<sup>-1</sup>) – коефіцієнт поглинання ультразвуку у тканині. Поправкові коефіцієнти на поглинання ультразвуку  $K_p$ , розраховані для певних відстаней від робочих поверхонь випромінювачів, де вимірювались параметри біологічних тканин, наведено в табл. 2.

**Таблиця 2.** Поправкові коефіцієнти на поглинання ультразвуку біологічними тканинами

Тканина	Відстань $x$ , см	$K_p$	
		На частоті 1 МГц	На частоті 2,4 МГц
Мозок	1,0	0,81	0,55
М'яз поперек волокон	0,4	0,85	0,79
Шкіра	0,1	0,98	0,96
Стінка кишечнику	0,1	0,98	0,96
Печінка	0,2	0,92	0,85

При обчисленні коефіцієнта сумарного послаблення, який розрахувався за формулою

$$K_{sum} = K_C K_p, \quad (4)$$

було визначено, що сумарне послаблення враховує послаблення внаслідок спотворення та інтерференції ультразвуку в об'єктах малих розмірів і поглинання біологічними тканинами.

**Висновки.** Розроблено методику моделювання та оцінки змін значень акустичної інтенсивності ультразвукових випромінювачів в умовах дії на об'єкти малого розміру та з урахуванням поглинання біологічними тканинами.

Виявлено, що при дії на об'єкти розміру порядку 1 мм – 1 см (мозок, печінка, м'язи, шкіра щура) має місце істотне послаблення середнього значення акустичної інтенсивності внаслідок спотворення та інтерференції ультразвукового поля. На частоті 0,9–1,1 МГц послаблення становить 20 %, на частоті 2,4 МГц – 50 % як для плоских випромінювачів з концентруючою насадкою, так і для сферичних фокусуючих випромінювачів.

Додаткове послаблення акустичної інтенсивності відбувається внаслідок поглинання ультразвуку біологічними тканинами і може бути істотним. Наприклад, при дії сфокусованим ультразвуком частотою 2,4 МГц на мозок щурів послаблення внаслідок поглинання може становити 45 %, а сумарне послаблення – 72,5 %.

1. Берман Л. Ультразвук и его применение в науке и технике. – М., 1956.
2. Березовський В.А., Колотило Н.Н. Биофизические характеристики тканей человека. – Київ, 1990.
3. Голямин И.П. Ультразвук. – М., 1979.
4. Лалаппий Т.П., Трушіна В.А., Баріцький А.К., Гордо Ю.П. // Фізика живого. – 2001. – Т. 9, № 2. – С. 33–37.
5. Посудін Ю.І. Лабораторний практикум з дисципліни "Фізика з основами біофізики". – К., 2002.
6. Хілл К. Применение ультразвука в медицине. Физические основы. – М., 1989.
7. Damianou C., Nupulap K. // J. acoust. soc. am. – 1994. – Vol. 95, № 36. – P. 1641–1649.
8. Vykhotseva N.I., Adrianov O.S., Kolopatskaya I.I. // Bull. eksp. biol. med. – 1985. – Vol. 99, № 6. – P. 689–693.
9. Vykhotseva N.I., Nupulap K., Damianou C. // Ultrasound med. biol. – 1994. – Vol. 20, № 9. – P. 983–1000.

Надійшла до редакції 02.02.05

Т. Давидовська, д-р біол. наук, К. Богуцька, канд. біол. наук,  
Т. Федоренко, інж.

## РЕГУЛЯТОРНІ МЕХАНІЗМИ СКОРОЧЕННЯ СКІНОВАНИХ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ

Проведено аналіз даних літературних джерел, присвячених затвердженням основних положень механізму "фосфорилювання" на перфорованих сапоніном, а-токсином *Staphylococcus aureus*, β-есцином *Clostridium botulinum* гладеньких м'язах. Розглядається також участі іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у регуляції рухливості скорочувального апарату цих м'язів.

The literature data analysis, devoted to the approval of the basic conditions of the phosphorylation mechanism of smooth muscles perforated by saponin, *Staphylococcus aureus* α-toxin and *Clostridium botulinum* β-escin, was carried out. The role of  $\text{Ca}^{2+}$  in the motility regulation of contractile apparatus of these muscles was examined too.

У 1976 р. Ендо, а в 1979 р. Кітацева з успіхом використали для перфорації плазматичної мембрани спочатку скелетного, а потім і серцевого м'язів метод хімічного скінування за допомогою сапоніну. На гладеньких м'язах (*vas deferens*) цей метод уперше було застосовано в 1981 р. Квен, Кровер та Лі. Дослідження механізму дії сапоніну на плазматичну мембрану гладеньких м'язів показало, що ця поверхнево-активна речовина здатна утворювати в ній отвори діаметром 70–80 Å, залишаючи тканину функціонально активною. Після перфорації гладеньком'язова клітина являє собою систему з декількох компонентів: швидкого – обмін  $^{45}\text{Ca}$  представлений внутрішньоклітинним простором, проміжного та повільного, які відповідають цитозолю та  $\text{Ca}^{2+}$ -секвеструючим органелам. В основі дії сапоніну лежить його здатність утворювати погано розчинні еквімолярні комплекси з холестерином, які й перфорують плазматичну мембрану. Скіновані гладенькі м'язи, не зважаючи на деяку реорганізацію, зберігають скорочувальний апарат та основні внутрішньоклітинні структури, але такі препарати втрачають здатність відповідати на дію агоністів, які, як відомо, виявляють свій вплив через взаємодію з рецепторами, розташованими на плазматичній мембрani [4].

Розв'язання цієї проблеми стало можливим після застосування для перфорації мембрани гладеньких м'язів β-есцину *Clostridium botulinum* і а-токсину *Staphylococcus aureus*. Гіпотетична модель взаємодії останнього з плазматичною мембраною така: токсин, будучи гідрофільною молекулою, з'єднується зі специфічними чутливими до нього рецепторами (глікопротеїнами) і, вступаючи у контакт з ліпідним бішаром, спонтанно самоасоціюється на мембрані до форми амфіфільного олігомерного комплексу, який являє собою білковий циліндр з центральною порою діаметром 30 Å [7; 12].

На сьогодні для пояснення принципів, за якими здійснюється скорочення, найбільш експериментально обґрунтованим (але не вільним від недоліків) є механізм "фосфорилювання" міозину. Аналіз основних положень цього механізму в гладеньких м'язах і перевірка його на моделях *in vitro*, викладені в багатьох роботах [9; 18; 8]. Вони зводяться до наступного:

1. Фосфорилювання міозину здійснюється кіназою легких ланцюгів міозину.

2. Кіназа легких ланцюгів міозину активується  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючим білком кальмодуліном.

3. Кальмодулін, виступаючи посередником, забезпечує "чутливість" системи регуляції скорочувального апарату до змін внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію, збільшення якої призводить до зв'язування цих катіонів з кіназою легких ланцюгів міозину, що супроводжується зміною конформаційного стану міозину.

4. Ділянка ("кишеня"), що утворилася унаслідок конформаційних перебудов кінази легких ланцюгів міозину, реагує з алоензимом і набуває властивостей ферменту.

5. Активована кіназа легких ланцюгів міозину каталізує фосфорилювання кожного з двох регуляторних легких ланцюгів міозину.

6. Під дією актину відбувається активація АТФазної активності міозину.

7. Співвідношення між рівнем фосфорилювання міозину та активністю актин-активованої АТФази, як передбачають, регулюється актин-тропоміозиновим  $\text{Ca}^{2+}$ -залежним механізмом.

8. Ділянки взаємодії між актином і голівкою міозину є ділянками для генерації сили, але це положення є дискусійним, оскільки існує думка [9] на користь важливової ролі в цьому процесі "шиїки" міозинової молекули.

9. Ініціюється процес скорочення, який підтримується доти, поки внутрішньоклітинна концентрація іонів кальцію вища за порогову. Її зменшення, майже втричі, призводить до інактивації цього ферменту.

10. Кіназа легких ланцюгів міозину є субстратом для цАМФ-залежної протеїнкінази, підвищення концентрації якої призводить до її фосфорилювання по серину-815 і зменшенню її спорідненості з комплексом  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулін. Кіназна активність фосфорильованої кінази легких ланцюгів міозину зменшується.

11. Фосфатаза дефосфорилює легкий ланцюг міозину. Актин-активована  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазна активність міозину зменшується. Гладенькі м'язи релаксують.

Спірним у літературі є питання про те, чи є актин-активована АТФазна активність фосфорильованого міозину гладеньких м'язів  $\text{Ca}^{2+}$ -залежною? Гіпотетичний регуляторний механізм [1] припускає, що безпосереднє зв'язування  $\text{Ca}^{2+}$  з головками міозину може бути визначальним моментом у розвитку скорочення гладеньких м'язів, хоча регуляторна роль такого механізму повністю встановлена тільки для м'язів молюсків і деяких інших безхребетних. Згідно з цим механізмом, безпосереднє зв'язування  $\text{Ca}^{2+}$  може відбуватись тільки міозином, який має одну фосфорильовану голівку, тоді як фосфорилювання обох легких ланцюгів виключає таку можливість. Передбачається, що в гладеньких м'язах легкі ланцюги міозину формують  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язувальні ділянки на міозинових голівках, забезпечуючи тим самим функціонування додаткового механізму регуляції скорочення. Є також думка [16], що чутливість міозину гладеньких м'язів до іонів кальцію зумовлена не присутністю гіпотетичних високоспецифічних ділянок легких ланцюгів міозину, а присутністю неспецифічних  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -зв'язувальних ділянок, існування яких установлено в міозині хребетних. Іншими дослідженнями показано, що актин-активована АТФазна активність фосфорильованого міозину знижується у разі відсутності  $\text{Ca}^{2+}$ . Ураховуючи наведені вище дані, було зроблено припущення, що в гладеньких м'язах іони кальцію не діють як "вмікач-вимикач" скорочення, а впливають на властивості тільки частково інгібованої форми фосфорильованого міозину, аналогично 10S-конформації, і не мають ефекту

на повністю фосфорилюваний (6S-конформація) або дефосфорилюваний міозин [14].

Одним з експериментальних шляхів для з'ясування цього питання на скінованих моделях є дослідження так званої кальцієвої чутливості скорочувального апарату [19]. Установлено, що за кальцієвою чутливістю різні гладенькі м'язи різняться між собою. Так, ізольовані скіновані гладеньком'язові смужки шлунка жаби розвивають ізометричне напруження на присутність в активуючому розчині іонів кальцію в концентрації  $10^{-7}$  моль/л ( $pCa=7,0$ ), його напівмаксимальна величина ( $A_{0,5}$ ) досягається при  $pCa$  5,0–4,0. Порогове значення  $pCa$ , що викликає розвиток ізометричного напруження скінованих гладеньком'язових смужок *E. coli*, становить 6,9 ( $A_{0,5}=6,3$ ), а максимальне – 4,8. За даними інших авторів, зазначені параметри скінованих гладеньких м'язів цього ж об'єкта становлять: 7,0; 5,62 та 4,5 відповідно. Скіновані гладеньком'язові смужки трахеї розвивають максимальне напруження при  $pCa$  4,7, а мезентеріальної артерії – при  $pCa$  5,0.  $Ca^{2+}$ -чутливість скорочувального апарату гладеньких м'язів може модулюватись протеїн-кіназою C (каталізус фосфорилювання кальдесмону) тим самим знімає його інгібуючий вплив на взаємодію актину з міозином). У присутності активатора цього ферменту форбол 12,13-дібутирату спостерігається збільшення  $Ca^{2+}$ -залежного скорочення скінованих а-токсином *St. aureus* препаратів хвостової артерії щура, тоді як інгібітор протеїнкінази C-1-(5-ізоквінолінсульфоніл)-2-метилпіперазин (H-7) пригнічує його [12].

Експерименти на скінованих гладеньком'язових смужках показують на залежність  $Ca^{2+}$ -індукованого напруження від концентрації вільних і зв'язаних іонів магнію. Для запуску такого скорочення необхідною є  $[Mg^{2+}]$  понад  $10^{-3}$  моль/л ( $2 \cdot 10^{-3} Mg^{2+}$  та  $3 \cdot 10^{-3}$  моль/л  $Mg^{2+}$ -АТФ). Проте скорочення може виникати й у разі відсутності в розчині  $Ca^{2+}$  у відповідь на аплікацію високих концентрацій іонів магнію ( $2 \cdot 10^{-3}$  моль/л).  $Mg^{2+}$ -індуковане напруження не пов'язане зі збільшенням фосфорилювання міозину. Методом електрофорезу показано, що для контролю напруження гладеньких м'язів, отриманого у відповідь на аплікацію  $Ca^{2+}$ , рівень фосфорилювання легких ланцюгів міозину становить  $50 \pm 9\%$ , а у фазі розслаблення – 9 %. У випадку  $Mg^{2+}$ -індукованого ( $2 \cdot 10^{-2}$  моль/л) напруження в точці його максимального значення рівень фосфорилювання легких ланцюгів міозину становить  $9 \pm 4\%$ . Отже, за даних умов скорочення виявляється практично без фосфорилювання міозину. Аналогічні дані отримано останнім часом Су зі співавт. на гладеньком'язових клітинах середнього шару стінки сонної артерії свині, які свідчать про те, що іони магнію в присутності  $Mg^{2+}$ -АТФ ( $[Ca^{2+}] = 0$ ) сприяють збільшенню кількості циклюючих містків без зміни рівня фосфорилювання легких ланцюгів міозину [3].

За даними інших авторів, рівень фосфорилювання легких ланцюгів міозину все ж є суттєвим чинником у розвитку  $Ca^{2+}$ -чутливості скорочувального апарату скінованих гладеньких м'язів. Він у свою чергу визначає швидкість циклювання поперечних містків і силу скорочення. Досить повільні оберти містків скорочувального апарату гладеньких м'язів (у порівнянні з посмугованими м'язами) пов'язані з міцним зв'язком між аденоzinидифосфорною кислотою (АДФ) і міозином [5; 13].

Було показано також, що фосфорилювання 20 кДа легкого ланцюга міозину корелює зі швидкістю скорочення, але не з розвитком і підтриманням сили. Під час початкової фази скорочення має місце лінійна залежність між силою скорочення та фосфорилюванням, тоді як у період скорочення у стаціонарному стані такої прямої залежності не спостерігається. На гладеньком'язо-

вих смужках сонної артерії свині було показано, що силу скорочення можна підтримувати при низьких рівнях фосфорилювання завдяки повільному циклюванню *latch bridges*. Припускають, що ці містки утворюються у процесі дефосфорилювання вже приєднаних до актину поперечних містків за кооперативним механізмом. За цих умов дисоціація міозину від актину йде повільно [15]. За допомогою методу електронного парамагнітного резонансу показано, що в основі механізму утворення "latch bridges" лежить зміщення домену легких ланцюгів міозину, орієнтація якого визначається концентрацією  $Mg^{2+}$ -АДФ і ступенем тіофосфорилювання регуляторного легкого ланцюга. Крім "повільних містків", існують так звані "сплячі РР містки", розімкнення яких не залежить від присутності  $Mg^{2+}$ -АТФ. Підтвердженням того, що в разі відсутності фосфорилювання легких ланцюгів міозину активація гладеньких м'язів неможлива, слугує досліди з вивчення дії на  $Ca^{2+}$ -індуковані скорочення скінованих гладеньких м'язів конкурентних інгібторів кінази легких ланцюгів міозину, міозинкінази та полікатіонмодулюючої міозинфосфатази [11].

Важливу роль фосфорилювання легких ланцюгів міозину у скороченні гладеньких м'язів наочно демонструють також досліди з використанням аналога АТФ – АТФ<sub>S</sub>. Кіназа легких ланцюгів міозину може переносити на легкий ланцюг міозину термінальний тіофосфорильний залишок АТФ<sub>S</sub>. Фосфатаза здатна каталізувати тільки дуже повільний гідроліз цього залишку. При фосфорилюванні легких ланцюгів міозину з використанням цієї речовини в демембронованих гладеньком'язових смужках розвивається стійке напруження, яке не супроводжується розслабленням незалежно від  $[Ca^{2+}]$  і зберігається на попередньому рівні навіть у відсутності цих катіонів унаслідок повільногого гідролізу фосфатазою легких ланцюгів міозину тіофосфорильного залишку. Так, скіновані ізольовані гладеньком'язові клітини жаби, попередньо витримані в АТФ<sub>S</sub>, швидко вкорочуються у відповідь на аплікацію  $10^{-3} Mg^{2+}$ -АТФ у відсутності іонів кальцію, що свідчить про те, що тіофосфорилювання міозину призводить до підвищення його чутливості до низьких концентрацій субстрату під час циклювання поперечних містків. Заміна в такому комплексі фосфору ванадатом ( $NaVO_3$ ) у скінованих гладеньких м'язах, наприклад трахеї, супроводжується дисоціацією цього комплексу та розслабленням м'яза. Наступна обробка препарату АТФ у відсутності іонів  $Ca^{2+}$  призводить знову до замикання cross-bridge циклу та скорочення гладеньком'язових смужок. Нещодавно на скінованих гладеньком'язових смужках аорти показано [17], що ванадат дозозалежно, викликаючи редукцію 20 кДа легкого ланцюга міозину, змінює ступінь його фосфорилювання, тим самим припиняючи активуючу дію кінази легких ланцюгів міозину, що в кінцевому результаті супроводжується розслабленням  $Ca^{2+}$ -індукованого скорочення. Наведені результати експериментів указують на те, що фосфорилюваний міозин не тільки здатний підтримувати напруження у відсутності  $Ca^{2+}$ , але й розвиває його у разі повної відсутності цих катіонів, хоч і з відносно малою швидкістю. Цей результат суперечить висновкам про те, що фосфорилювані актоміозинові містки – це швидкоциклиючі містки. Причиною ж уповільнення скорочення може бути гальмування дифузії фрагмента кінази легких ланцюгів міозину всередину скінованої гладеньком'язової смужки. Останнє було доведено на скінованих гладеньком'язових смужках з використанням аналога АТФ – інозитол 1,4,5-трифосфату, який не є субстратом для кінази легких ланцюгів міозину, але є субстратом для АТФази актоміозину.

На скінованих гладеньком'язових смужках судин було також показано [15], що активація їхнього скорочення може бути спряжена з фосфорилюванням не тільки легких ланцюгів міозину, але й сателітних білків –  $S_1$  і  $S_2$ , які мають таку молекулярну масу, як і 20 кДа легкий ланцюг міозину.

Незважаючи на те, що переважна більшість авторів дотримується думки про необхідність фосфорилювання легких ланцюгів міозину як необхідної умови для активації актин-активованої  $Mg^{2+}$ -АТФази міозину гладеньких м'язів, існують деякі роботи, які її спростовують. Так, спостерігали зміни в рівні фосфорилювання легких ланцюгів міозину без відповідних змін активності цього ферменту, і навпаки, активацію його та скорочення скінованих гладеньких м'язів у разі відсутності змін у ступені їхнього фосфорилювання [15]. Експерименти на скінованих гладеньком'язових смужках мускульного шлунка курчати показують, що додавання в розчин 0,1 моль/л кальмодуліну може викликати скорочення, майже рівне максимальному при незмінному рівні фосфорилювання легких ланцюгів міозину та постійному рCa (5.8). На цих самих препаратах, оброблених тритоном X-100 протягом 10–20 хв, після препарування спостерігався розвиток напруження у відповідь на аплікацію  $Ca^{2+}$  і кальмодуліну, який не залежав від фосфорилювання міозину при проміжній концентрації іонів кальцію [13]. У роботі [15] показано, що базальний рівень фосфорилювання (корелює з пасивним напруженням скінованих гладеньких м'язів) забезпечується незалежно від фосфорилювання легких ланцюгів міозину регуляцією. Останнім часом у літературі з'явилися дані, одержані на скінованих гладеньком'язових клітинах шлунка курчати, які вказують на можливість розвитку  $Ca^{2+}$ -незалежного скорочення за умов фосфорилювання кальдесмону по Ser 617 та Ser 687 [10].

Дуже цікавою є гіпотеза Рембولد зі співавт., яка базується на дослідженнях механізму дії нітровазодилататора нітрогліцерину на регуляцію скорочувальної активності скінованих гладеньких м'язів каротидної артерії свині. Вона зводиться до того, що фосфорильований HSP20 здатний регулювати  $Ca^{2+}$ -індуковану силу напруження незалежно від рівня фосфорилювання 20 кДа легкого ланцюга міозину. Фосфорильований HSP20, зв'язуючись із тропоміозином, знімає його активуючий

вплив на актин і тим самим зменшує його здатність активувати актин-активовану АТФазу міозину у разі досягнення ним певного рівня фосфорилювання [6].

Узагальнюючи наведені дані літературних джерел, можна відмітити, що проблема скорочення гладеньких м'язів залишається актуальною, а основним механізмом, що пояснює це явище, залишається механізм "фосфорилювання", певні положення якого, на жаль, не узгоджуються з деякими експериментальними даними, одержаними на скінованих гладеньких м'язах. Так, дискусійним залишається питання про те, чи є фосфорилювання легких ланцюгів міозину гладеньких м'язів єдиною ланкою, через яку замикаються всі регуляторні процеси, кінцевою метою яких є забезпечення умов для формування різних типів містків між актином і міозином. Відкритим залишається також питання щодо фундаментальної ролі  $Ca^{2+}$  у регуляції рухливості скорочувального апарату гладеньких м'язів. Не до кінця з'ясованим є механізми  $Ca^{2+}$ -незалежного та  $Mg^{2+}$ -індукованого скорочення без фосфорилювання легких ланцюгів міозину та їхнє місце в загальній схемі регуляції скорочення-розслаблення.

1. Данілов В.М. // Біополімери і клітина. – 1996. – Т. 12, № 4. – С. 5–24.
2. Левицкий Д.И. Структурные особенности и функциональная роль миозина // Левицкий Д.И. Структура и функции белков сократительных систем. – Л., 1987. 3. Alter A., Malmqvist U. // Acta Physiol. Scand. – 1996. – Vol. 164, № 4. – P. 363–372. 4. Fisher K., Smith C.A., Thoden J. et al. // Biophys. J. – 1995. – Vol. 68, № 5. – P. 19–28. 5. Foster D.B., Shen L.H., Kelly J. et al. // J. Biol. Chem. – 2000. – Vol. 275, № 3. – P. 1953–1963.
6. Ikebe M., Hartshorne D.J. // J. Biol. Chem. – 1985. – Vol. 260, № 24. – P. 13146–13153. 7. Kitazawa T., Takizawa N., Ikebe M. et al. // J. Physiol. – 1999. – Vol. 520, № 1. – P. 139–152. 8. Marimoto S., Sato J., Ogawa Y. // J. Biochem. (Tokio). – 1999. – Vol. 126, № 1. – P. 146–152. 9. Pfleiderer G., Fischer W., Chalovich J.M. // Adv. Exp. Med. Biol. – 1993. – Vol. 332. – P. 195–202. 10. Rembold C.M., Foster D.B., Strauss J.D. et al. // J. Physiol. – 2000. – Vol. 524, Pt. 3. – P. 865–878. 11. Sasajima H., Shima H., Tojoda Y. et al. // Cardiovas. Res. – 1997. – Vol. 36, № 1. – P. 86–91. 12. Sasaki M., Hattori Y., Tomita F. et al. // Br. J. Pharmacol. – 1998. – Vol. 125, № 8. – P. 1651–1660. 13. Sobieszek A. // Eur. J. Biochem. – 1991. – Vol. 199, № 3. – P. 735–743. 14. Strauss J.D., de Lamerolle P., Paul R.J. // Am. J. Physiol. – 1992. – Vol. 262, № 6, Pt. 6. – P. 1437–1445. 15. Su X., Pott J.W., Moreland R.S. // Am. J. Physiol. – 1999. – Vol. 276, № 5, Pt. 2. – P. H141. 16. Talon S., Huchet-Cadion C., Leoty C. // Pflügers Arch. – 1999. – Vol. 438, № 6. – P. 814–816. 17. Unno N., Shingu H., Isogai M. et al. // J. Vet. Med. Sci. – 1998. – Vol. 60, № 11. – P. 1227–1232. 18. Van Heijst B.G., De Wit E., Van der Heide U.A. et al. // J. Muscle Res. Cell Motil. – 1999. – Vol. 20, № 1. – P. 8–11. 19. Walsh M. P. // Mol. and Cell. Biochem. – 1994. – Vol. 135, № 1–2. – P. 21–41.

Надійшла до редакції 29.06.05

УДК 612.821 : 612.82/83

В. Кравченко, канд. біол. наук, М. Макарчук, д-р біол. наук

## ВПЛИВ ЗАПАХІВ ЕФІРНИХ ОЛІЙ ЛИМОНА І ЛАВАНДИ НА ПСИХОФІЗІОЛОГІЧНІ ФУНКЦІЇ ОБСТЕЖУВАНИХ РІЗНОЇ СТАТИ

Досліджено вплив фонової експозиції запахів ефірних олій лимона і лаванди на нейродинамічні функції та показники короткочасної пам'яті у чоловіків і жінок. Показано, що в жінок обидва запахи викликають більш виражені зміни досліджуваних показників. На фоні експозиції запаху EO лимона зростала швидкість обробки інформації та точність короткочасної пам'яті. Характер реагування на одоранці EO лаванди був відмінним у представників різної статі: у жінок у цих умовах спостерігається посилення процесів збудження, тоді як у чоловіків активації ЦНС не відбувалося.

An influence of background exposure of lemon and lavender essential oils' odors on the neurodynamic functions and indexes of short-term memory in males and females was studied. It was showed, that both odors cause more evident changes of investigated indexes in women. Under lemon odor condition the velocity of information processing and accuracy of short-term memory increased. Type of reaction on exposure of lavender odor was gender-specific: in females strengthening of excitation was observed, while in males, typical for activation changes didn't register.

Вступ. Відомо, що в осіб різної статі сприйняття запахів певною мірою відрізняється, що в першу чергу зумовлено статевими морфологічними та нейрохімічними відмінностями структур лімбічної системи, що задіяні в обробку запахової інформації [5]. Низкою досліджень показано, що у жінок пороги нюхової чутливості дещо нижчі,

ніж у чоловіків [12; 13], крім того, вони можуть змінюватися залежно від фаз менструального циклу [8]. Є дані, що у жінок чутливість до певних одорантів може зростати при їхньому серійному повторному пред'явленні, чого не спостерігається у чоловіків [7]. Вважається, що це надає перевагу жінкам у запаховій ідентифікації родичів, влас-

них дітей тощо. З іншого боку, електрофізіологічними роботами показано, що у жінок спостерігається більша амплітуда викликаних хемосенсорних потенціалів [10], що опосередковано свідчить про їхню більшу чутливість до запахів. Поряд з цим, у дослідженнях вітчизняних учених у відповідь на дію запахових чинників була виявлена більша реактивність чоловіків за ЕЕГ показниками та параметрами вариабельності серцевого ритму [1]. Відносна узгодженість у літературі стосується переваги жінок у ідентифікації запахів у різних типах завдань [6; 9], кращої довготривалої пам'яті на запахи порівняно з чоловіками [9]. Роботами Р. Герц та ін. [11] показано, що жінкам притаманний тісніший взаємозв'язок пам'яті із запахами, у них швидше формуються мнемічні асоціації з ароматичними чинниками, а сексуальна поведінка жінок більшою мірою залежить від нюхової інформації. На основі робіт з використанням методів візуалізації роботи головного мозку можна дійти до висновку, що функціональна гендерна різниця зумовлена не елементарними процесами кодування запахової інформації (сприйняття запахів та їхнє визначення), а швидше стилем її когнітивної обробки – ідентифікації, розрізнення, запахової пам'яті. Так, за даними [5], експозиція як чисто ольфактивних, так і тригемінальних подразників, зумовлює патерн активації головного мозку, ідентичний як для жінок, так і чоловіків, тоді як пред'явлення феромоноподібних речовин викликає активацію, відмінну у представників різної статі [18]. Разом з тим, даних про особливості реагування чоловіків і жінок на одоростимуляцію, зокрема стан уваги та нейродинамічних функцій при фоновій експозиції запахів, дуже мало [3] і вони потребують доповнення й уточнення. Метою даної роботи було проаналізувати характер змін психофізіологічних функцій у обстежуваних різної статі при одорациї запахами ефірних олій (ЕО) лимона й лаванди. Відповідно до наших попередніх досліджень, ЕО лимона притаманний чітко виражений стимулюючий вплив на ЦНС, тоді як для ЕО лаванди характерний швидше модулюючий вплив на функціональний стан головного мозку [2].

**Об'єкт і методи дослідження.** У дослідженні як обстежувані брали участь 204 студенти Київського національного університету імені Тараса Шевченка обох статей віком 19–23 років без ознак ринальних патологій. У всіх обстежуваних за допомогою комп'ютерної експрес-методики, розробленої на кафедрі фізіології людини і тварин університету [4], визначали ряд показників нейродинамічних функцій: латентний період простої сенсомоторної реакції (ЛППР), латентний період реакції вибору (ЛПРВ), функціональну рухливість нервових процесів (ФРНП), коефіцієнт сили нервової системи (КС), працездатність головного мозку (ПГМ), функціональний рівень системи (ФРС). Час центральної затримки (ЦЗ) розраховували за формулою: ЦЗ = ЛПРВ – ЛППР. Крім того, визначали показники розвитку короткочасної пам'яті (КЧП) на цифри, літери та геометричні фігури: комплексний показник розвитку КЧП (mc x кількість помилок<sup>1</sup>) та показник точності короткочасної пам'яті (% помилок). У всіх обстежуваних визначали рівень екстраверсії та нейротизму шляхом психологічного тестування за допомогою тесту Айзенка (Eysenck Personality Inventory). Експеримент складався з трьох обстежень, які проводили в один і той самий час у різні дні. На першому етапі обстежуваний проходив тестування без дії будь-яких впливів. Під час другого і третього обстеження проходження комп'ютерного тестування відбувалось на фоні експозиції запахів (ЕО) лимона й лаванди. При цьому джерело запаху розміщували на відстані 5 см від носа обстежуваного за 5 хв до

початку тестування. Наприкінці експерименту обстежуваний давав оцінку ступеню суб'єктивної приємності запаху за 10-балльною шкалою, згідно з якою 1–4 бали відповідали неприємним відчуттям, 4–6 – нейтральному ставленню до запаху, і оцінка 6–10 балів означала, що запах виявився приємним для учасника досліду. У групах, які проходили тестування під час дії запахів ЕО, обстежувані розподілились за статтю наступним чином: у дослідах з одорациєю ЕО лимона брали участь 21 особа чоловічої та 81 жіночої статі, у дослідах із застосуванням запаху ЕО лаванди обстежуваних було 23 чоловіків й 78 жінок.

Усі отримані результати оброблялися методами описової статистики. Для опису одержаних даних застосовували медіані та міжквартильний розмах. Значущість відмін досліджуваних параметрів при порівнянні залежних вибірок проводилося за допомогою критерію знакових рангових сум Вілкоксона. Для порівняння незалежних вибірок застосовували двовибірковий U-критерій Манна – Уїтні.

**Результати та їх обговорення.** При порівнянні вихідних показників психофізіологічних функцій в обох групах між представниками різної статі відмін виявлено не було. Єдиним показником, що значимо відрізняється ( $p < 0,01$ ), був рівень нейротизму – у представниць жіночої статі обох дослідних груп рівень нейротизму був вищим (15; 13–17), ніж у чоловіків (8; 7–12).

Результати, отримані при одорациї досліджуваними ЕО, виявили характерну гендерну різницю в реагуванні на фонову запахостимуляцію. Як видно з табл. 1, експозиція запаху ЕО лимона у жінок підвищувала рівень ФРС, зменшувала ЦЗ, а також покращувала результати тестів на короткочасну пам'ять на цифри порівняно з чоловіками (вищий комплексний показник КЧП і менший відсоток допущених помилок). Аналіз відносних даних (табл. 2) показує, що одорация ЕО лимона викликає збудження ЦНС у всіх обстежуваних, але абсолютні показники свідчать, що у жінок така активація є вираженішою, і особливо помітним є посилення функцій уваги (зростання ФРС, зменшення кількості помилок). Цікавим, на нашу думку, є те, що поліпшення показників КЧП у жінок спостерігалось саме в тестах із цифрами. Це може вказувати на переважний вплив запаху лимона на процеси, що реалізуються лівою півкулею головного мозку. У чоловіків таких змін при одорациї не відбувалося.

Одорация ЕО лаванди також неоднаково впливалася на показники психофізіологічних функцій чоловіків і жінок. Виходячи з відносних даних (табл. 2), ЕО лаванди чинить збуджувальний вплив на ЦНС жінок, що виявляється в зростанні швидкості нейродинамічної взаємодії – зменшення ЛПРВ, тривалості ЦЗ і зростанні ФРНП. У чоловіків значимих змін цих показників при експозиції запаху лаванди не відбувалося. Зростання комплексного показника КЧП на фігури без змін кількості допущених помилок у жінок може свідчити про активуючий вплив ЕО лаванди переважно на праву півкулю. При порівнянні абсолютних даних у представників різних статей (табл. 1) виявлялась різниця у тривалості ЦЗ і ФРНП, якої не було при проходженні тестів без одорациї, що також указує на диференційний активуючий вплив ЕО лаванди. Привертає увагу й той факт, що жінки оцінювали запах лаванди як більш приємний (6 балів), тоді як чоловіки в цілому визначали його як нейтральний (5 балів). Таку різницю в оцінці запаху можна пояснити кращим розвитком асоціативної емоційної пам'яті у жінок порівняно з чоловіками [11], що могло втілюватися у вищій гедонічній оцінці аромату.

**Таблиця 1.** Показники властивостей психофізіологічних функцій у обстежуваних різної статі в умовах одораций (медіана, верхній і нижній квартилі)

Показник	Група "лімон"		Група "лаванда"	
	Чоловіки (n = 21)	Жінки (n = 81)	Чоловіки (n = 23)	Жінки (n = 78)
Латентний період простої реакції, мс	229,04 213,83–253,13	238,87 222,43–258,26	240,09 216,26–259,13	236,83 218,78–257,74
Коефіцієнт сили нервової системи	0,97 0,89–1,06	1,00 0,91–1,07	0,95 0,90–1,02	0,98 0,91–1,09
Функціональний рівень системи, с <sup>-2</sup>	4,32 * 4,06–5,43	5,38 4,17–5,43	5,33 4,16–5,43	5,38 4,17–5,43
Латентний період реакції вибору, мс	387,00 353,20–420,00	370,10 346,00–404,20	380,60 342,70–424,50	366,60 339,60–393,30
Тривалість "центральної затримки", мс	144,71 * 133,27–163,18	127,68 107,70–145,96	147,82 # 117,31–162,98	127,51 108,70–144,74
Функціональна рухливість нервових процесів, мс	446 422–562	430 346–526	554 ** 422–782	420 350–518
Працездатність головного мозку, % помилок	8,50 4,00–13,50	6,50 3,50–11,50	7,50 4,50–11,50	7,25 5,00–11,50
Комплексний показник короткочасної пам'яті, мс х % помилок	Літери	1,83 1,45–2,40	2,20 1,41–3,13	1,86 0,08–0,20
	Цифри	1,54 ** 1,03–1,96	1,92 1,41–2,45	1,58 1,11–2,27
	Фігури	0,80 0,67–1,01	0,85 0,70–1,08	0,74 0,64–0,91
Точність короткочасної пам'яті, % помилок	Літери	0,13 0,08–0,20	0,12 0,07–0,18	0,15 0,08–0,20
	Цифри	0,15 # 0,10–0,20	0,12 0,08–0,17	0,15 0,10–0,20
	Фігури	0,28 0,23–0,32	0,28 0,23–0,33	0,30 0,23–0,37
Суб'єктивна оцінка запаху, бали		7,00 6,00–8,00	7,50 5,00–9,00	5,00 * 4,00–7,00
* p<0,05; ** p<0,025; # p<0,07 – чоловіки відносно жінок.				

**Таблиця 2.** Відносні зміни показників властивостей психофізіологічних функцій при одорациї в обстежуваних різної статі (медіана, верхній і нижній квартиль), відн. од.

Показник	Група "лімон"		Група "лаванда"	
	Чоловіки (n = 21)	Жінки (n = 81)	Чоловіки (n = 23)	Жінки (n = 78)
Латентний період простої реакції	0,96 0,89–1,04	0,97 0,91–1,04	0,99 0,88–1,04	0,98 0,90–1,03
Коефіцієнт сили нервової системи	0,92 0,85–1,02	0,91 0,83–1,06	0,94 0,86–1,04	0,99 0,88–1,10
Рівень функціональних можливостей	1,03 0,98–1,08	1,01 0,94–1,14	0,99 0,95–1,43	1,01 0,89–1,08
Латентний період реакції вибору	0,92 0,87–0,97	0,93 0,87–0,98	1,00 0,93–1,04	0,94 ** 0,87–1,00
Тривалість "центральної затримки"	0,87 0,74–1,00	0,83 0,65–1,04	1,03 0,88–1,20	0,89 # 0,72–1,10
Функціональна рухливість нервових процесів	0,69 ** 0,62–0,95	0,85 0,71–1,11	1,05 0,86–1,39	0,89 ** 0,72–1,07
Працездатність головного мозку	0,80 0,56–1,21	0,83 0,57–1,21	0,84 0,56–1,50	0,88 0,62–1,35
Комплексний показник короткочасної пам'яті	Літери	1,54 1,05–1,87	1,38 0,97–2,15	1,26 0,78–1,86
	Цифри	1,03 0,86–1,34	1,17 0,86–1,63	1,07 0,60–1,40
	Фігури	1,22 0,88–1,36	1,11 0,95–1,43	0,93 0,76–1,07
Точність короткочасної пам'яті	Літери	0,74 0,54–1,33	0,74 0,48–1,11	0,78 0,59–1,20
	Цифри	1,0 0,67–1,27	0,83 0,64–1,18	0,96 0,62–1,50
	Фігури	0,85 0,71–1,19	0,90 0,76–1,10	1,11 0,94–1,37

\* p<0,05; \*\* p<0,025; # p<0,07 – чоловіки відносно жінок.

Отримані результати вказують на більшу реактивність жінок у відповідь на одоростимуляцію обома ЕО порівняно з чоловіками: запах лимона й лаванди мали збуджувальний вплив на ЦНС жінок, причому одорация ЕО лимона сприяла посиленню процесів уваги, а експозиція запаху лаванди у жінок не позначалася на уважності, проте прискорювала швидкість обробки інформації.

Зокрема в правій півкулі. Згідно з даними І. Зими зі співавт. [1], чоловіки чутливіші до дії олфактивних підроздників як за ЕЕГ-показниками, так і за параметрами варіабельності серцевого ритму. С. Крижановським [3] показано, що характер змін амплітудно-частотних показників ЕЕГ у чоловіків відрізняється залежно від виду одоранту, тоді як у жінок такі зміни за дії різних запахів

були в цілому подібними, хоча в цьому ж дослідженні не виявлено різниці показників функції уваги в умовах одорациї у чоловіків і жінок. За нашими даними, зміни нейродинамічних показників при одорациї ЕО лимона й лаванди у жінок були досить подібними й відображали процеси активації в ЦНС, тоді як у чоловіків за дії запаху лаванди змін, характерних для активації (див. табл. 2) не спостерігалось. У літературі є ряд робіт, що також виявлено більший вплив запахів на психоемоційний стан жінок. Так, у роботі [17] експозиція приємного запаху зменшувала бальові відчуття у жінок, чого не спостерігалося у чоловіків, хоча при цьому у представників обох статей цей запах поліпшував настрій. Дані Д. Лернер [16] свідчать, що вплив одорациї на тривожність і настрій у жінок більш виражений, ніж у чоловіків. Можна припустити, що у жінок при сприйнятті запахових подразників відбувається більша активація лімбічних структур, задіяніх в обробку цього виду сенсорної інформації, а це, як наслідок, зумовлює помітніші зсуви в психоемоційній сфері. Проте отримані результати можна також трактувати, виходячи з більшої реактивності невротиків на дію запахів – у нашому дослідженні жінки мали значимо вищі бали за шкалою нейротизму в тесті Айзенка. Згідно з нашими даними [14], а також з роботами інших авторів [1], у невротиків зміни показників активації за дії одорантів є більш інтенсивними порівняно з емоційно стабільними обстежуваними. У будь-якому випадку, отримані дані свідчать про необхідність урахування статі людини при призначенні тієї ароматичних засобів з метою впливу на функціональний і психоемоційний стан, оскільки ЕО лаванди, скажімо, традиційно використовується як заспокійливий засіб, тоді як у жінок ми не спостерігали такого ефекту при фоновій одорациї цією ефірною олією.

УДК 599.742.42

**Висновки.** У жінок фонова дія запахів ЕО викликає більш виражені, ніж у чоловіків зміни показників короткочасної пам'яті та нейродинамічних функцій головного мозку. На фоні запаху ЕО лимона швидкість обробки інформації і точність короткочасної пам'яті зростала в обстежуваних обох статей. Характер реагування на запах ЕО лаванди відрізняється у представників різної статі: у жінок у цих умовах посилюються процеси збудження, тоді як у чоловіків активації нервової системи не відбувається.

1. Зима І.Г., Чернінський А.О., Піскорська Н.Г. та ін. // Вісн. Київ. ун-ту ім. Т. Шевченка. Біологія. – 2003. – В. 39. – С. 30–31.
2. Кравченко В.І., Макарчук М.Ю. // Фізика живого. – 2004. – Т. 12, № 2. – С. 92–100.
3. Крижановський С.А., Зима І.Г., Макарчук М.Ю. та ін. // Фізика живого. – 2004. – Т. 12, № 1. – С. 111–120.
4. Філімонова Н.Б. Комп'ютерна експрес-методика для визначення психофізіологічного стану людини // Матеріали II Міжнарод. наук.-метод. конф. "Культура здоров'я як предмет освіти". Херсонський держ. пед. ун-т, 2000 р. – Херсон, 2000. – С. 204–209.
5. Bengtsson S., Berglund H., Gulyas B. et al. // Chemical Senses – 2001. – Vol. 12, № 9. – P. 2027–2033.
6. Cain W.S. // Chemical Senses. – 1982. – Vol. 7. – P. 129–42.
7. Dalton P., Doolittle N., Breslin P. // Nature Neuroscience. – 2002. – Vol. 5, № 3. – P. 199–200.
8. Doty R.L. // Annual Review of Psychology – 2001. – Vol. 52. – P. 423–452.
9. Doty R., Applebaum S., Zusko H. // Neuropsychologia – 1995. – Vol. 30. – P. 179–86.
10. Evans W.J., Cui L., Statt A. // Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. – 1995. – P. 293–301.
11. Herz R., Cupchik G. // Chemical Senses. – Vol. 20. – P. 517–528.
12. Kobal G., Kettnermann B. // International J. of Psychophysiology. – 2000. – Vol. 36. – P. 157–163.
13. Koelaga H., Koster E. // Ann NY Acad Sci. – 1974. – Vol. 237. – P. 234–246.
14. Kravchenko V.I., Makarchuk M.J. // Психофармакология и биологическая наркология. 2005. – Т. 5, № 2. – С. 922.
15. Lehmer J. // Chemical Senses – 1993. – Vol. 18. – P. 17–26.
16. Lehmer J., Eckersberger C., Walla P., Potsch G., Deecke L. // Physiol. Behavior – 2000. – Vol. 71, № 1–2. – P. 83–86.
17. Marchand S., Arzénault P. // Physiology & Behavior – 2002. – Vol. 76. – P. 251–256.
18. Savic I., Gulyas B., Berglund H. // Neuroimage – 2000. – Vol. 5. – P. 751.

Надійшла до редколегії 27.09.05

М. Ільєнко, д-р біол. наук, В. Романюк, студ.

## МІНЛИВІСТЬ І АДАПТИВНЕ ЗНАЧЕННЯ ОТВОРУ МЕДІАЛЬНОГО НАДВИРОСТКА ПЛЕЧОВОЇ КІСТКИ АМЕРИКАНСЬКОЇ НОРКИ

Проведено морфофункциональний аналіз надвиросткового отвору в дистальному епіфізі плечової кістки американської норки. Аналіз передбачає вивчення частоти зустрічальності, розміри й адаптивне значення надвиросткового отвору.

*Morpho-functional analysis of foramen of epicondiale in distal epiphysis of humerus in American mink are discussed. The analysis permitted to study frequency of occurrence, variability of size and adaptive sense of this foramen of epicondile.*

**Вступ.** Актуальність вивчення мінливості певних структур організму має важливе значення для систематики (особливо в палеозоології), функціональної морфології, екології. Дані робота спрямована на дослідження такої ознаки, як отвір у медіальному надвиростку плечової кістки (Foramen epicondiloideum). Цей отвір зустрічається в одних видів майже постійно. Так, у свійського кота він був відсутнім лише в 1,3 % особин та ще в одного екземпляра на одній із кінцівок. Ще у трьох котів дужка каналу була неповністю замкненою. (Досліджено 150 екземплярів цих тварин [3]). У інших ссавців його знаходить досить рідко – у людини, наприклад, наявність цього каналу було виявлено різними дослідниками в 1, максимум 2,7 % випадків від числа досліджених трупів (число не вказується [1]). У багатьох видах тварин він не зустрічається ніколи.

Отвір медіального надвиростка плечової кістки досліджували в еколого-морфологічному аспекті [2]. У куницевих цю морфологічну ознаку нами було виявлено у представників роду куниць (3 види), росомах

(1 вид), видр (1 вид), каланів (1 вид), борсуків (1 вид), ласок і тхорів (6 видів), перев'язок (1 вид). Разом це становить 15 видів, однак кількість екземплярів їх була не-значною (не перевищувала 3). Для пояснення цього явища нами було проаналізовано також кінцівки інших видів ссавців. Установлено наявність отвору у 12 видів (належать до 4 родів) котячих, у гризунів (27 видів) – у одних видів він мав місце, в інших його не було. Ще в інших видів (птахи, кажани, представники парно- і непарнопалих, китоподібних) він за нашими (Ільєнко) даними був відсутній у більш як 500 досліджених видів тварин.

**Об'єкти й методи дослідження.** Для визначення рівня мінливості цієї ознаки та можливості використання її для цілей систематики, з'ясування адаптивного значення для дослідження використано представника куницевих – американську норку (*Mustela vison*). Матеріал (права й ліва грудні кінцівки 100 екземплярів трупів норки) отримано з Переяслав-Хмельницького звірогосподарства. Після спеціальної обробки плечової кістки було проведено аналіз цього отвору з метою з'ясування наявності його в плечо-

вих кістках обох кінцівок, відносних розмірів отвору, проаналізовано також функцію грудної кінцівки норки тощо.

**Результати та їх обговорення.** Нами було встановлено, що отвір має місце практично в усіх 100 екземплярів норки й лише в одного екземпляра він був лише в правій плечовій кістці (у будові дистальних епіфізів обох кісток правої та лівої кінцівок морфологічних відхилень не виявлено). Крізь цей отвір завжди проходить такий важливий для кінцівки нерв, як серединний (*l. medianus*) а іноді ще й плечова артерія (*a. brachialis*), яка постачає кров для всієї кінцівки. Плечова вена ніколи не заходить у отвір як у норки, так і у свійського кота за даними Т. Стефановськи, Я. Заболоцьки.

Таблиця 1. Облік мінливості параметрів отвору плечової кістки норки американської

	$\bar{M}$	$X_{\max}$	$X_{\min}$	R	K	Середнє відхилення	Стандартне відхилення	CV
Довжина отвору (заг.)	2,032	4,300	1,400	2,900	3,071	0,201	0,342	16,8
Довжина отвору (л.)	2,038	3,400	1,600	1,800	2,125	0,195	0,289	14,2
Довжина отвору (пр.)	2,028	4,300	1,400	2,900	3,071	0,206	0,391	19,3
Індекс (заг.)	0,426	0,741	0,295	0,446	2,510	0,037	0,055	12,9
Індекс (л.)	0,427	0,580	0,333	0,247	1,741	0,036	0,046	10,7
Індекс (пр.)	0,425	0,741	0,295	0,446	2,511	0,039	0,063	14,9

Примітки:  $\bar{M}$  – середнє значення ознаки,  $X_{\max}$  – максимальне значення ознаки,  $X_{\min}$  – мінімальне значення ознаки.

Використовуючи різні показники мінливості, отримали такі результати: найбільш мінливі довжина отвору та індекс правої кінцівки, а найменш – лівої, що можна пояснити наявністю у тварин правобічності.

При визначенні адаптивного значення цього отвору автори цієї статті перш за все виходили з того, що цей отвір існує у норки, як і в кота, не сам по собі, а в ньому міститься нерв або ще й артерія, тобто він має захисне значення для цих структур кінцівки. Крім того, ураховували основну та другорядні функції грудної кінцівки, позицію останньої відносно тіла, розвиток надвиростка, розвиток м'язів в області ліктьового суглобу та біомеханіку кінцівки. Останнє, очевидно, найбільшою мірою впливає на наявність цього отвору, однак воно досліджено нами ще недостатньо.

Як у більшості представників куницевих, у норки є ключиця, кінцівки п'ятипалі, кістки передпліччя між собою не зростаються; кисть долоневою поверхнею повернута до тіла; медіальний надвиросток відносно добре розвинений; до нього прикріплюється досить добре розвинений клювоподібно-плечовий м'яз; *t. coracobrachialis* починається від клювоподібного відростка лопатки, а також круглий пронатор, *t. pronator teres*, який закінчується на зовнішній поверхні променевої кістки передпліччя. Грудна кінцівка норки, крім функцій опори й пересування, здатна виконувати ще й такі функції як риття, маніпулювання та лазіння, тобто є поліфункціональною.

Позиція кінцівки у норки має такі особливості. Під час руху, особливо при полюванні на жертву шляхом скрадування, грудна кінцівка перебуває в напівзігнутому стані, ліктьовий суглоб завантажений масою тіла в зігнутому стані й променева та ліктьова кістки при пересуванні та утриманні здобичі, маніпуляціях перехрещені, тобто проксимальний кінець променевої кістки прикріплюється до плечової кістки латерально, а дистальний її кінець закінчується на зап'ястку медіально, а ліктьова навпаки: проксимальний кінець бере початок медіально, а дистальний закінчується на латеральному краї зап'ястку. Усе це разом призводить до того, що серединний нерв, що міститься тут, міг би зазнавати певного здавлювання, якби не був захищеним кістковою дужкою надвиростка. (У тазовій кінцівці перехрещування великомілкової та малогомілкової

Для визначення мінливості довжини надвиросткового отвору плечової кістки норки американської брали як абсолютне значення довжини отвору, так і індекс (відношення довжини надвиросткового отвору до довжини плечової кістки), причому ліві й праві кінцівки розглядалися як окремо, так і разом (загальна довжина отвору та індекс).

Для обліку мінливості використано такі способи обробки даних: розмах варіації R, коефіцієнт Берга K, середнє відхилення, стандартне відхилення, коефіцієнт варіації CV.

Отримані результати наведено в табл. 1.

кісток ніколи не буває й опора завжди здійснюється на великомілкову кістку).

Однозначно можна стверджувати, що наявність отвору пов'язана з поліфункціональністю грудної кінцівки, оскільки в кістках тазової кінцівки (яка не здатна до маніпуляцій чи інших додаткових функцій) цей отвір відсутній в усіх дослідженнях нами видів ссавців, у літературі такі дані та кож відсутні як для сучасних, так і для викопних форм.

Цього отвору немає у видів, грудна кінцівка яких адаптована лише для опори й пересування шляхом згиально-розгинальних рухів у сагітальній площині й практично зовсім не здатна виконувати інші додаткові функції, коли кінцівка могла б здійснювати рухи в інших площинах відносно повздовжної осі тіла.

Нами було порівняно цю ділянку кінцівки області ліктьового суглоба коня і норки. У коня маса тіла припадає на променеву кістку (ліктьова кістка в редукованому вигляді приростає до променевої ззаду у вигляді ліктьового відростка), а у норки вона розподіляється на обидві ці кістки. У коня дзьобоподібно-плечовий м'яз прикріплюється приблизно посередині плечової кістки над віростком, у норки він прикріплюється до надвиростка, у коня круглий пронатор відсутній і ротаційні рухи в кінцівці відсутні.

Що стосується розвитку медіального надвиростка норки, то він відносно добре розвинений, оскільки до нього прикріплюється добре виражені дзьобоподібно-плечовий м'яз і пронатор.

**Висновки.** Провідним в утворенні захисного кільця в надвиростку є, на наш погляд, біомеханіка кінцівки, розвиток надвиростка, що викликано величиною та роллю м'язів, що до нього прикріплюються.

Стосовно вкрай низької мінливості ознаки, то це може бути наслідком того, що вибірка була взята не із природної популяції, а зі спеціалізованого господарства, в якому з даною популяцією з року в рік проводиться штучна селекція. Однак навіть у разі більшої мінливості цієї ознаки отримані результати дають можливість рекомендувати використовувати її як діагностичну ознаку в систематиці.

1. Даренін Ч. Сочинения. – М., 1953. – Т. 5. Происхождение человека и половой отбор; выражение эмоций у человека и животного / Под ред. Е.Н. Павловского. 2. Ільєнко М.М. // Вісн. Київ. ун-ту ім. Т. Шевченка. Біологія. – 2000. – Вип. 31. – С. 39–41. 3. Stefanovsky T., Zablocky J. // Folia morphologica (Polska). – 1969. – Т. 28, № 3. – S. 417–420.

УДК 612. 357. 3

Т. Синельник, канд. біол. наук, О. Синельник, канд. біол. наук,  
В. Рибальченко, д-р біол. наук

## ЗНАЧЕННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНИХ МЕМБРАННИХ ПОРУШЕНЬ У ХОЛЕСТАЗІ ПІД ВПЛИВОМ ХЕНОДЕЗОХИЛЕВОЇ КИСЛОТИ

Досліджено дію хенодезоксихолевої кислоти ( $1,4 \cdot 10^{-4}$  моль/л) на секрецію жовчі за умов зменшення її токсичних впливів у гепатоцитах. Виявлено критичність порушень функцій мембрани плазматичного ретикулуму в розвитку холестатичного ураження печінки.

We have studied the chenodeoxycholic acid ( $1,4 \cdot 10^{-4}$  mol/l) effects on the bile secretion under conditions of its toxic influence decreasing. We established that plasma reticulum membrane functional disturbances are crucial in the chenodeoxycholic acid induced cholestasis.

Наши попередні функціональні та морфологічні дослідження, проведенні на ізольованій перфузованій печінці щура, виявили, що холестаз, який розвивається після введення в перфузат хенодезоксихолевої кислоти в концентрації  $1,4 \cdot 10^{-4}$  моль/л, супроводжується структурними змінами, характерними для жорстких детергентних впливів – порушенням цілісності каналікулярних мембрани гепатоцитів і розходженням міжклітинних контактів [3]. Водночас з'ясовано, що такі пошкодження виявляються приблизно в 10 % гепатоцитів, інші клітини зберігають структурну цілісність. Це свідчить про те, що основною причиною холестазу є функціональні зміни в гепатоцитах під впливом хенодезоксихолевої кислоти. На порушення функції плазматичних мембрани гепатоцитів указує зниження інтенсивності секреції жовчних кислот у жовчі. Пригнічення гідроксилування дигідроксигікових кислот свідчить про пошкодження функції мембрани ендоплазматичного ретикулуму [4].

З метою оцінити відносне значення порушень функції мембрани ендоплазматичного ретикулуму (мікросомальної ферментної системи) і плазматичних (мембраних транспортерів жовчних кислот) у розвитку холестазу під впливом підвищеної концентрації хенодезоксихолевої кислоти нами було співставлено протективні ефекти на жовчосекреторну функцію фенобарбіталу, індуктора мікросомальної системи, та урсодезоксихолевої кислоти, гепатопротектора, здатного конкурентно захищати мембрани й підсилювати транспорт жовчних кислот з гепатоцитів.

**Об'єкт і методи досліджень.** Дослідження проведені на ізольованій перфузованій печінці щурів масою 220–250 г за методом, описаним раніше [2]. Перфузат об'ємом 400 мл містив поліглюкін, геосен, сольовий розчин Кребса у співвідношенні 0,5:1,5:2. Умови перфузії: температура  $37^{\circ}\text{C}$ , тиск 21 см водн. ст., швидкість руху

перфузату через печінку – 45 мл/хв. Експериментальний холестаз викликали введенням до перфузату хенодезоксихолевої кислоти ( $1,4 \cdot 10^{-4}$  моль/л) у вигляді натрієвої солі. Для вивчення дії хенодезоксихолевої кислоти ( $1,4 \cdot 10^{-4}$  моль/л) на секрецію жовчі в умовах стимуляції системи мікросомального гідроксилування щурам внутрішньоочеревинно вводили фенобарбітал у дозі 2 мг на 100 г маси тіла протягом трьох днів, на далі печінку ізолявали та перфузували. Для оцінки інтенсивності гідроксилування дигідроксигікових кислот визначали інтенсивність секреції з жовчю тригідроксигікових кислот. При дослідженні гепатопротективної дії урсодезоксихолевої кислоти її ( $7 \cdot 10^{-5}$  моль/л) додавали до перфузату за 30 хв до введення хенодезоксихолевої кислоти ( $1,4 \cdot 10^{-4}$  моль/л). Далі перфузію проводили ще 1 год. Об'ємну швидкість секреції жовчі визначали кожні 5 хв; у пробах жовчі, зібраних за 30 хв, визначали концентрацію жовчних кислот [1]. Результати досліджень обробляли статистично з використанням критерію Стьюдента.

**Результати та їх обговорення.** Залежність здатності гідрофобних дигідроксигікових кислот спричиняти холестаз від інтенсивності їхнього гідроксилування в гепатоцитах показали наші попередні дослідження із застосуванням індукції системи мікросомального гідроксилування фенобарбіталом [3]. Через 60 хв після введення хенодезоксихолевої кислоти ( $1,4 \cdot 10^{-4}$  моль/л) у перфузат швидкість секреції жовчі становила 18,1 % від вихідного рівня ( $P < 0,001$ ). Якщо хенодезоксихолеву кислоту застосовували в тій самій концентрації після попереднього триденного введення тваринам фенобарбіталу, замість розвитку холестазу, починаючи з 25-ї хв, секреція жовчі підсилювалася повторно і на 60-й хв перевищувала вихідний рівень на 20 % ( $P < 0,01$ ) (рис. 1, А).

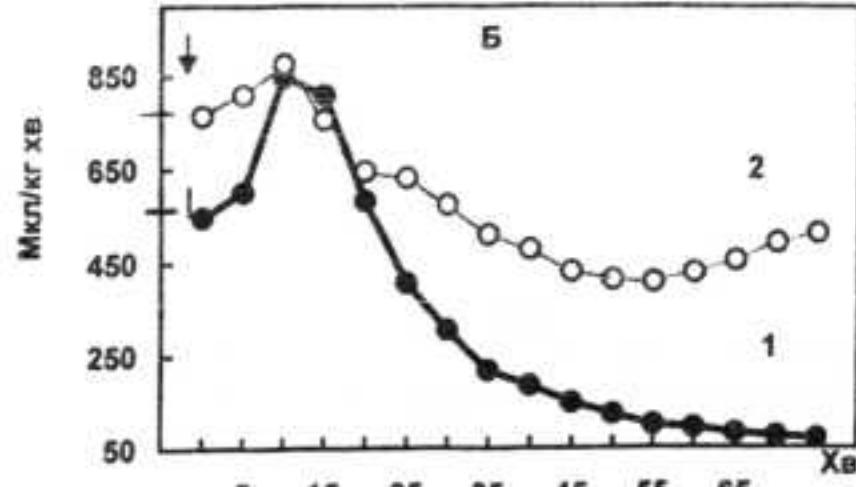
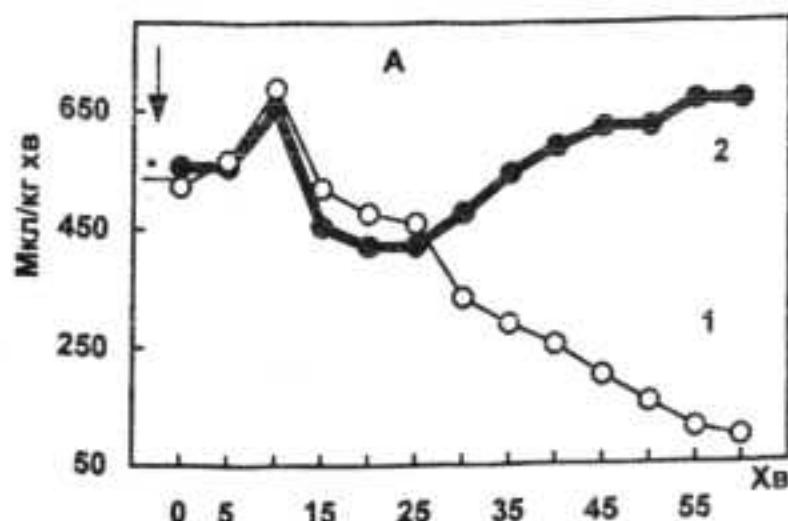


Рис. 1. Динаміка об'ємної швидкості секреції жовчі при введенні хенодезоксихолевої кислоти ( $1,4 \cdot 10^{-4}$  моль/л). А: 2 – після попереднього введення щурам фенобарбіталу; Б: 2 – після попереднього введення в перфузат урсодезоксихолевої кислоти ( $7 \cdot 10^{-5}$  моль/л); 1 – контроль

За цих умов підсилювалася секреція тригідроксиховчних кислот із жовчю (табл. 1). У контролі через 60 хв після введення хенодезоксихолевої кислоти вона складала  $0,27 \pm 0,08$  мкмоль/кг·хв. При перфузії печінки щурів, яким попередньо введено фенобарбітал, рівень секреції тригідроксиховчних кислот достовірно підвищувалися до  $2,59 \pm 0,15$  мкмоль/кг·хв

( $P < 0,001$ ). Це вказує на підсилення гідроксилування хенодезоксихолевої кислоти. Секреція дигідроксиховчних кислот також підсилювалася. У контрольних дослідах у зазначеній проміжок часу вона становила  $0,74 \pm 0,05$  мкмоль/кг·хв, а при перфузії печінки щурів, яким уводили фенобарбітал, через 60 хв вона дорівнювала  $4,29 \pm 0,12$  мкмоль/кг·хв ( $P < 0,001$ ).

**Таблиця 1.** Секреція з жовчу тригідрокси- та дигідроксиховчних кислот (мкмоль/кг·хв) при дії хенодезоксихолевої кислоти ( $1,4 \cdot 10^{-4}$  моль/л) за умов попереднього триденного введення щурам фенобарбіталу та введення в перфузат урсодезоксихолевої кислоти

Секреція жовчних кислот	Умови досліду							
	Фенобарбітал				Урсодезоксихолева кислота			
	Контроль		Дослід		Контроль		Дослід	
	Вихідний рівень	60 хв	Вихідний рівень	60 хв	Вихідний рівень	60 хв	Вихідний рівень	60 хв
Тригідрокси-	0,52 ± 0,07	0,27 ± 0,05	0,59 ± 0,04	2,60 ± 0,21 $P < 0,001$	0,52 ± 0,04	0,76 ± 0,03	2,51 ± 0,08	2,23 ± 0,15 $P < 0,01$
Дигідрокси-	0,31 ± 0,02	0,74 ± 0,02	0,29 ± 0,03	4,29 ± 0,22 $P < 0,001$	0,31 ± 0,02	1,31 ± 0,04	2,41 ± 0,11	2,54 ± 0,03 $P < 0,001$

Підсилення процесів гідроксилування хенодезоксихолевої кислоти та транспорту жовчних кислот у жовчні канальці свідчить про збереження функцій мембрани гепатоцитів, як внутрішньоклітинних, так і каналікулярних.

Дослідження показали, що функціональні ознаки холестазу під впливом хенодезоксихолевої кислоти зменшуються за умов попереднього введення в перфузат урсодезоксихолевої кислоти. Урсодезоксихолеву кислоту використовують у клініці при захворюваннях печінки, зокрема з проявами холестазу [7]. У механізмах її позитивних ефектів припускають відсутність детергентних впливів і захист мембрани від пошкоджувальної дії гідрофобних жовчних кислот [6]. В останні роки при вивчені клітинних і молекулярних механізмів позитивних ефектів урсодезоксихолевої кислоти виявлено її здатність підсилювати секрецію жовчних кислот шляхом впливу на клітинний везикулярний транспорт мембраних транспортерів жовчних кислот та їхнього вбудування в мембрани гепатоцитів [7].

Попереднє введення урсодезоксихолевої кислоти (за 30 хв) модулювало ефект високої концентрації ( $1,4 \cdot 10^{-4}$  моль/л) хенодезоксихолевої кислоти на секрецію жовчі (рис. 1, Б). За цих умов після короткочасної стимуляції секреції жовчі зменшення холеретичної дії хенодезоксихолевої кислоти відбувалося менш інтенсивно, ніж при введенні самої гідрофобної кислоти (контрольні досліди), а надалі секреція жовчі підсилювалася. Об'ємна швидкість секреції жовчі за 60 хв перфузії в цих дослідах зменшувалася на 56 % відносно вихідного рівня,  $P < 0,01$ . У контрольних дослідах через 60 хв після введення хенодезоксихолевої кислоти ( $1,4 \cdot 10^{-4}$  моль/л) у перфузат об'ємна швидкість секреції жовчі знижувалася на 81,9 % ( $P < 0,001$ ).

Секреція тригідроксиховчних кислот і дигідроксиховчних кислот за умов попереднього введення урсодезоксихолевої була наближеною до вихідних значень (табл. 1) і перевищувала контрольні рівні відповідно на  $1,63 \pm 0,05$  мкмоль/кг·хв і  $1,21 \pm 0,03$  мкмоль/кг·хв,  $P < 0,01$ .

Таким чином, отримано більш виразний протективний ефект індуктора мікросомальної ферментної системи – фенобарбіталу (у порівнянні з урсодезоксихолевою кислотою) на процеси секреції жовчі за умов введення хенодезоксихолевої кислоти у високій концентрації. Результати цих досліджень свідчать про існування тісного зв'язку між процесами біотрансформації цієї дигідроксиховчної кислоти та її дією на секрецію жовчі. Вони дозволяють припустити, що процеси гідроксилування хенодезоксихолевої кислоти, як такі, що протікають повільно, можуть бути одними з критичних для розвитку холестатичного стану при накопиченні цієї гідрофобної жовчної кислоти в гепатоцитах. Водночас ці дані підтверджують сучасні погляди щодо ролі в розвитку холестазу мембраних порушень, викликаних підвищеннем вмісту в гепатоцитах гідрофобних жовчних кислот [5; 6; 8].

Весельський С.П., Лященко П.С., Лукьяненко І.А. А. с. N1624322 (СССР) Способ определения желчных кислот в биологических жидкостях. – Опубликовано в Бюл. 4 30.01.91. 2. Есипенко Б.Е., Націк В.И., Синельник О.Д., Чайкоская Л.А. Методика бескровной перфузии изолированной печени крысы // Физiol. журн. АН УССР. – 1981. – Т. 27, № 6. – С. 841–843 3. Карлезо Н.О., Синельник О.Д., Синельник Т.Б. Морфофункциональный стан печінки під впливом хенодезоксихолевої кислоти за умов стимуляції системи мікросомального окиснення // Вісн. Київ. ун-ту ім. Т. Шевченка. Проблеми регуляції фізіологічних функцій. – 2002. – Вип. 8. – С. 12–16. 4. Синельник Т.Б., Синельник О.Д., Весельський С.П., Карлезо Н.О. Вплив фенобарбіталу на ефекти високих доз гідрофобних жовчних кислот на секрецію жовчі // Вісн. Київ. ун-ту ім. Т. Шевченка. Проблеми регуляції фізіологічних функцій. – 2002. – Вип. 8. – С. 16–20. 5. Синельник Т.Б., Синельник О.Д., Рибальченко В.К. Жовчні кислоти в процесах утворення канальцевої жовчі // Фізiol. журн. – 2003. – Т. 49, № 6. – С. 80–93. 6. Neutrop D.M., Mills A.S., McCall J., Hylemon P.B. et al. Conjugates of ursodeoxycholate protect against cholestasis and hepatocellular necrosis caused by more hydrophobic bile salts // Gastroenterology. – 1991. – Vol. 100. – C203–211 7. Trauner M., Boyer J.L. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation // Physiol. Rev. – 2003. – Vol. 83, № 2. – С. 633–671. 8. Trauner M., Meier P.J., Boyer J.L. Molecular pathogenesis of cholestasis // N. Engl. J. med. – 1998. – Р. 165–178.

Надійшла до редакції 17.10.05

УДК 577.245:615.275+578.23.001

Н. Жолобак, канд. біол. наук, Ю. Пенчук, асист.,  
О. Карпов, д-р біол. наук, О. Молчанець, канд. біол. наук

## ОСОБЛИВОСТІ ПРОДУКЦІЇ ІНТЕРФЕРОНІВ У КУЛЬТУРІ КЛІТИН З ВИКОРИСТАННЯМ КОМПЛЕКСНОГО ІНДУКТОРА

**Вивчено вплив праймінгу на біосинтез  $\alpha/\beta$ -інтерферонів культурою клітин ПТП з використанням як індуктора інтерфероногенного молекулярного комплексу дріжджова РНК – тилорон (МК), а також залежність індукційної дії МК від строку зберігання. Отримані дані за вказаними параметрами дозволяють віднести МК до перспективних індукторів, придатних до використання при промисловому отриманні препаратів природних  $\alpha/\beta$ -інтерферонів.**

*A priming influence onto  $\alpha/\beta$ -interferons biosynthesis by PTC culture with the aim of a molecular complex yeast RNA-tilorone (MC) and a dependence of MC inductive effect from storage terms were studied. Obtained results let to assume the MC a perspective inducer for industrial production of natural  $\alpha/\beta$ -interferons*

**Вступ.** Незважаючи на доволі широке використання в клінічній практиці препаратів рекомбінантного інтерферону (ІФН), аналогічні натуральні препарати не втратили свого значення внаслідок наявності у них деяких унікальних фізіологічних властивостей [1]. Тому отримання ІФН природного походження є достатньо актуальним для фармацевтичної промисловості нашої країни. В умовах широкомасштабного виробництва ІФН ефективність його отримання обумовлює вдало підібране поєднане використання тих чи інших клітин-продуцентів і відповідного ефективного індуктора – агента, що стимулює клітини до інтерфероногенезу. У зв'язку з цим актуальним є також пошук і створення принципово нових індукторів синтезу ІФН, які відповідали б максимуму вимог сучасного фармацевтичного виробництва, у першу чергу – таких як дешевизна та спрощена технологія застосування за наявності інтенсивного виходу цільового продукту. Одним з технологічних прийомів, що використовується для підсилення інтерфероногенної дії індукторів є праймінг – попередня доіндукційна обробка клітин препаратами гомологічного ІФН. Ще однією базовою властивістю потенційних препаратів-індукторів є їхня стійкість – здатність зберігати біологічні властивості на протязі тривалого часу [7].

Раніше на деяких клітинних моделях була показана здатність молекулярного комплексу дріжджової РНК з 2,7-біс[2-(діетиламіно-етокси)-флуорен]-9-он дигідрохлоридом (тилороном) викликати продукцію  $\alpha/\beta$ -ІФН на рівні відомих індукторів полірибонуклеотидної природи [2; 4], що дало можливість розглядати його як перспективний технологічний індуктор. Ураховуючи вимоги великомасштабного виробництва до препаратів-інтерфероногенів, важливим було дослідити дію МК у поєднанні з праймінгом, а також тривалість збереження його індукційної здатності, що й склало мету даної роботи.

**Матеріали й методи.** Молекулярний комплекс дріжджової РНК – тилорон (МК) готували згідно з роботою [4]. Його компонентами були: комерційний препарат дріжджової РНК ("Біохімреактив", Латвія) і тилорон гідрохлорид ("Sigma", США). Як препарати порівняння використовували індуктори ІФН poly(I)-poly(C) ("Calbiochem", США) і ларифан (лікарська форма дволанцюгової РНК бактеріофагу f2, Інститут мікробіології ім. А. Кірхенштейна, Латвія).

Оцінку інтерфероногенезу проводили на культурі перешеплюваної лінії тестикулів поросят (ПТП) (НДІ ветеринарії НАСГН України, Київ). Клітини культивували за методикою, описаною у роботі [5] на середовищі 199 з додаванням до них 5–10 % сироватки те-

лят ("Serva"), 25 мМ HEPES, 10 ммол/л глутаміну та антибіотиків – пеніциліну й стрептоміцину (по 100 од./мл кожного) [7].

Праймінг здійснювали, обробляючи культуру клітин за 3 год до індукції препаратом ІФН ("Лаферон", НПК "ФармБіотек", м. Київ) у кінцевій концентрації 12,5 міжнародних одиниць (МО) в 1 мл. Рівень ІФН у зразках культури відповідно до загальноприйнятої методики [7], використовуючи тест-вірус – вірус везикулярного стоматиту штам Індіана в дозі 100 ТЦД<sub>50</sub>. Цитопатичні ефекти вірусів у культурах клітин реєстрували візуально, проглядаючи досліджувані культури у світловому інвертованому мікроскопі "Біолам П-1" (ЛОМО, Росія) при збільшенні 35x та 100x. За титр ІФН брали величину максимального розведення проби, за якої спостерігався 50 %-й захист клітин від цитопатичної дії тест-вірусу. Активність індукованого ІФН розраховували за формулою

$$A_{\text{зр}} = T_{\text{зр}} \times A_{\text{ст}} / T_{\text{ст}}, (\text{МО/мл})$$

де  $T_{\text{зр}}$  – титр ІФН у досліджуваному зразку,  $T_{\text{ст}}$  – титр ІФН стандартного препарату ІФН-α,  $A_{\text{ст}}$  – активність стандартного препарату ІФН-α. Як стандарт використовували препарат "Лаферон" з питомою активністю не менше  $2 \times 10^8$  МО в 1 мг лікарської форми рекомбінантного ІФН людини (НПК "ФармБіотек", м. Київ).

**Результати та їх обговорення.** Промислове виробництво ІФН вимагає як використання індукторів, що дають інтенсивний вихід препарату, так і додаткових методичних операцій, які можуть суттєво стимулювати індукцію ІФН культурах клітин. Феномен праймінгу – попередньої обробки клітин тварин невеликими дозами ІФН, що приводить до підвищення продукції власного ІФН у відповідь на наступну індукцію його синтезу – спостерігається майже в усіх системах клітина – індуктор. Праймінг використовується як спосіб суттєвого збільшення кількості ІФН у відносно малопродуктивних системах. У великомасштабному виробництві  $\alpha$ - і  $\beta$ -ІФН його широко використовують для збільшення виходу кінцевого продукту. Вираженість ефекту праймінгу великою мірою залежить від природи індуктора, що застосовується в тій чи іншій клітинній системі. Результати застосування праймінгу за умов використання МК і стандартних індукторів інтерфероногенезу полінуклеотидної природи наведені в табл. 1.

Таблиця 1. Продукція ІФН культурою клітин ПТП під дією МК та індукторів порівняння

Індуктор	Доза, мкг/мл	Активність ІФН МО/мл	
		Без праймінгу	З праймінгом
МК	25,0	251,2 ± 12,3	421,0 ± 18,1
Ларифан	50,0	323,7 ± 1,51	465,3 ± 11,7
Poly(I)-poly(C)	50,0	319,3 ± 0,63	472,0 ± 16,1
Контроль	0	0	0

Як видно з наведених даних, використання праймінгу як прийому для інтенсифікації інтерфероногенезу в усіх випадках приводить майже до пропорційного збільшення продукції ІФН клітинами лінії ПТП. При цьому вказане явище виявилось характерним для всіх використаних індукторів, включаючи й досліджуваний нами МК. Слід зауважити, що концентрація МК, як і інших індукторів, підбиралася в дослідах у відповідності до їхніх оптимальних співвідношень з клітинами-

продуcentами, за яких спостерігається найбільший інтерфероногенний ефект [2; 4].

Іншим важливим технологічним показником препаратів індукторів є тривалість збереження їхньої специфічної здатності викликати продукцію ІФН. З цією метою було досліджено розчини препаратів МК, які зберігали в морозильному відділенні холодильної камери при температурі  $-5\text{...}-10^{\circ}\text{C}$ . Результати визначення індукційної здатності розчинів МК різного строку зберігання наведено на рис. 1.

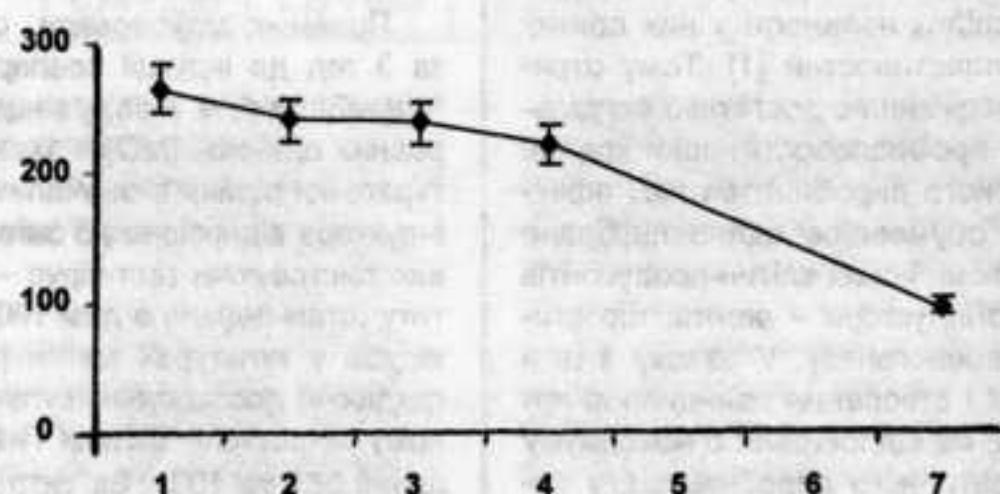


Рис. 1. Інтерфероніндукуюча здатність МК у культурі клітин ПТП залежно від строку зберігання (дані чотирьох дослідів):  
по осі абсцис – строк зберігання МК (рік);  
по осі ординат – активність індукованого ІФН (МО/мл)

З наведених даних видно, що зберігання розчинів препаратів МК на протязі п'яти років веде до 2-3-разового зниження їхньої індукційної активності порівняно зі свіжорозчиненими препаратами. Зберігання готового розчину МК протягом трьох років не приводить до достовірного зниження його інтерфероніндукуючої здатності ( $p>0,05$ ). Судячи з отриманих даних, термін придатності розчинів МК за узагальнених умов зберігання становить 3 роки з моменту виготовлення, після чого спостерігається достовірне падіння їхньої індукційної активності ( $p<0,05$ ). Вірогідну причину поступового зменшення індукторної здатності МК можна віднести на рахунок можливої структурної деградації і, таким чином, втрати відповідних біологічних активностей РНК у розчині [6; 7]. Ймовірно, що дотримання стандартно прийнятих умов зберігання розчинів полінуклеотидних препаратів (зберігання у рефрижераторі при температурі  $-20^{\circ}\text{C}$ ) зумовило б деяко віддаленіше в часі втрату їхньої активності. Оскільки компоненти МК постачаються виробниками в сухому вигляді, для використання МК у промислових умовах можна як готовувати розчини індуктора безпосередньо перед застосуванням і в об'ємах, розрахованих на конкретні технологічні емності для культивування клітин-продуцентів, так

і використовувати готовий розчин, що зберігався не більше трьох років з часу виготовлення.

**Висновки.** За дослідженими параметрами МК позбавлений суттєвих недоліків, які могли б стати на перешкоді його використанню у промислових умовах. Ураховуючи відносно невелику ціну компонентів МК, цей комплекс можна розглядати як перспективний інтерфероноген при широкомасштабному отриманні препаратів  $\alpha/\beta$ -ІФН природного походження. Використання МК може зняти такі проблеми, що мають місце при виробництві  $\alpha/\beta$ -ІФН, як інактивація та очистка від вірусів-індукторів, або ж значні витрати, пов'язані з використанням стандартних розчинів індукторів полінуклеотидної природи.

- Ершое Ф.И., Ноекамский А.С. Интерферон и его индукторы. – М., 1980.
- Жолобак Н.М., Карлов А.В., Рыбалко С.Л. та ін. // Антибиотики и химиотерапия. – 1999. – Т. 44, № 4. – С. 21–24.
- Иммунологические методы исследований / Под ред. И. Лефковитса и Б. Перниса. – М., 1988. – С. 232–240.
- Карлов А.В., Жолобак Н.М. // Антибиотики и химиотерапия. – 1995. – Т. 40, № 5. – С. 20–23.
- Культуры животных клеток / Под ред. Д. Фрешни. – М., 1989.
- Методы исследования нуклеиновых кислот / Под ред. А.Н. Белозерского. – М., 1970.
- Седыхов А.С., Ершое Ф.И., Ноекамский А.С. и др. Индукторы интерферона. – Ташкент, 1978.

Надійшла до редакції 17.10.05

УДК 615.28

О. Радченко, канд. біол. наук, Л. Степура, канд. техн. наук,  
В. Собко, студ.

## ПЕРСПЕКТИВНІСТЬ ЗАСТОСУВАННЯ БЕНЗАЛКОНІУМ ХЛОРИДУ ДЛЯ ВИДАЛЕННЯ БІОПЛІВКИ ТА ІНАКТИВАЦІЇ ПЛАНКТОННИХ КЛІТИН *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

**Катіонні поверхнево-активні речовини відомі як група перспективних дезінфектантів. Але сучасні дезинфікуючі засоби повинні не лише інактиувати планктонні клітини, а й видаляти з поверхні біоплівку. Показано, що бензалконіум хлорид при концентрації 75 мг/л інактивує планктонні клітини *Pseudomonas aeruginosa* CCM Ac-1961 на 99,999 %, але біоплівку видаляє лише на 43 %.**

**Cationic surfactants are known as perspective disinfectants. But modern disinfectants should not only inactivate planktonic cell cultures but also remove biofilm from a surface. It was shown, that benzalkonium chloride in concentration of 75 mg/L inactivated planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* CCM Ac-1961 on 99,999 % but biofilm was removed only on 43 %.**

**Вступ.** У природних умовах більшість мікроорганізмів існує у вигляді біоплівок, які закріплюються на різних поверхнях [3]. Іммобілізовані клітини суттєво відрізняються від планктонних підвищеною резистентністю до антибіотиків, важких металів і хімічних реагентів [10], тому для інактивації мікроорганізмів біоплівки необхідно використовувати дезінфектанти у 2–10 разів вищих концентраціях, ніж для обробки планктонних клітин [7]. Для нового покоління дезінфектантів важливе значення мають не стільки їхні антисептичні властивості, як здатність інгібувати синтез мікробних екзополімерів, що є основою біоплівки, руйнувати біоплівку й видаляти її з поверхні. Це пов'язано з тим, що залишки мертвих клітин на стінках промислового та медичного обладнання полегшуєть адгезію і ріст нової генерації мікроорганізмів [5; 6], а використання токсичних дезінфектантів у високих концентраціях ускладнює очищення стічних вод і шкодить довкіллю [4].

Поверхнево-активні речовини (ПАР) – це велика група синтетичних хімічних речовин, які завдяки дифільній молекулярній структурі здатні концентруватися на міжфазних поверхнях, змінюючи їхні властивості. За характером дисоціації всі ПАР поділяються на аніонні, катіонні, неіоногенні та амфолітні. ПАР широко використовуються в хімічній, нафтопереробній, целюлозно-паперовій, металургійній, приладобудівельній, харчовій, парфумерній, текстильній, поліграфічній, медичній та інших промисловостях як стабілізатори, гідрофобізатори, модифікатори поверхні, емульгатори, диспергатори, піноутворювачі, мині засоби, інгібтори корозії, антистатики [1].

Серед усіх ПАР, що виробляються у світі, найперспективнішою є група катіонних поверхнево-активних речовин (КПАР), які поєднують у собі властивості всіх інших груп ПАР із сильними дезинфікуючими властивостями [9].

Метою даної роботи було вивчення впливу КПАР – бензалконіум хлориду на біоплівку та планктонні клітини *Pseudomonas aeruginosa*, а також оцінка можливості використання дезінфектантів на основі цієї сполуки для дезінфекції промислового й медичного обладнання.

**Об'єкти й методи дослідження.** Дослідження проводилися на культурі *Pseudomonas aeruginosa* CCM Ac-1961 і КПАР – бензалконіум хлорид (фірма "Sigma"). Для визначення впливу дезінфектантів на планктонні клітини до суспензії добової культури в дистильованій воді при кімнатній температурі додавали розчин КПАР до концентрації 7–75 мг/л. Час експозиції становив 10 хв. Кількість бактерій, що вижили, визначали висівом на МПА за методом [9]. КУО/мл підраховували через

48 год інкубації при 32 °C. Частку клітин, що вижили, розраховували за відношенням  $N_t / N_0$ , де  $N_t$  – це число бактерій, які вижили, а  $N_0$  – початкова кількість бактерій, що містилася в розчині КПАР [2]. Як контроль використовували суспензію клітин, розбавлену дистильованою водою без внесення КПАР.

Кількісну характеристику біоплівки визначали за допомогою мікротитраційного методу з барвником кристалічним фіолетовим [8]. Суспензію клітин добової культури у МПБ по 200 мкл вносили в лунки стерильної 96-лункової планшети для імуноферментного аналізу, і культивували 48 год при 32 °C, замінюючи вміст лунок свіжим середовищем через кожні 4 год. Після цього з лунок видаляли культуральну рідину з планктонними клітинами, їх двічі промивали стерильною дистильованою водою і заповнювали їх 200 мкл 0,3 %-го водного розчину кристалічного фіолетового. Барвник витримували протягом 5 хв при 20 °C. Барвник видаляли з лунок, 4 рази промивали їх дистильованою водою і вносили по 150 мкл 96 %-го етанолу. Спирт витримували 5 хв, періодично перемішуючи вміст лунок круговими рухами планшети. Інтенсивність забарвлення етанолу кристалічним фіолетовим, яка залежить від кількості клітин у біоплівці, визначали колориметрично на пристрії "Диагност". Контролями були чистий етанол і розчин барвника в етанолі й лунці з МПБ без клітин. Кожне вимірювання проводили по три рази.

Видалення (редукцію) біоплівки визначали за різницю в даних до взаємодії з КПАР і після 10-хвилинної обробки при 20 °C. Використовували розчини бензалконіум хлориду 25–150 мг/л. Редукцію (%) розраховували за такою формулою [11]:

$$\text{Редукція} = \left[ \frac{(C - B) - (T - B)}{C - B} \right] \times 100\%,$$

де  $B$  – середня абсорбція на лунку для контролю досліду (без біоплівки та дезінфектанту);  $C$  – середня абсорбція на лунку для контролю досліду (біоплівка без обробки дезінфектантом);  $T$  – середня абсорбція на лунку для оброблених дезінфектантом лунок.

Результати оброблялися статистично.

**Результати та їх обговорення.** Було показано, що бензалконіум хлорид має яскраво виражену бактерицидну дію на планктонні клітини *Pseudomonas aeruginosa* CCM Ac-1961. Уже при концентрації 15 мг/л після 10-ти хв контакту кількість життєздатних клітин зменшувалася на 2,7 lg (майже на 99,9 %), при 35 мг/л – на 4 lg (на 99,99 %), а при 75 мг/л – на 5 lg (на 99,999 %) (рис. 1).

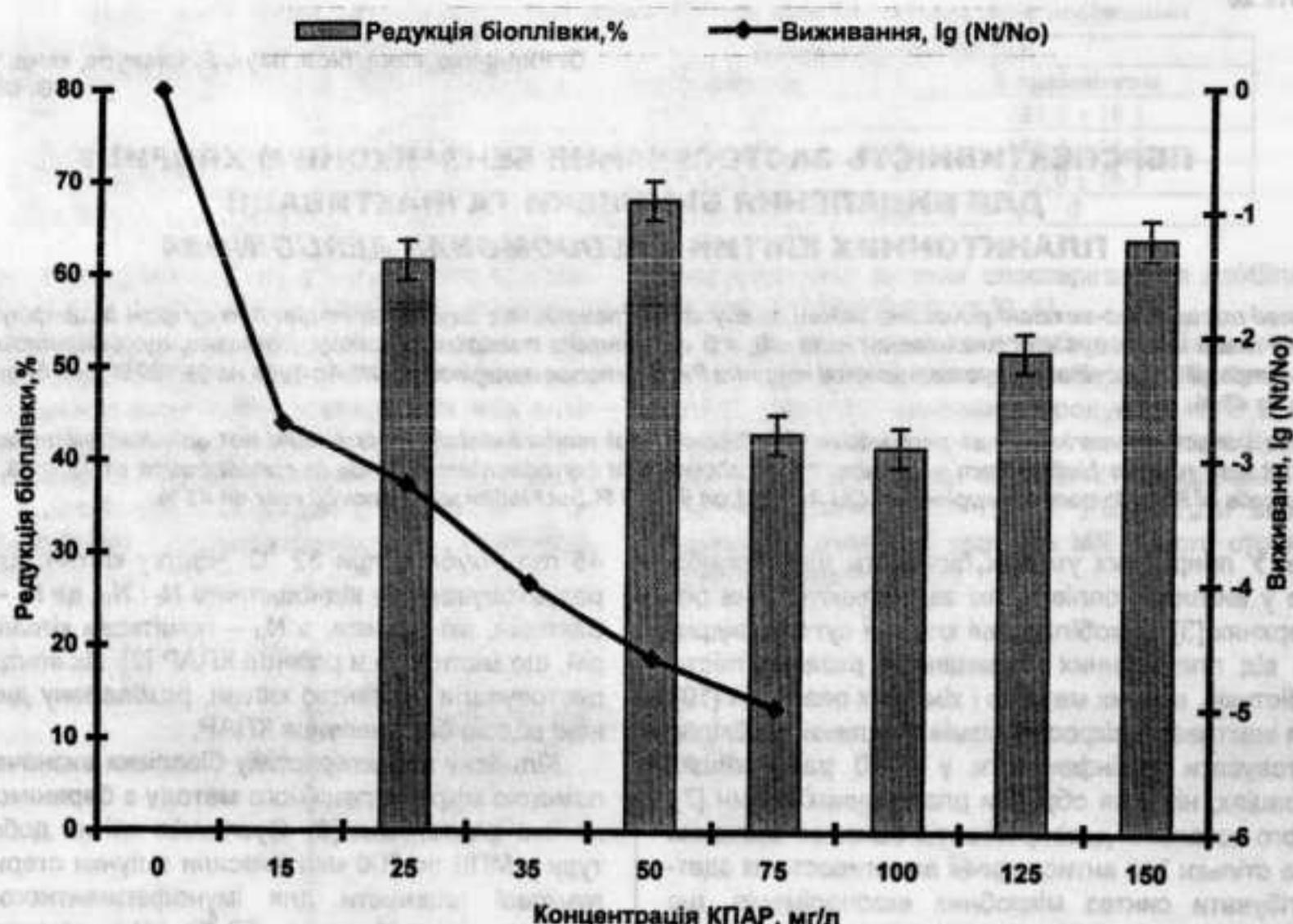


Рис. 1. Вплив бензалконіум хлориду на біоплівку та планктонні клітини *Pseudomonas aeruginosa* ССМ 1961

Редукція біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* ССМ Ac-1961 при концентрації бензалконіум хлориду від 25 до 150 мг/л була неоднозначною. Так, при 25 мг/л вона становила  $61.56 \pm 2.12\%$ , при 50 мг/л –  $67.93 \pm 2.12\%$ . Найнижчі показники редукції біоплівки  $42.95 \pm 4.54$  і  $41.23 \pm 5.95\%$  спостерігали при концентрації дезінфектанту відповідно 75 і 100 мг/л. Подальше збільшення концентрації бензалконіум хлориду не сприяло поліпшенню очищення поверхні від біоплівки. При концентрації КПАР 125 мг/л біоплівка зменшувалася лише на  $51.54 \pm 5.95\%$ , при 150 мг/л – на  $63.67 \pm 4.54\%$ .

Згідно з даними літератури [8] більшість відомих дезінфікуючих засобів не лише інактивують планктонну мікрофлору, а й безпосередньо впливають на біоплівку, видаляючи її з поверхні або вбиваючи мікробні клітини. За допомогою кристалічного фіолетового мі могли визначити лише рівень механічного видалення клітин з поверхні. Таке фарбування не дозволяє робити висновки про фізіологічний стан клітин біоплівки після обробки дезінфектантом. Відомо, що рівень редукції біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* гіпохлоритом натрію становить 38,4–53,6 %, причому прямої залежності між концентрацією дезінфектанту та ступенем видалення біоплівки не спостерігалося. Прийнято вважати, що редукція біоплівки на рівні 40 % є достовірним показником [8].

**Висновки.** Таким чином, було показано, що бензалконіум хлорид у концентрації 75 мг/л є ефективним засобом для інактивації планктонних клітин *Pseudomonas aeruginosa* ССМ Ac-1961 (на 99,999 %). У той же час, видалення біоплівки з поверхні за таких умов не перевищувало 43 %. Прямої залежності між ступенем видалення біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* ССМ Ac-1961 з поверхні та концентрацією бензалконіум хлориду не спостерігалося.

1. Поверхенно-активные вещества: Справочник / Под ред. А.А. Абрамзона, Г.М. Гаевого. – Л., 1979.
2. Потапченко Н.Г., Савлук О.С., Ильиненко В.В. // Хим. и технол. воды. – 1992. – Т. 14, № 12. – С. 935 – 940.
3. Davey M.E., O'toole G.A. // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2000. – Vol. 64, № 4. – P. 847–867.
4. Godfrey D. // Water and Waste Treat. – 1992. – Vol. 35, № 11. – P. 56–57.
5. Le Magre E., Jacqueline L.E., Cazoin J. et al. // Patholog. Biol. – 1993. – Vol. 41, № 4. – P. 364–368.
6. Mario-Ferey K., Pasmore M., Stoodley P. et al // J. of Hospital Infection. – 2003. – Vol. 53. – P. 64–71.
7. Maris P. // Sci. alim. – 1992. – Vol. 12. – P. 721–728.
8. Pitts B., Hamilton M.A., Zelver N., Stewart P.S. // J. of Microbiol. Methods. – 2003. – Vol. 54. – P. 269–276.
9. Takasaki Atsue. // J. Pharmacobio. – 1991. – Vol. 14, № 12. – P. 154–160.
10. Teitzel G.M., Parsek M.R. // Applied and Environmental Microbiology. – 2003. – 69, № 4. – P. 2313–2320.
11. Yauild J.P. // Brit. J. Urol. – 1965. – Vol. 37, № 1. – P. 7–12.

Надійшла до редакції 17.10.05

УДК 0104U000590

О. Танасієнко, канд. біол. наук, Г. Лісовенко, канд. біол. наук,  
Н. Трохименко, асп., Н. Черемшенно, канд. біол. наук,

## ПІДСИЛЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ПРОТИПУХЛИННОЇ ВАКЦИНИ ЗА ДОПОМОГОЮ ПРОБІОТИКІВ

*Показано, що на моделях солідної форми карциноми легенів Льюїс у мишій лінії C57 Bl i саркоми-37 у мишій лінії Balb/c комбіноване застосування протипухлинної вакцини і пробіотиків сприяє ефективнішому пригніченню пухлинного росту та подовженню тривалості життя лікованих тварин, у порівнянні з ізольованим використанням вакцини чи пробіотика.*

*In the models of Lewis lung carcinoma of C57 Bl mice and sarcoma-37 of Balb/c mice it was shown that combined usage of cancer vaccine and probiotics favour to efficient decreasing of tumor growth and to extension of life span of treated animals versus using only the vaccine and probiotics.*

**Вступ.** У терапії онкологічних захворювань доцільно використовувати пробіотики – препарати, які створені для нормалізації мікробіоценозів. Стан дисбактеріозу, з одного боку, знижує імунний контроль за гомеостазом організму, з іншого – підвищує можливість генетичної та епігенетичної трансформації клітин у пухлинні [1], тому включення препаратів, які нормалізують мікроекологічний стан слизових оболонок, у комплексну систему лікування онкохворих обґрунтовано багатьма причинами. Одна з них – те, що препарати на основі живих мікробних культур або продукти їхньої життєдіяльності виявляють імуномодулюючу дію. У літературі, присвяченій пробіотикам, наведено результати аналізу кількісних і якісних змін мікрофлори організму, вплив її на макроорганізм у цілому й зокрема на імунну систему [3–5]. Проте впровадження пробіотиків – імунобіотиків переважає на початковій стадії клінічних випробувань.

Метою дослідження було вивчення ефективності ПВ, одержаних на основі цитотоксичного лектину *B. subtilis* B-7025, на фоні корекції імунологічної реактивності пробіотичною сумішшю *Enterococcus faecium* K-50 і *Saccharomyces cerevisiae* 14K і продуктами їхньої життєдіяльності (фільтратом) [2].

**Об'єкт і методи дослідження.** Досліди проводили на моделі солідної саркоми 37 і метастазуючої карциноми легенів Льюїс (КЛЛ) на 2-місячних мишиах-самках лінії Baib/c і C57Bl масою 18–20 г розведення віварію ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Тваринам прищеплювали у м'яз стегна по  $5,0 \times 10^5$  пухлинних клітин (ПК), або в подушечку кінцівки по  $3,5 \times 10^5$  ПК. Кінцівку з пухлиною видаляли на рівні колінного суглоба під ефірним наркозом у стерильних умовах на 15–20-ту добу після перешеплення, коли діаметр первинної пухлини дорівнював

0,8–1,0 см. Неоперабельні тварини, у яких пухлина перевищувала в діаметрі 1,0 см і проросла в суглоб і стегновий м'яз, були відібрани в окрему групу.

Протипухлинну вакцину (ПВ) уводили мишиам п/ш на наступний після трансплантації ПК день і далі через кожні 3–4 доби (усього 5 ін'єкцій). Пробіотичну суміш і продукти її синтезу (фільтрат) уводили за такою схемою: перші два рази в/ч по 0,25 мл, а 3–5-й рази рег ос по 0,5 мл. Крім того, одна з дослідних груп миши тричі через 2–3 доби отримувала рег ос 0,5 мл пробіотичної суміші або її фільтрату перед прищепленням пухлини.

Експериментальні тварини були розділені на 6 груп: миши I групи одержували ПВ, II та III – разом з ПВ отримували пробіотик або фільтрат, IV і V – тільки пробіотик і фільтрат, VI група миши була контрольною й одержувала фізіологічний розчин по 0,5 мл у відповідний термін.

**Результати та їх обговорення.** Вивчення динаміки розвитку солідної форми саркоми-37 показало, що ріст пухлин у миши, які одержували разом з ПВ фільтрат пробіотичної суміші, значно гальмувався протягом часу спостереження в порівнянні з тваринами, які отримували тільки ПВ. Індекс гальмування росту пухлини у цих миши порівняно з контрольними та тільки вакцинованими становив на 35 добу 96,2 і 48,3 % відповідно.

Для основних показників ефективності лікування – кількості тварин без пухлин і середня тривалість життя (СТЖ) – відмічена така сама закономірність (табл. 1). 50 % миши III-ї групи були без ознак розвитку пухлини на кінець досліду (120 діб), а СТЖ у цій групі була у 2,9 та 1,6 рази вище, ніж у контрольних і вакцинованих тварин відповідно.

Таблиця 1. СТЖ миши із саркомою-37 при комбінованому лікуванні ПВ з пробіотичною сумішшю *Enterococcus faecium* K-50 і *Saccharomyces cerevisiae* 14K та її фільтратом

Групи миши	Кількість миши у групі	Кількість миши без пухлин	СТЖ	P
Вакцина	8	1	$56,9 \pm 10,5$	<0,05*
Вакцина+пробіотик	8	0	$29,8 \pm 0,76$	>0,05
Вакцина+фільтрат	8	4	$91,3 \pm 13,9$	<0,001*
Пробіотик	7	2	$64,2 \pm 15,1$	>0,05
Фільтрат	7	0	$62,8 \pm 14,9$	>0,05
Контроль	10	0	$31,0 \pm 2,4$	-

Отже, комбіноване застосування ПВ і фільтрату пробіотичної суміші культур *Enterococcus faecium* K-50 і *Saccharomyces cerevisiae* викликає затримку росту саркоми-37 і збільшення СТЖ миши, обумовлене синергічним ефектом зазначених препаратів при їх лікуванні. На відміну від цього, при комбінованому застосуванні ПВ і пробіотичної суміші був зареєстрований найгірший результат: уже на 18 добу після трансплантації пухлини розвинулись у 100 % тварин, а СТЖ була на рівні контролю ( $29,8 \pm 0,76$  проти  $31,0 \pm 2,4$  доби). У той же час са-

ма пробіотична суміш гальмувала ріст пухлин порівняно з контрольними мишиами, але збільшення СТЖ тварин виявилася недостовірним.

Наступним етапом наших досліджень було вивчення ефективності комбінованого застосування пробіотичної суміші й ПВ на моделі метастазуючої КЛЛ. Протягом перших 20–22 діб спостерігалось стабільне гальмування росту пухлини: індекс гальмування для I, III, V груп миши становив приблизно 25–40 %, тоді як ріст пухлин у миши II та IV груп був на рівні контрольних тварин.

Підрахунок кількості та об'єму метастазів показав, що у вакцинованих мишей і тих, що одержували ПВ з фільтратом суміші, ці показники були значно меншими, ніж у контрольних тварин (табл. 2). Статистично вірогідними виявилися розбіжності з контролем показників групи мишей, які отримували комбіноване лікування ( $35,6 \pm 11,3$  проти  $4,5 \pm 2,4$   $\text{мм}^3$ ).

**Таблиця 2.** Вплив комбінованого застосування ПВ з пробіотичною сумішшю *Enterococcus faecium K-60* і *Saccharomyces cerevisiae 14 K* та його фільтратом на метастазування мишей з прищепленою КЛЛ

Група	Кількість мишей у групі	Миши без М", %	Кількість метастазів	Об'єм метастазів, $\text{мм}^3$	P
Вакцина	8	25	$6,4 \pm 1,7$	$15,4 \pm 11,8$	>0,05
Вакцина+пробіотик	6	0	$14,8 \pm 5,0$	$84,8 \pm 10,9^*$	>0,05
Вакцина+пребіотик	6	50	$5,5 \pm 2,5$	$4,5 \pm 2,4^*$	<0,05
Пробіотик	5	0	$9,2 \pm 5,3$	$26,3 \pm 12,7$	>0,05
Пребіотик	5	100	0	0*	<0,05
Контроль	7	0	$11,9 \pm 1,7$	$35,6 \pm 11,3$	-

Установлено, що на фоні введення мишам фільтрату пробіотичної суміші ПВ призводить до значного зменшення об'єму метастазів у порівнянні з групою тварин, які одержували тільки ПВ. Застосування фільтрату разом з ПВ у даному випадку підвищує достовірність різниці з контролем до статистично вірогідної на відміну від групи мишей, які одержували тільки ПВ.

**Висновки.** У результаті проведених експериментів установлено властивості пробіотиків підвищувати протиухлину дію вакцини, що дозволяє вважати їх пер-

спективними та доцільними для застосування в терапії злокісних новоутворень.

1. Воробьев А.А., Гершанович М.Л., Петров Л.Н. // Вопр. онкологии. – 2004. – Т. 50, № 3. – С. 361–365.
2. Підгорський В.С., Нагорна С.С., Гавриленко М.М. Пробіотик на основі дрожжів-сахароміцетів : Матеріали. міжнар. наук.-практ. конф., Тернопіль, 20–25 травня 2004 р. – Тернопіль, 2004.
3. Isolauri E., Sutas Y., Kalkaalraa P. et al. // Am. J. Clin. Nutr. – 2001. – Vol. 73. – Р. 444–50.
4. Tahagi A., Matsuzaki T., Saito M. et al. // Carcinogenesis. – 2001. Vol. 22, № 4. – Р. 599–605.
5. Matsuzaki T., Chin J. // Immunol Cell Biol. – 2000. – Vol. 78, № 1. – Р. 67–73.

Надійшла до редколегії 08.06.05

УДК 616.33 + 616.45-001.1/3

Т. Проценко, канд. біол. наук, І. Якубцова, провід. інж.,  
Т. Чурілова, мол. наук. співроб., К. Осипенко, мол. наук. співроб.

## ВПЛИВ ЕКСТРАКТУ НАСІННЯ ФЕНУГРЕКА (*TRIGONELLA FOENUM GRAECUM*) НА ВМІСТ МОНОСАХАРИДІВ ГЛІКОПРОТЕЙНІВ ДУОДЕНАЛЬНОГО СЛИЗУ ЩУРІВ ЗА УМОВ РОЗВИТКУ ВИРАЗКОВОЇ ХВОРОБИ ДВАНАДЦЯТИПАЛОЇ КИШКИ

Досліджено динаміку морфологічних змін слизової оболонки дванадцятипалої кишки за умов виразкоутворення. Установлено, що введення екстракту насіння фенугрека збільшує вміст моносахаридів глікопротеїнів дуоденального слизу при експериментальних виразках дванадцятипалої кишки.

*The dynamics of morphological changes in duodenal mucous were investigated at development ulcer. It was established using extract fenugreek seeds which increased content glycoprotein monosaccharides of duodenal mucous in rats at development of experimental duodenal ulcer.*

Виразкова хвороба – найпоширеніше захворювання органів травлення, яке являє собою не просто локальний виразковий дефект у слизовій оболонці шлунка чи ДПК, а є результатом системного патологічного процесу в організмі людини, що негативно позначається на якості життя хворих. Серед дорослого населення України захворюваність на виразкову хворобу становить 6–10 %, причому дуоденальна локалізація виразки, як правило, переважає над шлунковою, особливо у людей молодого й середнього віку. В останнє десятиліття в Україні значно зросла частота виявлення виразкової хвороби шлунка і ДПК, що пов'язано з несприятливою екологічною ситуацією, дією психоемоційних стресів, радіаційних чинників низької інтенсивності внаслідок аварії на ЧАЕС та іншими факторами [1].

Попередження та лікування гострих ерозивно-виразкових уражень слизової оболонки шлунка і ДПК залишається складною проблемою, незважаючи на широкий арсенал медичних препаратів. Останнім часом у дослідженнях, зв'язаних з рішенням питань практичної медицини, най актуальнішим є напрямок щодо вико-

ристання природних речовин для лікування захворювань різного генезу.

Прикладом такого засобу є екстракт насіння рослини фенугрека, *Trigonella foenum graecum*. Широкий спектр фармакологічної дії фенугрека пояснюється тим, що він містить різноманітні цінні біологічно активні сполуки. Це вуглеводи, здебільшого галактоманоз (45–60 %), білки (20–30 %), ліпіди (5–10 %), холін (0,5 %), слиз (30–40 %), а також флавоноїди, вільні амінокислоти (4-гідроксизолейцин, аргінін, гістидин, лізін), алюміній, калій, кальцій, магній, натрій, кремній, залізо. Крім того, до його складу входять мікроелементи ванадій, марганець і хром, глікозиди, а також вітаміни групи А, В<sub>1</sub>, С, РР та ефірна олія [9]. З великою кількості стероїдів, що є в насінні фенугрека виділені: діосгенін, гітогенін, тигогенін, смілагенін, які сприяють продукції інсулулу та тестостерону.

Фенугрек з давніх часів використовується як протизапальний, жарознижуючий і гіпотензивний засіб. Амінокислота 4-гідроксизолейцин, що входить до складу насіння, регулює рівень глюкози в крові шляхом стиму-

лювання виходу інсуліну, безпосередньо впливаючи на острівці Лангерганса підшлункової залози.

Галактоманози фенугрека можуть легко зв'язуватись із жирами, а тому відіграють важливу роль у зниженні вмісту холестерину й ліpidів у крові.

Активні компоненти фенугрека – сапогенін і діосгенін – пригнічують клітинну проліферацію, злокісний ріст пухлин і викликають апоптоз клітин. Тому екстракт фенугрека вважають новим профілактичним засобом при лікуванні онкозахворювань [15].

До складу фенугрека входить близько 30–40 % слизових речовин, які відіграють важливу роль у захисті слизової оболонки шлунка та кишечнику від ушкоджень. Крім того, екстракт з насіння цієї рослини має антисекреторну дію, а також сприяє зменшенню продуктів ПОЛ шляхом стимулювання активності каталази, тобто посилюючи антиоксидантного потенціалу слизової оболонки шлунка [8].

Фенугрек застосовують для збудження рухової діяльності шлунка й кишечнику. Йому притаманна адаптогенна, стимулююча й тонізуюча дія за рахунок великої кількості алкалоїдів і стероїдних сапонінів. Він зміцнює імунну та репродуктивну системи завдяки флавоноїдам, вітамінам Е, А, С, мінеральним речовинам Mn, Zn, Fe.

Проведені фармакологічні й фітохімічні дослідження свідчать про перспективність розробки лікарських препаратів з фенугрека й доцільність розширення його медичного застосування з лікувально-профілактичною метою.

Попередня експериментальна оцінка впливу екстрактів фенугрека на кислотно-пептичну та мукоїдно-електролітну секрецію є підставою для можливого лікування та профілактики захворювань шлунково-кишкового тракту.

Метою роботи було дослідити вміст глікопротеїнів (ГП) дуоденального слизу у щурів за умов розвитку експериментальної виразки ДПК при введенні екстракту насіння рослини фенугрек.

**Об'єкт і методи досліджень.** Дослідження проводили на нелінійних щурах-самцях масою 180–220 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. За добу до проведення дослідів щурі мали доступ лише до води.

Щурів розподіляли на групи: 1 – контроль; 2, 3 – групи, в яких моделювали дуоденальну виразку протягом першої та восьмої діб; 4-ї групі тварин для корекції дуоденальної виразки вводили фенугрек *reg os* у дозі 1 г/1 кг маси тіла протягом семи діб двічі на день. Щурів 1 та 2 груп декапітували через 24 год, 3 та 4 груп – через вісім діб.

Виразки ДПК викликали пероральним уведенням цистеаміну в дозі 25 мг/100 г двічі за день з інтервалом у 4 год [16].

Для проведення гістологічних досліджень брали ділянку в проксимальному відділі ДПК. Відібрани зразки тканин були оброблені згідно з методичними рекомендаціями [4]. Слиз виділяли за методом Пітрана [6]. Хімічний склад структурних ГП оцінювали за такими параметрами: вміст білка [14], галактози [12], фукози [11], гексозамінів [10] і сіалових кислот [17]. Статистичну обробку проводили, використовуючи *t*-критерій Стьюдента.

**Результати та їх обговорення.** Вивчення морфологічних змін слизової оболонки ДПК через одну добу після введення цистеаміну показало, що на всій досліджені ділянці спостерігається десквамація епітелію ворсинок, який зберігається переважно у криптах, проте й там зазнає дистрофічних змін. Власна пластинка слизової помірно набрякла, дифузно інфільтрована

переважно лімфоцитами. Клітини брунерових залоз помірно дистрофічно змінені. М'язова оболонка набрякла, дистрофічні зміни є в більшості клітин підслизового та міжм'язового сплетень.

Виявлено невеликі ділянки діаметром 250–300 мкм, на яких почали утворюватись виразки. Тут відсутня слизова й майже зруйнована підслизова оболонка. Клітини м'язової оболонки – з вираженими дистрофічними змінами. Мезотелій серозної оболонки на ділянці виразки відшаровується від серозної оболонки.

Дослідження морфологічних змін проксимального відділу ДПК на восьму добу після введення цистеаміну показало, що слизова оболонка ДПК на дослідженій ділянці зазнала деструктивних змін – піддалася ерозії. Виявлено десквамацію епітелію ворсинок, який зберігається частково на бокових поверхнях та в криптах, однак і тут він зазнав дистрофічних змін. Капіляри ворсинок здебільшого порожні, розширені, у деяких місцях капіляри заповнені лімфоцитами та нейтрофільними гранулоцитами. Власна пластинка слизової оболонки дифузно інфільтрована лімфоцитами. Брунерові залози підслизової оболонки перебувають переважно у стані гіперсекреції. Помірно виражені дистрофічні зміни виявлено в міоцитах м'язової оболонки.

На препараті видно ділянку з більш виявленими змінами: епітелій відсутній на поверхні ворсинок і крипт, тобто поверхня оголена; власна пластинка слизової оболонки набрякла, зазнала атрофічних змін; кровоносні судини розкриті, порожні. Клітини брунерових залоз дистрофічно змінені. М'язова оболонка дистрофічно змінена (зміни на тому ж рівні, що й у прилеглих ділянках), проте значно виражені дистрофічні зміни в нервових клітинах підслизового та міжм'язового сплетень. Серозна оболонка збережена, без змін.

Уведення фенугреку після дії цистеаміну вже на восьму добу призвело до значного відновлення уражених ділянок слизової оболонки ДПК, про що свідчить зменшення набряку серозної та м'язової оболонок, відновлення тонусу судин. Площа виразки зменшилася за рахунок тяжів епітеліальних клітин, які покривали зону дефекту.

На сьогодні при вивченні патогенезу виразкової хвороби велике значення надається стійкості слизової оболонки гастродуоденальної системи до пошкоджуючих факторів. Основну роль у захисті слизової оболонки виконує пристінковий слиз, що захищає ДПК від ушкодження патогенними чинниками різного походження. Відомо, що резистентність слизової оболонки ДПК значною мірою залежить від вмісту ГП, які є структурною основою пристінкового шару слизу [2].

Виконання основної функції ГП слизу – утворення слизового гелю – визначається будовою бічних вуглеводних ланцюжків молекули. Ця структурно-функціональна залежність характерна не тільки для ГП слизу, але й для ГП плазматичних мембрани, імуноглобулінів тощо.

За клінічними даними, склад моносахаридів у всіх відділах кишечнику одинаковий: гексозаміни (40–47 %), галактоза (29–30 %), фукоза (21–24 %), сіалова кислота (2,0–2,5 %) [8].

У проксимальному відділі ДПК людини спостерігається найбільший вміст усіх моносахаридів, що в 1,8 раза перевищує їхній вміст в інших відділах. Кількість білка очищеного слизу в усіх відділах ДПК одна, тому відношення суми моносахаридів на 1 мг білка (ступінь глікозилювання) у проксимальному відрізу ДПК також перевищує цей показник у інших відділах у 1,5–1,8 раза.

Проксимальний відділ ДПК найчастіше зазнає агресивного впливу порожнинного вмісту через близькість до шлунку, брунерові залози за своєю будовою і секретом близькі до піlorичних залоз. Мабуть, підвищення ступеня глікозилювання молекули ГП може бути одним з механізмів адаптації структури пристінкового слизу до умов знаходження в її порожнині агресивного вмісту.

За результатами наших досліджень у контрольній групі щурів вміст моносахаридів ГП пристінкового слизу

ДПК був таким: гексозаміни – 33,5 %, галактоза – 55,2 %, фукоза – 10,8 %, сіалова кислота – 0,5 %.

Дослідження показали, що вже на першу добу після введення цистеаміну відбувається значне зниження кількості моносахаридів, які входять до складу ГП дуоденального слизу, у щурів у порівнянні з контролем: фукози – на 79,3 %, галактози – на 50,7 %, N-ацетилнейрамінової кислоти – на 64,5 %, гексозамінів – на 46,2 %.

**Таблиця 1. Вміст моносахаридів глікопротеїнів (мкмоль/мг білка) дуоденального слизу щурів за умов розвитку виразки ДПК**

Умови експерименту	Вміст моносахаридів глікопротеїнів (мкмоль/мг білка)			
	Фукоза	Галактоза	N-ацетил-нейрамінова кислота	Гексозаміни
Контроль	30,7 ± 1,38	10,4 ± 0,38	31,5 ± 1,26	13,4 ± 0,54
Цистеамін (1-ша доба)	6,38 ± 0,25	5,13 ± 0,23	11,2 ± 0,39	7,21 ± 0,18
Цистеамін (8-ма доба)	18,5 ± 0,64*	6,31 ± 0,26	14,7 ± 0,48	2,38 ± 0,11*
Фенугрек+ цистеамін (8-ма доба)	38,3 ± 1,62**	9,2 ± 0,43	23,2 ± 1,15	4,58 ± 0,21**

\* – різниця з контрольною групою статистично достовірна,  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,05$  різниця щодо дослідної групи 3.

Серйозні порушення відмічалися у вмісті фукози та N-ацетилнейрамінової кислоти, що зумовлено їхнім термінальним положенням у молекулах ГП. Саме сіалові кислоти відповідають за загальний негативний заряд клітинної поверхні. До того ж, фукоза та сіалові кислоти відіграють важливу роль у забезпеченні взаємодії між молекулами ГП і формуванні гелевої структури пристінкового слизу [5].

Утворення гелю залежить від концентрації ГП. Дія цистеаміну призводить до зміни структури молекул ГП, порушення нековалентних зв'язків, тобто гель втрачає в'язкість. Це спричинює модифікації міжклітинних взаємодій, у результаті чого змінюються адгезивні властивості, стан мембраних рецепторів, активність мембраноз'язаних ферментів і відбувається посилення чутливості білків до дії протеолітичних ферментів [3].

Отримані нами дані збігаються з результатами досліджень інших авторів, в яких було показано, що при пероральному введенні цистеаміну щурам в ульцерогенний дозі 300 мг/кг спостерігалася ішемія слизової оболонки ДПК, що привело до значного зниження вмісту ГП пристінкового слизу [13].

Нашиими дослідженнями показано, що на восьму добу спостерігається незначне підвищення кількості моносахаридів порівняно з показниками, які були отримані в першу добу, особливо фукози – на 65,5% та N-ацетилнейрамінової кислоти – на 23,8 %, що можна пояснити частковою фізіологічною регенерацією клітин слизової оболонки.

Відомо, що бокові вуглеводні ланцюги ГП шлункового слизу захищають поліпептиди від протеолізу та дії кислотно-пептичного чинника, а також обмежують проникнення макромолекул, включаючи бактеріальні токсини, до клітин епітелію [5].

Отже, установлене збільшення кількості моносахаридів свідчить про підвищення захисної властивості слизової оболонки. Зростання вмісту галактози й фукози, яка надає ГП гідрофобності та захищає їхню білкову частину від дії пептидгідролаз, указує на збільшення цитопротективних властивостей слизу [2].

У тварин 3 групи кількість моносахаридів у середньому була на 35 % меншою в порівнянні з контролем, що вказує на наявність запального процесу в слизовій оболонці ДПК. Тобто, за дії цистеаміну відбувається

суттєве зниження вмісту моносахаридів дуоденального слизу, що свідчить про недостатність компенсаторно-пристосувальних процесів у слизовій оболонці ДПК щурів, що є необхідним для повного загоєння виразкового дефекту.

Отримані результати є свідченням того, що при експериментальній виразці ДПК у щурів відбуваються біохімічні зміни в будові олігосахаридних ланцюжків ГП пристінкового слизу, які приводять до порушення бар'єрної функції слизового шару.

Уведення фенугрека протягом семи діб щурам з виразковою хворобою ДПК значно збільшило кількість моносахаридів у порівнянні з 3 групою тварин, які фенугрек не отримували. При цьому кількість фукози підвищилась на 51,7 %, галактози – на 31,4 %, гексозамінів – на 48 %, N-ацетилнейрамінової кислоти – на 36,6 %. Проте в цілому ці показники були дещо нижчими в порівнянні з контролем.

На основі аналізу отриманих даних про збільшення кількості моносахаридів під впливом фенугреку, за умов цистеамінової моделі виразки ДПК, можна зробити висновок, що він сприяє зниженню рівня запального процесу, а також прискоренню загоєння виразкового дефекту. Такий ефект фенугреку, можливо, пов'язаний зі зменшенням деградації слизового шару та збільшенням мукоїдної секреції.

Отже, дані літератури та результати наших досліджень щодо застосування фенугрека при лікуванні виразкової хвороби ДПК свідчать про широкий спектр фармакологічної дії та дозволяють розширити межі його застосування в медицині.

**Висновки.** 1. Під дією цистеаміну відбувається зменшення кількості моносахаридів ГП дуоденального слизу, яке призводить до порушення бар'єрної функції слизового шару, що корелює з деструктивними змінами слизової оболонки в проксимальному відділі ДПК.

2. Уведення екстракту насіння фенугрека призводить до збільшення вмісту моносахаридів ГП дуоденального слизу, що пов'язане з підвищенням резистентності слизової оболонки ДПК.

3. Отримані результати дають підставу для подальшого комплексного дослідження впливу активних компонентів фенугрека на біохімічні процеси з метою визначення молекулярних механізмів його дії.

1. Голубчиков М.В. // Сучасна гастроентерологія і гепатологія. – 2000. – № 1. – С. 17–20. 2. Железная Л.А. // Рос. журн. гастроентерол., гепатол., колопроктол. – 1998. – Т. 8, № 1. – С. 30–41. 3. Ивашкин В.Т., Лапина Т.Л. // РМФК. Болезни органов пищеварения. – 2001. – Т. 5, № 2. – С. 54–60. 4. Липпи Р. Патологическая техника и практическая гистохимия. – М., 1969. 5. Мак-Нелли П.Р. Секреты гастроэнтерологии. – М.; СПб., 2001. 6. Питран Б.В., Амлавин А.Б., Аксита М.Р. и др. // Мембранные процессы пищеварения и всасывание. – Рига, 1986. 7. Прокопчук Ю.В. // Одесский мед. журн. – 2003. – № 1. – С. 100–102. 8. Харченко Н.В., Анохина Г.А., Опанасюк Н.Д. Клиническая гастроэнтерология. – К., 2000. 9. Basch E, Ulbricht C, Kuo G. et al. // Altern. med. rev. – 2003. – P. 8–20. 10. Boas N. F. // J. biol. chemistry. – 1953. – Vol. 204, № 2.

– P. 553–553. 11. Dische Z, Shettles L. // J. biol. chemistry. – 1948. – Vol. 175, № 2. – P. 595–603. 12. Handel D, Kittlak W. // Z. med. labor. techn. – 1963. – № 4. – S. 163–169. 13. Kurebayashi Y, Asano M, Hashizume T, Akashi A. // Arch. int. pharmacodyn. ther. – 1995. – Vol. 276, № 1. – P. 152–162. 14. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // J. biol. chem. – 1951. – Vol. 193, № 2. – P. 265–275. 15. Sur P, Das M, Gomes A. // Phytother. res. – 2001. – № 15. – P. 257. 16. Szabo S, Goldberg I. // Scand. J. gastroenterol. – 1990. – Vol. 174. – P. 1–8. 17. Wanzen // J. biol. chemistr. – 1959. – Vol. 234, № 8. – P. 1971–1975.

Надійшла до редколегії 02.02.05

УДК 581.1: 581.2: 581.137.3: 576.3

В. Ємельянов, канд. біол. наук, Д. Ноздренко, канд. біол. наук

## ЗМІНИ ЦИТОПЛАЗМАТИЧНОЇ КОНЦЕНТРАЦІЇ $Ca^{2+}$ У КЛІТИНАХ ТОМАТІВ

**Розроблено метод завантаження флуоресцентного зонду Indo-1 у клітини томатів. Уперше досліджено зміни концентрації цитоплазматичного кальцію за допомогою Indo-1.**

**To measure changes in cytosolic calcium concentration the tomato protoplasts were obtained and conditions for loading of fluorescence probe Indo-1 under low pH were optimized. Changes in  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  in elicitor-treated cells were determined.**

**Вступ.** Підвищення концентрації іонів кальцію в цитоплазмі рослинних клітин є однією з найранніших захисних реакцій на інфікування, обробку біотичними еліситорами або на механічне пошкодження.  $Ca^{2+}$  діє як внутрішньоклітинний вторинний месенджер при сприйманні широкого спектра зовнішніх сигналів і формуванні реакцій-відповідей. Хоча  $Ca^{2+}$  бере участь у регуляції деяких фундаментальних клітинних процесів (руху цитоплазми, тропізмів, клітинної диференціації, фотоморфогенезу, імунних і стресових реакцій), механізми, за допомогою яких він контролює ці процеси, ще недостатньо з'ясовані. Підвищення цитоплазматичної концентрації кальцію ( $[Ca^{2+}]_{cyt}$ ) у відповідь на різноманітні сигнали може бути зумовлене закачуванням  $Ca^{2+}$  з апопласту. Іншим джерелом підвищення його концентрації можуть бути внутрішньоклітинні депо, зокрема ЕПР, вакуоль, мітохондрії, хлоропласти. Імовірно, участь того чи іншого зовнішньо-або внутрішньоклітинного джерела  $Ca^{2+}$  у формуванні кальцієвого струму залежить від типу сигналу та виду рослинної клітини. Дослідження з використанням трансгенних рослин та інгібіторного аналізу дозволили встановити, що різні сигнали викликають підвищення  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ , яке зумовлене його надходженням з різних депо [5].

Для виміру внутрішньоклітинної концентрації кальцію зараз використовують дві форми нових флуоресцентних зондів, кальцієвих сенсорів: кальцієчутливі зонди та кальцієзв'язувальний фосфопротеїн екворін. Вони є дуже інформативні для дослідження змін  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  у клітинах, оскільки не викликають побічних ефектів на нормальну функціонування клітин. При введенні їх у цитоплазму клітин не спостерігали ніяких деструктивних процесів [11].

Для дослідження кількісної, часової і просторової локалізації кальцію в рослинних клітинах найчастіше використовують  $Ca^{2+}$ -зв'язувальні флуоресцентні зонди. Одна частина такого зонду має селективний  $Ca^{2+}$ -зв'язувальний центр, змодельований за типом ЕГТА, а інша являє собою флуоресцентний хромофор.

Флуоресцентні зонди дозволяють реєструвати зміни внутрішньоклітинної концентрації іонів  $Ca^{2+}$  на рівні окремих клітин, не пошкоджуючи їх [12]. Зонди мають більш високу селективність щодо іонів кальцію, ніж до магнію, і константу дисоціації, близьку до біологічних рівнів концентрації  $Ca^{2+}$  [8; 13]. Для виміру цитоплазматичної концентрації кальцію в клітинах тварин викорис-

товують ацетоксиметильовані (-AM) зонди, які розщеплюються неспецифічними естеразами та перетворюються в полікарбоксилатні аніони, здатні зв'язувати іони кальцію. При використанні флуоресцентних зондів у рослинних клітинах -AM форми не переходят у кальцієчутливу форму внаслідок відсутності внутрішньоклітинних естераз [7], тому виникає необхідність розробки спеціальних методів для введення флуоресцентних зондів у цитоплазму.

Свого часу був запропонований метод вбудовування зондів при низьких значеннях pH середовища [6]. Метод базується на тому, що при pH, нижчих за рК зондів, карбоксильні групи зондів знаходяться в протонованому стані, і зонди в нейтральній формі дифундують через плазматичну мембрну. У цитоплазмі, де значення pH близькі до 7.0, протони дисоціюють і зонди переходят у стабільний активний стан. Завдяки застосуванню цього методу було визначено внутрішньоклітинні концентрації іонів кальцію в кількох об'єктах [1; 12].

Найпростіші вимірювання  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  проводять на суспензії протопластів [1; 2]. Реєстрація флуоресценції зондів виконується на спектрофлуориметрах. При проведенні таких досліджень виникають певні труднощі. Унаслідок гетерогенності клітинної суспензії вимірюють усереднене значення  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ . Працюючи в однохвильовому режимі важко враховувати зростання  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  унаслідок витікання зонду з клітин. Значно кращих результатів можна досягти при роботі у двохвильовому режимі, вимірюючи флуоресцентне співвідношення  $\Delta\text{I}_{\text{max}}/\Delta\text{I}_{\text{min}}$  інтенсивностей [8; 9].

**Об'єкт і методи дослідження.** Для отримання протопластів томатів було проаналізовано 10 модифікацій ферментних сумішей, які складалися з комбінації різних концентрацій п'яти ферментів, осмотиків і мікроколей. Кінцевий склад ферментної суміші вміщував такі компоненти: целюлаза – 0,5 %, мацерозим – 0,5 %, дрицелаза – 0,25 %, целюлізин – 0,25 %, пектоліаза – 0,25 %, маніт – 0,5 моль/л гліцин – 0,1 моль/л,  $MgCl_2$  – 0,005 моль/л,  $CaCl_2$  – 0,0001 моль/л. Інкубацію клітин проводили протягом 18 год при 25 °C у темряві. Після цього починали процедуру виділення протопластів.

Ферментну суміш і клітини, які містяться в ній, розливали у 2 пробірки й центрифугували 5 хв при 100 г. При цьому життєздатні клітини осаджувалися. Обережно відбирали супернатант і додавали до клітин по 4 мл 0,45 моль/л розчину сахарози, в якому було 5 ммоль/л

$MgCl_2$  та 1 мілімоль/л KCl. Клітини ретельно перемішували й на отриману суміш нашаровували по 1 мл буфера для завантаження флуоресцентного зонду WSZ (сахароза – 0,2 мілімоль/л, манітол – 0,5 мілімоль/л,  $MgCl_2$  – 0,005 мілімоль/л, KCl – 0,001 мілімоль/л, диметилглутарова кислота – 0,015 мілімоль/л, pH 4,6). Пробірки витримували 20–30 хв при кімнатній температурі. Життєздатні протопласти піднімалися на межу поділу двох розчинів і утворювали ланцюжок. Ланцюжок протопластів обережно відбирали пастерівською піпеткою й додавали в розчин для завантаження флуоресцентного зонду, кінцевий об'єм доводили до 1 мл і в подальшому проводили процедуру завантаження зонду Індо-1 у клітини.

Зонд у протопласти завантажували при низьких значеннях pH [6]. До протопластів, які були в буфері WSZ, додавали 20 мілімоль/л флуоресцентного зонду. Клітини витримували в термостаті при температурі 25 °C протягом 2 год.

Після завантаження зонду протопласти томату відмивали від його залишків триразовим центрифугуванням (200g, 5 хв) у безкальцієвому буфері WSI (сахароза – 0,2 мілімоль/л, манітол – 0,5 мілімоль/л,  $MgCl_2$  – 0,005 мілімоль/л, KCl – 0,001 мілімоль/л, Mes – 0,01 мілімоль/л). Відмивання проводили, поступово підвищуючи рівень pH від 4,6 до 5,5. При першому відмиванні використовували буфер WSI (pH 4,9). Друге відмивання проводили в буфері WSI (pH 5,1), а третє – WSI (pH 5,3). Клітини залишали в буфері WSI з проміжними значеннями pH протягом 10–15 хв. Після цих маніпуляцій протопласти томатів поміщали в буферне середовище WSI (pH 5,5) для подальшого вимірювання флуоресценції Індо-1 у клітинах. Перед вимірюванням проводили поступове додавання в буфер з протопластами 1,2 мілімоль/л розчину  $CaCl_2$ .

Цитоплазматичну концентрацію іонів  $Ca^{2+}$  у сусpenзії протопластів томатів визначали на спектрофлуориметрі СДЛ-2 ("Ломо", Росія). Флуоресценцію зонду Індо-1 реєстрували при двох довжинах хвиль (410 і 495 нм) в ультрафіолетовій області. Вимірювали флуоресценцію стаціонарного стану клітин, а також максимальну та мінімальну насиченість протопластів іонами кальцію [8].

Для максимального насичення зонду іонами кальцію до сусpenзії протопластів томату додавали 10 мілімоль/л дигітоніну, який індукував механічні пошкодження плазматичної мембрани. Це дозволяло зовнішньоклітинним іонам  $Ca^{2+}$  без перешкод потрапляти в клітини.

На наступному етапі для визначення флуоресценції безкальцієвої форми Індо-1 до протопластів томатів додавали 5 мілімоль/л ЕГТА, який зв'язував увесь  $Ca^{2+}$ , що був у буферному розчині. Для визначення аутофлуоресценції клітин в експериментальний буфер з протопластами додавали 20 мілімоль/л водного розчину  $Mn^{2+}$ . Такої кількості марганцю достатньо для повного інгібування флуоресценції Індо-1 у клітинах томатів. Вимірювання флуоресценції після додавання розчину марганцю дозволило визначити рівень аутофлуоресценції в протопластах томату. Результати флуоресцентного співвідношення насиченої, стаціонарної та безкальцієвої форм зонду Індо-1 дозволили визначити вміст  $[Ca^{2+}]$  у клітинах томатів.

Концентрацію цитоплазматичного кальцію розраховували за формулою Гринкевича [8], яка дозволяє визначати співвідношення флуоресценції при двох довжинах хвиль і отримати концентраційні показники вмісту кальцію в клітинах:

$$[Ca^{2+}] = kd[(R - R_{min}) / (R_{max} - R)] (F_{min}/F_{max}),$$

де  $kd$  – константа дисоціації іонів кальцію в розчині, що становить 250 нм;  $R_{max}$  – флуоресцентне співвідношен-

ня для Indo-1 в насиченому  $Ca^{2+}$  стані;  $R_{min}$  – флуоресцентне співвідношення для Indo-1 в безкальцієвому стані;  $R$  – флуоресценція експериментального зразка;  $F_{min} / F_{max}$  – відношення інтенсивностей флуоресценції безкальцієвої та насиченої кальцієм форм Indo-1 при 495 і 410 нм відповідно.

Вітальність протопластів оцінювали за наступною методикою: 50 мкл сусpenзії протопластів томатів поміщали на предметне скло й додавали 5 мкл барвника Еванса блакитного. Через 2 хв відбирали самплером 20 мкл сусpenзії клітин і поміщали до камери Горяєва. Підраховували кількість забарвлених (загиблих) і незабарвлених (життєздатних) протопластів.

Результати та їх обговорення. Для завантаження флуоресцентного зонду Indo-1 у протопласти томатів використовували буферне середовище WSZ. Як було зазначено вище, флуоресцентний зонд Indo-1 надходить у клітини лише при низьких значеннях pH (4,4–4,7). Але в разі різкого перепаду значень pH (від 0,4 і вище) кількість життєздатних клітин уже через 5 хв становила лише 15–20 %, а через 60 хв не залишалось жодного життєздатного протопласта. Основними критеріями, які б задовольнили наші вимоги, були: невеликий час завантаження зонду, достатня кількість життєздатних клітин і величина флуоресценції клітин. Для досягнення цієї мети проводили поступові зміни pH на 0,2–0,3 з часовим інтервалом 10–15 хв. Такі проміжки часу дозволяли клітинам стабілізуватися та пристосуватися до нових значень pH. Кількість життєздатних протопластів при максимально кислому значенні pH (4,6) у даній модифікації складала 85–90 %. Цей результат був цілком прийнятний для проведення подальших досліджень.

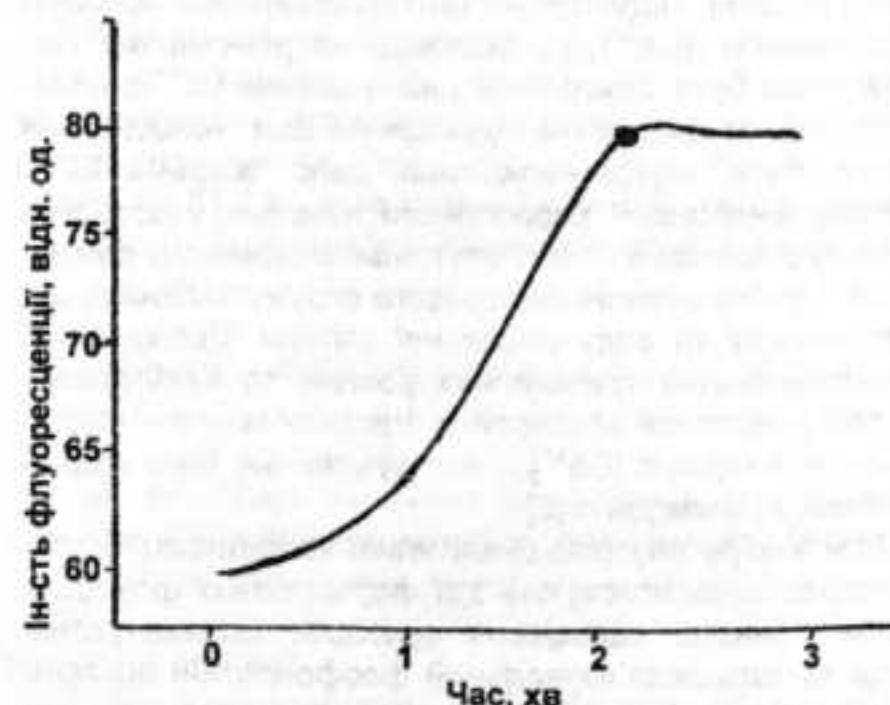


Рис. 1. Надходження Indo-1 у протопласти томатів

Через 2 год протопласти томатів були повністю завантажені зондом. Після цього клітини тричі відмивали від залишків зонду, який був присутнім у буфері WSI, безкальцієвим буфером WSI. Відмивання проводили, поступово підвищуючи рівень pH до 5,5.

Для визначення концентрації цитоплазматичного кальцію протопласти томату поміщали в безкальцієвий буфер WSI та поступово додавали до нього 1,2 мілімоль/л розчину  $CaCl_2$ . Виявилось, що пік флуоресценції стаціонарного стану протопластів томатів знаходиться в області 450 нм. Після цього проводили реєстрацію спектра емісії насиченої та безкальцієвої форм зонду Indo-1 у клітинах.

Перед розрахунком цитоплазматичної концентрації іонів кальцію в протопластиах томатів за формулою Гринкевича [6], віднімали величину аутофлуоресценції клітин.

Одержані нами дані свідчать, що концентрація цитоплазматичного кальцію в протопластиах томатів становить  $306 \pm 12$  нМ,  $n = 10$ .

Зміни  $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$  індукували біотичним еліситором – хітозаном, який був приготований за методом Кауса [10]. Додавання до суспензії протопластів томатів хітозану в концентраціях 0,5–2,0 мг/г клітин викликало істотні зміни  $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$  (рис. 2).

Максимальне підвищення концентрації цитоплазматичного кальцію спостерігалось у відповідь на обробку хітозаном у концентраціях 1,5 та 2,0 мг/г клітин. Після обробки клітин хітозаном у концентрації 1,5 мг/г клітин рівень  $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$  підвищувався до 386 нМ, а після обробки хітозаном у концентрації 2,0 мг/г клітин становив 383 нМ. Подальше збільшення концентрації хітозану не призводило до підвищення рівня цитоплазматичного кальцію в клітинах томатів.

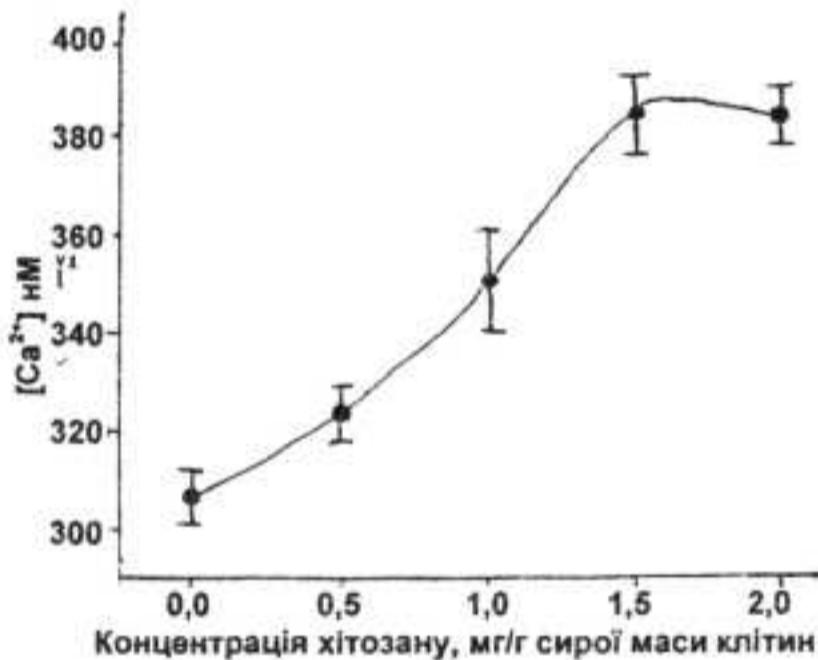


Рис. 2. Зміни внутрішньоклітинної концентрації іонів  $Ca^{2+}$  відповідь на обробку хітозаном

УДК 581.1: 581.2: 581.137.3: 576.3

**Висновки.** Таким чином, нами було вперше досліджено кількісні зміни  $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$  у клітинах томатів у відповідь на обробку біотичними еліситорами за допомогою флуоресцентного зонду Indo-1. Виявилось, що через 2 хв після додавання біотичного еліситору – хітозану до протопластів томату відбувається підвищення рівня цитоплазматичного кальцію в діапазоні концентрацій від 306 до 386 нМ.

Підвищення рівня цитоплазматичного кальцію у відповідь на еліситацию відбувається практично повністю за рахунок периплазматичного пулу кальцію та є вкрай необхідним для індукції захисних реакцій у рослинних клітинах [3].

Розроблений метод дозволяє проводити аналіз залежностей активації імунних реакцій, зроблений у передніх роботах [3; 4], від змін концентрації цитоплазматичного кальцію, викликаних обробкою клітин томатів еліситорами. Вивчати механізми індукції захисних реакцій у клітинах томатів і визначати роль кальцієвої сигнальної системи в захисті рослин від патогенних мікроорганізмів. Це допоможе розробляти ефективні методи захисту культурних рослин при дії на них стресових факторів різної природи, що сприятиме збільшенню та збереженню врожаю.

1. Бияшева А.Е., Молотковский Ю.Г. // Физiol. растений. – 1990. – Т. 37, № 3. – С. 602–607.
2. Дячок Ю.В., Дмитриев А.П., Гродзинский Д.М. // Физiol. растений. – 1997. – Т. 44, № 3. – С. 385–391.
3. Емельянов В.И., Кравчук Ж.Н. // Вісн. Дніпропетр. ун-ту. – 2001. – Вип. 9, № 2. – С. 235–241.
4. Емельянов В.И., Дмитриев О.П., Гродзинский Д.М. // Доп. НАН України. – 1999. – № 11. – С. 156–158.
5. Blume B., Numberger T., Nass N., Scheel D. // Plant Cell. – 2000. – Vol. 12. – P. 1425–1440.
6. Bush D.S., Jones R.S. // Cell Calcium. – 1987. – Vol. 8. – P. 455–472.
7. Cork R.J. Molecular and Cellular Aspects of Calcium in Plant Development. – N.Y., 1986. – P. 371–387.
8. Gryeniewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. // J. biol. chem. – 1985. – Vol. 260. – P. 3440–3450.
9. Hodick D., Gilroy S., Fricker M.D., Trewavas A.J. // Bot. acta. – 1991. – Vol. 104. – P. 222–228.
10. Kauss H. // Membranes: Specialized Functions in Plants. – Guildford, UK, 1996. – P. 77–92.
11. Knight M.R., Read N.D., Campbell A.K., Trewavas A.J. // J. cell biol. – 1993. – Vol. 121. – P. 83–90.
12. Lynch J. // Plant physiol. – 1989. – Vol. 98. – P. 1271–1274.
13. Mintz A., Kao J.P., Tsien R.Y. // J. biol. chem. – 1989. – Vol. 264. – P. 8171–8178.

Надійшла до редколегії 16.12.05

В. Ємельянов, канд. біол. наук, В. Семенець, асп.,  
Д. Ноздренко, канд. біол. наук

## УЧАСТЬ КАЛЬЦІЄВОЇ СИГНАЛЬНОЇ СИСТЕМИ В ІНДУКОВАНОМУ НАКОПИЧЕННІ КАЛОЗИ ТА ЗРОСТАННІ ХІТИНАЗНОЇ АКТИВНОСТІ У КЛІТИНАХ ТОМАТИВ

Досліджено роль кальцієвої сигнальної системи в індукованому зростанні хітиназної активності та синтезі калози в культурі клітин томатів. Показано провідну роль периплазматичного пулу кальцію в індукуванні вивчених реакцій.

The role  $Ca^{2+}$ -signaling system in callose accumulation and increasing of chitinase activity in tomato cells. The inhibitor analysis evidence that calcium signaling system takes active part in signal transduction for induction of two defense responses – callose synthesis and an increase of chitinase activity. The intracellular calcium ions play prime role in realization of this defence responses.

**Вступ.** Клітини здатні підтримувати свій гомеостаз завдяки властивості вибірково розпізнавати позаклітинні речовини. Це можуть бути гормони, медіатори клітинного метаболізму, пептиди, низькомолекулярні метаболіти, а також еліситори – хімічні й фізичні агенти мікроорганізмів. Патогенні мікроорганізми або їхні еліситори індукують у рослинній клітині каскад захисних реакцій задовго до того, як стійкість або сприйнятливість проявляється повною мірою [1].

Трансдукція сигналу в середину клітини для реалізації реакцій фітоімунної відповіді забезпечується сигнальними системами. Дослідження сигнальних систем у рослин сьогодні є "гарячою точкою" фітоімунітету тому, що вони визначають ранній потік реакцій-відповідей рослин, які призводять до сумісної (розвиток хвороби) або несумісної (стійкість) взаємодії з патогеном. Функцією таких систем є передача й підсилення сигналу після розпізнавання [10; 11]. Існує принаймні сім сигнальних систем, які можуть передавати й підсилювати

сигнал після розпізнавання патогену або його еліситорів [4] – циклоаденілатна, фосфатидилкислотна, ліпоксигеназна, НАДФН-оксидазна, NO-синтазна, МАР-кіназна та кальцієва. Підвищення концентрації іонів кальцію в цитоплазмі є однією з найбільш ранніх реакцій. Результати досліджень останніх двох десятиріч [2; 7] показують, що  $\text{Ca}^{2+}$  діє як універсальний внутрішньоклітинний месенджер при сприйманні широкого спектра зовнішньоклітинних сигналів у формуванні реакцій-відповідей. Такі сигнали, як світло, гормони, гравітація, механічний тиск, вітер, холод, окиснювальний стрес і грибні еліситори викликають тимчасове збільшення цитоплазматичної концентрації іонів кальцію ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ ) [7; 12]. Механізми, за допомогою яких він контролює всі ці процеси, ще недостатньо з'ясовані. Найпростішим способом вивчення сигнальних систем є інгібіторний аналіз. Верапаміл – блокатор потенціалзалежних кальцієвих каналів – інгібує індуковане еліситором накопичення фітоалексинів у клітинах моркви [12], але не впливає на утворення фуранокумаринових фітоалексинів в оброблених еліситором клітинах петрушки [8].

Наявність даних стосовно участі або неучасті кальцієвої сигнальної системи в індукції окремих захисних реакцій у різних рослинних клітинах зумовила дослідження цих іонів у реакціях-відповідях в об'єкті наших досліджень – культурі клітин томатів. У проведених нами раніше експериментах по вивченню двох захисних реакцій (хітиназної активності та накопиченні калози), які було індуковано в сусpenзійній культурі клітин томатів олігомерами хітину, було констатовано різну інтенсивність цих реакцій [3; 10]. Можливо, що різна інтенсивність цих реакцій імунної відповіді може бути зумовлена існуванням відмінностей у механізмах сприйняття та передачі сигналу, який забезпечує їхню реалізацію. У такому ланцюзі, на наш погляд, може бути задіяна і кальцієва сигнальна система. Тому для перевірки такого припущення нами було обрано інгібіторний аналіз.

**Об'єкт і методи досліджень.** Сусpenзійна культура. Для проведення експериментів по вивченню кальцієвої сигнальної системи брали 5-денні клітини сусpenзійної культури томатів. Культивували їх у рідкому живному середовищі  $T^+$  з комбінацією фітогормонів (БАП – 0,6 мг/л, НОК – 3 мг/л). Інкубували на ротаційному шейкері. Захисні реакції в клітинах томатів індукували олігомерами хітину (N-ацетилглюкозамін)

з довжиною ланцюга від 2 до 5 ацетилглюкозамінних залишків ( $Xt_2$ ,  $Xt_3$ ,  $Xt_4$ ,  $Xt_5$ ). Еліситори додавали в концентраціях, які становили  $\frac{1}{2}$  від їхньої максимальної індукуючої активності [3]. Хітиназну активність виражали у відносних одиницях  $\beta$ -розпадів за хвилину (CPM) щодо 1 мг білка [4]. Кількісне визначення калози проводили за модифікованим методом Каусса та ін. [9] і виражали у мкг-еквівалентах пахімана/мг білка [7]. Вміст білка визначали за методом Лоурі. Для з'ясування ролі іонів  $\text{Ca}^{2+}$  в індукції хітиназної активності та накопиченні калози в клітинах використовували блокатор потенціалзалежних кальцієвих каналів – верапаміл і хелатор іонів кальцію – ЕГТА. Верапаміл додавали за 20 хв до обробки клітин еліситором [2] у концентрації 0,1 ммоль/л. ЕГТА додавали за 2 хв перед еліситацією в концентрації 5 ммоль/л.

**Результати та їх обговорення.** Виявилось, що попередня обробка сусpenзійної культури клітин томатів верапамілом і подальше додавання еліситорів ( $Xt_2$  у концентрації  $10^{-7}$  моль/л;  $Xt_3$ ,  $Xt_4$ ,  $Xt_5$   $10^{-6}$  моль/л) суттєво знижувала імунну відповідь клітин. Хітиназна активність при цьому зменшувалася в усіх експериментальних зразках (рис. 1) і становила 50,7 % від рівня, індукованого лише самим  $Xt_2$ -еліситором. При додаванні до клітин  $Xt_3$ -еліситора вона становила 53,5 %,  $Xt_4$ -еліситор – 48,9 % та 29,3 % при додаванні  $Xt_5$ .

Додавання хелатора іонів кальцію ЕГТА ще більшою мірою інгібувало хітиназну активність. Як видно з рис. 1, обробка клітин томатів ЕГТА перед додаванням еліситорів ще сильніше пригнічувала індукцію хітиназної активності в рослинних клітинах. Рівень ферментативної активності при цьому складав 30,7 % від рівня, індукованого лише самим  $Xt_2$ -еліситором. У клітин, оброблених  $Xt_3$ -еліситором, він дорівнював 16,2 %, у оброблених  $Xt_4$ - та  $Xt_5$ -еліситором, – 1,6 і 10 % відповідно.

Таким чином, попередня обробка клітин томатів блокатором потенціалзалежних кальцієвих каналів – верапамілом – суттєво зменшувала хітиназну активність в усіх варіантах, де застосовувалися еліситори. Хелатор іонів кальцію – ЕГТА майже повністю інгібував індуковану хітиназну активність у клітинах томатів. Одержані нами результати свідчать про необхідність наявності іонів кальцію в зовнішньоклітинному середовищі для зростання хітиназної активності в сусpenзійній культурі клітин томатів.

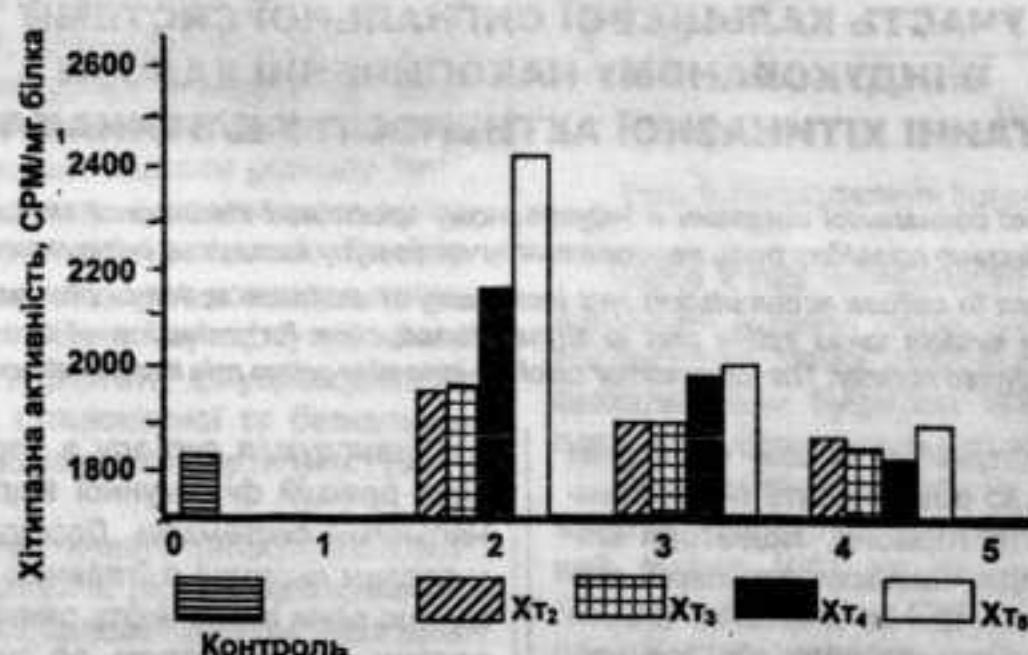


Рис. 1. Дія верапамілу та ЕГТА на індуковану хітиназну активність у сусpenзії клітин томатів:  
1 – контроль; 2 – обробка еліситорами; 3 – верапаміл + еліситор; 4 – ЕГТА + еліситор

Наступні експерименти було проведено з метою з'ясування ролі іонів кальцію в індукованому накопиченні калози. До суспензії клітин додавали ті самі еліситори в таких самих концентраціях. Обробку клітин верапамілом та ЕГТА проводили так само, як і в попередніх дослідах. Вплив цих речовин на індуковане хітиновими фрагментами накопичення калози показано на рис. 2, з якого видно, що додавання верапамілу та ЕГТА перед обробкою клітин еліситорами суттєво пригнічувало індуковане накопичення калози. Обробка клітин томату верапамілом зменшувала ін-

дукування накопичення калози з оберненою залежністю до концентрації еліситора. Так, при обробці клітин  $Xt_2$ -еліситором кількість калози в них становила 6,1 мкг-екв./мг білка,  $Xt_3$ -еліситором – 6,3 мкг-екв./мг білка;  $Xt_4$ -еліситором – 6,8 мкг-екв./мг білка;  $Xt_5$ -еліситором – 7,7 мкг-екв./мг білка. Індуковане відкладання калози при попередньому обробленні ЕГТА майже не перевищувало таке в контролі. Таким чином, одержанні результати свідчать, що для індукції накопичення калози в клітинах томатів важливу роль відіграє зовнішньоклітинний пул іонів  $Ca^{2+}$ .

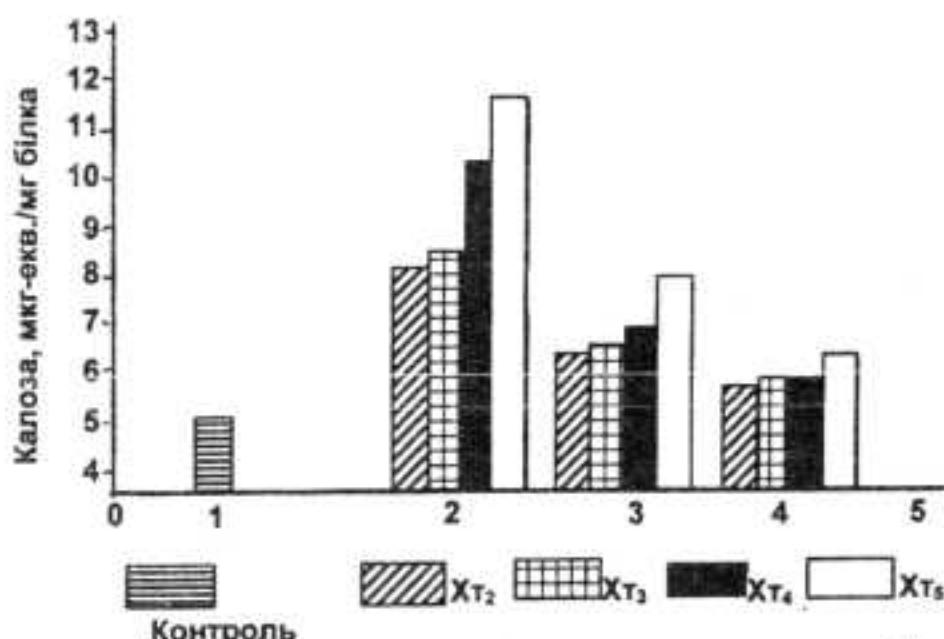


Рис. 2. Дія верапамілу та ЕГТА на індукований синтез калози в суспензії клітин томатів:  
1 – контроль; 2 – обробка хітиновими фрагментами; 3 – верапаміл + еліситор; 4 – ЕГТА + еліситор

**Висновки.** Аналіз отриманих результатів показав, що вирішальну роль у забезпеченні трансдукції еліситорного сигналу активації двох захисних реакцій (зростання хітиназної активності й накопичення калози) у клітинах томатів відіграє зовнішньоклітинний кальцій. Зв'язування іонів  $Ca^{2+}$  у культуральному середовищі за допомогою ЕГТА або блокування верапамілом його надходження через канали плазматичної мембрани всередину клітин призводить до значного зниження рівня обох захисних реакцій. Внутрішньоклітинний пул кальцію, ймовірно, може бути задіяний у механізмах внутрішньоклітинної сигналізації на більш пізніх етапах диференціації захисних реакцій.

Для перевірки сигнальної ролі іонів кальцію в індукованих реакціях імунної відповіді в подальшій роботі доцільно дослідити зміни цитоплазматичного  $Ca^{2+}$  у клітинах томатів у відповідь на обробку різними за хімічною будовою еліситорами. Це може дати остаточну відповідь на питання щодо участі кальцієвої сигналної системи в передачі сигналу індукованого зростання хітиназної активності та накопичення калози в клітинах.

а також з'ясувати місце кальцієвої сигналізації в диференціації реакцій фітоімунної відповіді.

1. Дмитриев А.П. // Цитология и генетика. – 2002. – Т. 36, № 3. – С. 58–68.
2. Дячок Ю.В., Дмитриев А.П., Гродзинский Д.М. // Физиол. растений. – 1997. – Т. 44, № 3. – С. 385–391.
3. Ємельянов В.І., Дмитров О.П., Гродзінський Д.М. // Доп. Нац. акад. наук України. – 1999. – № 11. – С. 156–158.
4. Ємельянов В.І., Грищенко О. Дмитров О.П. // Вісн. Київ. ун-ту ім. Т. Шевченка. Біологія. – 1999. – Вип. 31. – С. 35–36.
5. Ємельянов В.І., Краечук Ж.Н. // Вісн. Дніпропетр. ун-ту. – 2001. – Вип. 9, № 2. – С. 235–241.
6. Тарчевський І.А. Сигнальные системы клеток растений. – М., 2002.
7. Blume B., Nuberger T., Nass N., Scheel D. // Plant Cell. – 2000. – Vol. 12. – P. 1425–1440.
8. Ebel J., Mithofer A. // Planta. – 1998. – Vol. 206. – P. 335–348.
9. Kauss H. Membranes: Specialized Functions in Plants. – Guildford, UK, 1996. – P. 77–92.
10. Neuhaus G., Bowler C., Kem R., Chua N.-H. // Cell. – 1993. – Vol. 73. – P. 937–952.
11. Strasser H., Maier U. // Z. Naturforsch. – 1986. – P. 222–227.
12. White P.J. // Biochem. Biophys. Acta. – 2000. – Vol. 1465. – P. 171–189.

Надійшла до редколегії 16.12.05

Наукове видання



## ВІСНИК

КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

### ПРОБЛЕМИ РЕГУЛЯЦІЇ ФІЗІОЛОГІЧНИХ ФУНКЦІЙ

Випуск 11

Редактор В. Філь

Оригінал-макет виготовлено Видавничо-поліграфічним центром "Київський університет"  
Виконавець Г. Пластуненко

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

Засновник та видавець – Київський національний університет імені Тараса Шевченка. Свідоцтво Міністерства інформації України про Державну реєстрацію засобів масової інформації КІ № 251 від 31.10.97. Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", директор Г.Л. Новікова. Адреса ВПЦ: 01601, Київ, б-р Тараса Шевченка, 14, кімн. 43. ☎ (38044) 239 31 72, 239 32 22; факс 239 31 28

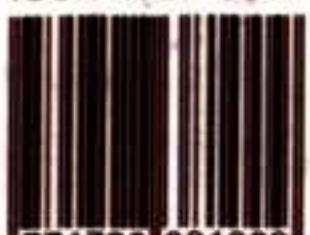


Підписано до друку 24.11.06. Формат 60x84<sup>1/8</sup>. Вид. № 12. Гарнітура Arial. Папір офсетний.  
Друк офсетний. Наклад 500. Ум. друк. арк. 6,04. Обл.-вид. арк. 10,0. Зам. № 26-3665.

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



ISSN 1728-3817



35>

9 771728 381009