

Подано експериментальні дані про особливості будови, розвитку і функціонування рослинних і тваринних організмів, одержаних науковцями НДІ фізіології та ННЦ "Інститут біології". Викладено також нові дані про патофізіологічні закономірності й біохімічні механізми регуляції процесів на клітинному та організмічному рівнях після впливу різноманітних фізико-хімічних чинників.

Для викладачів, наукових співробітників, аспірантів і студентів.

Подано экспериментальные данные об особенностях строения, развития и функционирования растительных и животных организмов, полученных учеными НИИ физиологии и ОНЦ "Институт биологии". Изложены также новые данные о патофизиологических закономерности и биохимические механизмы регуляции процессов на клеточном и органном уровнях после воздействия различных физико-химических факторов.

Для преподавателей, научных сотрудников, аспирантов и студентов.

The experimental dates development and function of the plant and animal organisms of research institute and ESC "Institute of Biology". 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	Є.О. Торгалло, канд. біол. наук (відп. секр.); Т.В. Берегова, д-р біол. наук, проф.; С.В. Демидов, д-р біол. наук, проф.; К.С. Непорада, д-р мед. наук, проф.; М.Е. Держинський, д-р біол. наук, проф.; І.Ю. Костіков, д-р біол. наук, доц.; О.Я. Склярів, д-р мед. наук, проф.; В.С. Мартинюк, д-р біол. наук, проф.; М.С. Мірошніченко, д-р біол. наук, проф.; О.В. Жолос, д-р біол. наук, проф.; М.Ю. Макаруч, д-р біол. наук, проф.; В.К. Позур, д-р біол. наук, проф.; Шандор Макаї, д-р біол. наук, проф.; В.П. Поліщук, д-р біол. наук, проф.; В.К. Рибальченко, д-р біол. наук, проф.; В.В. Серебряков, д-р біол. наук, проф.; Н.Ю. Таран, д-р біол. наук, проф.; А.В. Сиволоб, д-р біол. наук, проф.
Адреса редколегії	03127, Київ-127, просп. акад. Глушкова, 2а, ННЦ "Інститут біології"; ☎ (38044) 521-35-98
Затверджено	Вченою радою ННЦ "Інститут біології" 11.02.13 (протокол № 9)
Атестовано	Вищою атестаційною комісією України. Постанова Президії ВАК України № 1-05/3 від 14.04.10
Зареєстровано	Міністерством юстиції України. Свідоцтво про державну реєстрацію КВ № 16053-4525 ПР від 09.11.09
Засновник та видавець	Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет". Свідоцтво внесено до Державного реєстру ДК № 1103 від 31.10.02
Адреса видавця	01601, Київ-601, 6-р Т.Шевченка, 14, кімн. 43 ☎ (38044) 239 31 72, 239 32 22; факс 239 31 28

ЗМІСТ

Гармаш Я., Губень О., Компанієць Д., Мінченко Д. Вплив гіпоксії та дефіциту глюкози або глутаміну на експресію генів енолази та альдолази у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1	5
Мельник М., Мартинюк В. Сучасні уявлення про первинні Ca^{2+} -опосередковані механізми біологічної дії слабких низькочастотних електромагнітних полів.....	9
Юсковець Г., Філімонова Н. Електрична активність головного мозку жінок при тестуванні оперативної пам'яті на невербальні стимули підвищеного рівня складності	14
Федоренко Т., Лазаренко Л., Городна О., Демидов С. Вплив дейтерієвої води на геном еукаріот: цитогенетична активність в allium-тесті.....	17
Семчук Л., Ромашев С., Бурхан А. Мутації певних ділянок генома фага 8573 sm забезпечують його адаптацію до резистентного хазяїна <i>Pseudomonas fluorescens</i>	20
Куценко Т., Лозовська А., Соловійова С., Усеїнов Р. Зміни показників ЕЕГ при ризиковому проходженні емоційного тесту струпа в залежності від статті і право-ліворукості.....	22
Дворщенко К., Драницина А., Савко У., Остапченко Л. Експресія гена <i>TGFβ1</i> у епітеліоцитах дванадцятипалої кишки щурів за умов тривалої гіпоацидності та при введенні мультипробіотика Симбітер	25
Хома О., Сорока В., Ноздренко Д. Морфологічні зміни ультраструктури саркомера штучно ішемізованого м'яза щура	28
Ратушна О., Мінченко Д., Клімеш І., Мінченко О. Експресія PFKFB та циркадальних генів у підшкірній жировій тканині чоловіків за діабету 2 типу	30
Пашук К., Насирова Г., Федін Ф. Ферментування сирних продуктів з комбінованою жировою фазою.....	35
Рассомагіна М., Кравченко В. Електрична активність головного мозку під час монокулярної презентації вербальних стимулів в емоційному Струп-тесті.....	37
Домбровська І., Лиманська Т., Малиновська І., Кокотей В. Скринінг фунгіцидів серед сполук гетеробіметалічних комплексів	42
Курочка А., Довбинчук Т., Путніков А., Бичко А., Толстанов Г. Активність мієлопероксидази в слизовій оболонці товстої кишки за умов тривалої антибіотикотерапії та при експериментальному виразковому коліті	46
Беньковська Л. Хибнопозитивні результати серологічної діагностики гепатиту С.....	48
Абдулосєва О., Карпенко Н. Показники інвазійного потенціалу чужинних рослин як основа процедури оцінки ризику.....	51
Пилипенко С., Короткий О., Максимович Я., Берегова Т., Остапченко Л. Вплив мультипробіотика "Апібакт" на активність синтази оксиду азоту та вміст нітрит-іонів у тимоцитах і спленоцитах щурів за умов тривалої шлункової гіпоацидності	53
Данченко Н., Полякова В., Бабак В., Весельський С., Салата І., Цудзевич Б. Вплив алоксану на деякі характеристики вуглеводного та енергетичного обміну у щурів.....	56

СОДЕРЖАНИЕ

Гармаш Я., Губеня А., Компаниец Д., Минченко Д. Влияние гипоксии и дефицита глюкозы или глутамина на экспрессию генов энолазы и альдолазы в клетках глиомы линии <i>U87</i> с подавленной функцией сигнального энзима <i>ERN1</i>	5
Мельник М., Мартынюк В. Современные представления о первичных Ca^{2+} -опосредованные механизмы биологического действия слабых низкочастотных электромагнитных полей	9
Юсковец Г., Филимонова Н. Электрическая активность головного мозга женщин при тестировании оперативной памяти на невербальные стимулы повышенного уровня сложности	14
Федоренко Т., Лазаренко Л., Городна О., Демидов С. Влияние дейтериевой воды на геном эукариот: цитогенетическая активность в <i>allium</i> -тесте	17
Семчук Л., Ромашев С., Бурхан А. Мутации определенных участков генома фага <i>8573 sm</i> обеспечивают его адаптацию к резистентности хозяина <i>Pseudomonas fluorescens</i>	20
Куценко Т., Лозовская А., Соловьева С., Усеинов Р. Изменения показателей ЭЭГ при трюхразовом прохождении эмоционального теста струпа в зависимости от пола и право-леворукости	22
Дворченко К., Драницина А., Савко В., Остапченко Л. Экспрессия гена <i>TGFβ1</i> в эпителиоцитах двенадцатиперстной кишки крыс при длительной гипоацидности и при введении мультипробиотика Симбитер	25
Хома А., Сорока В., Ноздренко Д. Морфологические изменения ультраструктуры саркомера искусственно-ишемизированной мышцы крысы	28
Ратушная О., Минченко Д., Климеш И., Минченко А. Экспрессия <i>PFKFB</i> и циркадиальных генов в подкожной жировой ткани мужчин в условиях диабета 2 типа	30
Пашук К., Насырова Г., Федин Ф. Ферментирование творожных продуктов с комбинированной жировой фазой	35
Рассомагина М., Кравченко В. Электрическая активность головного мозга во время монокулярной презентации вербальных стимулов в эмоциональном Струп-тесте	37
Домбровская И., Лиманская Т., Малиновская И., Кокозей В. Скрининг фунгицидов среди соединений гетеробиметаллических комплексов	42
Курочка А., Довбинчук Т., Путников А., Бычко А., Толстанова Г. Активность миелопероксидазы в слизистой оболочке толстой кишки в условиях длительной антибиотикотерапии и при экспериментальном язвенном колите	46
Беньковская Л. Ложноположительные результаты серологической диагностики гепатита С	48
Абдулова А., Карпенко Н. Показатели инвазивного потенциала чужих растений как основа процедуры оценки риска	51
Пилипенко С., Короткий А., Максимович Я., Береговая Т., Остапченко Л. Влияние мультипробиотика "Апибакт" на активность синтазы оксида азота и содержание нитрит-ионов в тимocyтах и спленocyтах крыс при длительной желудочной гипоацидности	53
Данченко Н., Полякова В., Бабак В., Весельский С., Салата И., Цудзевич Б. Влияние аллоксана на некоторые характеристики углеводного и энергетического обмена у крыс	56

CONTENTS

Garmash Ya., Gubenay D., Kompanietz D., Minchenko D. Effect of hypoxia and lack of glucose or glutamine on gene expression enolase and aldolase in glioma cell lines U87 with suppressed function of signaling enzyme ERN1	5
Melnik M., Martynuk V. Modern theoretical understanding of the primary Ca^{2+} -mediated mechanisms of biological effects of weak low-frequency electromagnetic fields	9
Yuskovets G., Filimonova N. Electrical activity of the brain of the women at testing working memory for nonverbal stimulants of the increased level of difficulty	14
Fedorenko T., Lazarenko L., Gorodna O., Demidov S. Effect of deuterium water for eukaryotic gene: cytogenetic activity of allium-test	17
Semchuk L., Romashev S., Burhan A. Mutations in certain areas of the genome of phage 8573 sm ensure its adaptation to resistant host <i>Pseudomonas fluorescens</i>	20
Kutsenko T., Lozovska A., Solovyova A., Useinov R. Changes of EEG in ryazovomu passing emotional scab test depending on the article and right-handedness	22
Dvorchshenko K., Dranitsina A., Savko U., Ostapchenko L. Expression of <i>TGFβ1</i> gene in rat duodenal upon long-term hypoacidity and with administration of multiprobiotic "Symbiter [®] acidophilic" concentrated	25
Homa O., Soroka V., Nozdrenko D. Morphological changes of sarcomere ultrastructure artificially ischemic rat muscle	28
Ratushna O., Minchenko D., Klimesh I., Minchenko O. Expression PFKFB and circadian genes in subcutaneous adipose tissue of men with type 2 diabetes	30
Pashuk K., Nasurova G., Fedin F. Fermentation cheese products with combined fatty phase	35
Rassomagina M., Kravchenko V. Brain electrical activity during monocular presentation of verbal stimuli in emotional Stroop-test	37
Dombrovska I., Lumanska T., Malinovska I., Kokozy V. Screening compounds among fungicide heterobimetalic complex	42
Kurochka A., Dovbunchyk T., Putnikov A., Buchko A., Tolstanova G. Myeloperoxidase activity in the mucosa of the colon under conditions of prolonged antibiotic therapy and in experimental ulcerative colitis	46
Benkovska L. False positive results of serologic diagnosis of hepatitis C	48
Abduloeva O., Karpenko N. Indicators potential alien plants as the basis of risk-assessment procedures	51
Pulupenko S., Korotkyi O., Maksumovuch Ya., Beregova T., Ostapchenko L. Effect multiprobiotic "Apibact" on the activity of nitric oxide syntase and nitrite ions content in thymocytes and splenocytes of rats prolonged gastric gipoatsydyty	53
Danchenko N., Polyakova V., Babak V., Veselskiy S., Salata I., Tsudzevych B. Effect aloksanu on some characteristics of carbohydrate and energy metabolism in rats	56

ВПЛИВ ГІПОКСІЇ ТА ДЕФІЦИТУ ГЛЮКОЗИ АБО ГЛУТАМІНУ НА ЕКСПРЕСІЮ ГЕНІВ ЕНОЛАЗИ ТА АЛЬДОЛАЗИ У КЛІТИНАХ ГЛІОМИ ЛІНІЇ U87 З ПРИГНІЧЕНОЮ ФУНКЦІЄЮ СИГНАЛЬНОГО ЕНЗИМУ ERN1

Ізоензими енолази та альдолази відіграють важливу роль у гліколізі та рості пухлин. Встановлено, що пригнічення обох ензиматичних функцій сенсорно-сигнального ензиму ERN1 (від ендоплазматичного ретикулуму до ядра-1), що є основним компонентом сигналіну за стресу ендоплазматичного ретикулуму, збільшує рівень експресії генів, що кодують синтез енолази-1 (ENO1), ENO2, альдолази-A (ALDOA) та ALDOC у клітинах гліоми лінії U87, але більш виражено генів ENO2 та ALDOC. Ці зміни в експресії ENO1, ENO2 та ALDOA опосередковані ендорибонуклеазою ензиму ERN1, оскільки пригнічення лише рибонуклеази ERN1 має ефект, подібний до пригнічення обох ензиматичних функцій. В той же час, збільшення експресії гена ALDOC у клітинах гліоми без функції ERN1 можливо опосередковано киназою, оскільки у клітинах з пригніченою функцією ERN1 ефект гіпоксії на рівень експресії ENO2 та ALDOC є значно зменшеним. Також показано, що рівень експресії генів ENO1, ENO2 та ALDOC змінюється в обох типах клітин гліоми за умов дефіциту глютаміну, але у клітинах без функції ERN1 цей ефект на експресію гена ENO2 був більш вираженим. Більше того, пригнічення функції ензиму ERN1 також змінює ефект дефіциту глюкози на експресію генів ENO1 та ENO2 у клітинах гліоми. Таким чином, результати даної роботи чітко продемонстрували, що експресія генів енолази та альдолази у клітинах гліоми лінії U87 є залежною від сигнального ензиму ERN1 і здебільшого змінюється за гіпоксії та дефіциту глютаміну або глюкози в залежності від функції сигнального ензиму ERN1. В той же час, експресія генів ENO2 та ALDOC можливо регулюється і іншими сигнальними системами стресу ендоплазматичного ретикулуму, оскільки тунікамідин впливає на їх експресію у клітинах з пригніченою функцією ендорибонуклеази ERN1.

Ключові слова: експресія генів, енолаза, альдолаза, сигнальний ензим, тунікамідин

Изоэнзимы енолазы и альдолазы играют важную роль в гликолизе и росте опухолей. Установлено, что подавление обеих энзиматических функций сенсорно-сигнального энзима ERN1 (от эндоплазматического ретикулума к ядру-1), который является основным компонентом сигналинга из-за стресса эндоплазматического ретикулума, увеличивает уровень экспрессии генов, кодирующих синтез енолазы-1 (ENO1), ENO2, альдолазы -A (ALDOA) и ALDOC в клетках глиомы линии U87, но более выражено генов ENO2 и ALDOC. Эти изменения в экспрессии ENO1, ENO2 и ALDOA косвенные эндорибонуклеазным энзимом ERN1, поскольку угнетение только рибонуклеазы ERN1 имеет эффект, подобное угнетение обеих энзиматических функций. В то же время, увеличение экспрессии гена ALDOC в клетках глиомы без функции ERN1 возможно косвенно киназой, поскольку в клетках с подавленной функцией только эндорибонуклеазы не выявлено изменений в экспрессии ALDOC. Более того, экспрессия генов ENO1 и ALDOA преимущественно регулируется ERN1, поскольку туникамидин, что является индуктором стресса эндоплазматического ретикулума, нарушает экспрессию только генов ENO2 и ALDOC. Гипоксия увеличивает экспрессию генов ENO1, ENO2, ALDOA и ALDOC в обоих типах клеток глиомы, но в клетках с утраченной функцией ERN1 эффект гипоксии на уровень экспрессии ENO2 и ALDOC значительно уменьшается. Также показано, что уровень экспрессии генов ENO1, ENO2 и ALDOC уменьшается в обоих типах клеток глиомы в условиях дефицита глютамина, но в клетках без функции ERN1 этот эффект на экспрессию гена ENO2 был более выраженным. Более того, подавление функции энзима ERN1 также изменяет эффект дефицита глюкозы на экспрессию генов ENO1 и ENO2 в клетках глиомы. Таким образом, результаты данной работы четко продемонстрировали, что экспрессия генов енолазы и альдолазы в клетках глиомы линии U87 является зависимой от сигнального энзима ERN1 и обычно изменяется при гипоксии и дефиците глютамина или глюкозы в зависимости от функции сигнального энзима ERN1. В то же время, экспрессия генов ENO2 и ALDOC возможно регулируется и другими сигнальными системами стресса эндоплазматического ретикулума, поскольку туникамидин влияет на их экспрессию в клетках с подавленной функцией эндорибонуклеазы ERN1.

Ключевые слова: экспрессия генов, енолаза, альдолаза, сигнальный энзим, туникамидин

Enolase and aldolase isoenzymes play an important role in glycolysis and tumor growth. It was shown that suppression of both enzymatic functions of sensor and signaling enzyme ERN1 (endoplasmic reticulum – nuclei-1), the major component of endoplasmic reticulum stress signaling, increases the expression level of genes encoding enolase-1 (ENO1), ENO2, aldolase-A (ALDOA) and ALDOC in glioma cell line U87, being more significant for ENO2 and ALDOC. These changes in the expression of ENO1, ENO2 and ALDOA are mediated by endoribonuclease of ERN1 enzyme, because suppression only this enzymatic activity of ERN1 had same effect like suppression of both enzymatic functions. At the same time, the increase of ALDOC gene expression in glioma cells with ERN1 signaling enzyme loss of function is possibly mediated by kinase, because in cells with suppressed ERN1 endoribonuclease function only no changes in the expression of ALDOC were observed. Moreover, the ENO1 and ALDOA gene expressions are regulated merely by ERN1, because tunicamycin, the inductor of endoplasmic reticulum stress, affects the expression of ENO2 and ALDOC genes only. Hypoxia increases the expression of ENO1, ENO2, ALDOA and ALDOC genes in both types of glioma cells, but in cells with ERN1 loss of function effect of hypoxia on the expression level of ENO2 and ALDOC is significantly reduced. It was also shown that the expression level of ENO1, ENO2 and ALDOC genes is decreased in both glioma cells types at glutamine deprivation conditions, but in cells with ERN1 loss of function this effect on ENO2 gene expression was more significant. Moreover, suppression of ERN1 enzyme function also changes the effect of glucose deprivation on the expression of ENO1 and ENO2 genes in glioma cells. Thus, results of this investigation clearly demonstrated that the expression of enolase and aldolase genes in U87 glioma cells is dependent from signaling enzyme ERN1 and is mostly regulated by hypoxia and glutamine or glucose deprivation in dependence from ERN1 signaling enzyme function. At the same time, the expression of ENO2 and ALDOC genes is possibly also regulated by other endoplasmic reticulum stress signaling systems, because tunicamycin affects its expression in cells with suppressed function of ERN1 endoribonuclease.

Keywords: gene expression, enolase, aldolase, signaling enzyme, tunicamycin.

Вступ. Гіпоксія та умови дефіциту поживних речовин є важливими факторами росту злоякісних пухлин. Гіпоксія, як і багато інших факторів, індукують стрес ендоплазматичного ретикулуму та експресію великої кількості генів, в тому числі гени, що контролюють гліколіз і процеси проліферації [1, 2]. Стрес ендоплазматичного ретикулуму є відповіддю на накопичення не згорнутих чи не правильно згорнутих протеїнів у ендоплазматичному ретикулумі [3]. Ця адаптивна реакція клітин опосередко-

вується трьома сенсорами, локалізованими в ендоплазматичному ретикулумі: PERK (PRK-like ER kinase), IRE1/ERN1 (Inositol Requiring Enzyme-1/Endoplasmic Reticulum to Nuclei-1) та ATF6 (Activating Transcription Factor 6), але ERN1 (від ендоплазматичного ретикулуму до ядра-1) є головним сенсором [4 – 7]. Активація стресу ендоплазматичного ретикулуму призупиняє вхід *de novo* протеїнів в ендоплазматичний ретикулум і сприяє як фолдингу протеїнів в ендоплазматичному ретикулумі, так і

їх деградації, для виживання клітин або їх смерті через асоційовані із стресом ендоплазматичного ретикулулу механізми [8 – 11]. Таким чином, він приймає участь у ранній реакції клітин на акумуляцію у люмені ендоплазматичного ретикулулу не згорнутих протеїнів як за фізіологічних, так і патологічних умов [3, 8].

Виявлено два різних каталітичних домени у біфункціональному сенсорно-сигнальному ензимі ERN1: серин/треонінова кіназа та ендорібонуклеаза, які опосередковують ERN1 сигналінг. Асоційована з ERN1 кіназна активність аутофосфорилує цей ензим, що є необхідним моментом його димеризації та активації ендорібонуклеазного домену. Останній є відповідальним за деградацію певних мРНК та ініціацію альтернативного сплайсингу пре-XBP1 (X-box binding protein 1) мРНК [9, 10]. Зрілий сплайс-варіант мРНК XBP1 (XBP1s) кодує синтез транскрипційного фактора, який контролює експресію сотень генів, що мають відношення до стресу ендоплазматичного ретикулулу [10, 11]. Більше того, XBP1s має також ряд додаткових функцій, особливо у регуляції метаболізму глюкози [12, 13]. Так, протеїніназа р38 MAP фосфорилує альтернативний сплайс-варіант XBP1 і посилює його міграцію до ядра. Крім того, регуляторна субодиниця фосфатидилінозитол 3-кінази взаємодіє з XBP1 і також збільшує його ядерну транслокацію [14]. Zhou et al. [13] було показано, що XBP1s взаємодіє з транскрипційним фактором FOXO1 (Forkhead box O1) і направляє його для деградації, опосередкованої протеосою. В той же час, було встановлено, що інгібітор кінази ERN1 активує ендорібонуклеазу цього ензиму, захищаючи клітини від стресу ендоплазматичного ретикулулу. Можливо, що ця активація this activation ендорібонуклеази ERN1 є результатом взаємодії ERN1 сигнального шляху з іншими сенсор-сигнальними системи стресу ендоплазматичного ретикулулу.

Залежний від стресу ендоплазматичного ретикулулу ERN1 сигнальний шлях є асоційованим з гіпоксією і тісно пов'язаний з процесами проліферації та росту злоякісних пухлин, оскільки повна блокада функції сигнального шляху ERN1 проявляє анти пухлинний ефект на клітинах аденокарциноми легень та гліоми [9, 15, 16]. Злоякісні гліоми є надзвичайно агресивними пухлинами і характеризуються вираженням ангиогенезом та посиленою інвазією клітин в нормальну паренхіму мозку [8]. Як гіпоксія, так і чинники, що імітують ефекти ішемії, є асоційованими з ростом гліом і локально активують адаптивну відповідь, яка сприяє виживанню пухлинних клітин і посилює їх агресивність [8]. Краще розуміння механізмів залежності клітин від гіпоксії та ішемічних чинників є необхідною умовою для розробки терапевтичних стратегій сенсibiлізації клітин та пригнічення ангиогенезу шляхом блокади механізмів виживання. Гліколітичний шлях метаболізму глюкози, як і гени, що кодують синтез ключових ензимів гліколізу, таких як енолаза (*ENO1* та *ENO2*) та альдолаза (*ALDOA* та *ALDOC*) відіграють важливу роль в рості злоякісних пухлин, але молекулярні механізми їх регуляції вивчені ще недостатньо. Енолаза 1 (*ENO1*) є мультифункціональним ензимом і відіграє важливу роль в регуляції не лише гліколізу, а і в інших процесах, зокрема в контролі росту пухлин та в толерантності до гіпоксії. Альтернативний сплайсинг мРНК цього ензиму приводить до утворення короткого варіанту (MBP1), який зв'язується з промотором *c-myc* і виконує функцію супресора росту пухлин [17]. Енолаза 2 є специфічним для мозку ензимом і має нейротропні та нейропротекторні властивості. Детальне вивчення ролі цих генів в гліколізі та рості пухлин можливо відкриє нові шляхи для розробки нових стратегій лікування [18, 19].

Метою даної роботи було вивчення експресії генів, що контролюють гліколіз (*ENO1*, *ENO2*, *ALDOA* та *ALDOC*) у клітинах гліоми лінії U87 з повним (як кінази, так і ендорібонуклеази) або частковим (лише ендорібонуклеази) пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1 за умов гіпоксії та дефіциту глюкози або глутаміну.

Матеріали та методи. Клітини гліоми лінії U87 були отримані із ATCC (США) і росли у середовищі DMEM (Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium; Gibco, Invitrogen, США) з високою концентрацією глюкози (4.5 г/л), що містило додатково 2 mM глутаміну, 10% ембріональної сироватки телят (Equitech-Bio, Inc., США), пеніцилін (100 одиниць/мл; Gibco) та стрептоміцин (0.1 мг/мл; Gibco) при 37°C в інкубаторі з 5% CO₂. У цій роботі були використані три сублінії клітин гліоми. Одну з них було отримано шляхом селекції клонів, стабільно трансфекованих вектором pcDNA3.1, який був використаний для створення домінант-негативних конструкцій, що містили кДНК сенсорно-сигнального ензиму ERN1 без кінази та ендорібонуклеази (dnERN1) або кДНК ERN1 з мутацією в каталітичній частині ендорібонуклеази (dnrERN1). Сублінія клітин гліоми, трансфекованих вектором були використані як контрольні клітини гліоми і позначені на рисунках як контроль 1, з яким порівнювали ефект гіпоксії та дефіциту глюкози або глутаміну, а також ефект повного або часткового пригнічення функції ензиму ERN1, на експресію генів енолази та альдолази у цих контрольних клітинах. Друга сублінія була отримана шляхом селекції клонів, стабільно трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 у векторі pcDNA3.1, в яких була повністю пригнічена як кіназна, так і ендорібонуклеазна активності, що було оцінено по пригніченню фосфорилування ERN1 та утворенню альтернативного сплайс-варіанту XBP1 за умов стресу ендоплазматичного ретикулулу, індукованого тунікаміцином (10 мкг/мл – 2 години) [20]. Друга сублінія клітин була використана як контроль 2 при вивченні ефекту гіпоксії та дефіциту глюкози або глутаміну на експресію генів енолази та альдолази у цих клітинах. Для створення третьої сублінії цих клітин клітини гліоми лінії U87 стабільно трансфекували домінант-негативною конструкцією dnrERN1 [GenBank accession number JQ425696], в яких була повністю пригнічена функція ендорібонуклеази ERN1, що оцінювали по утворенню альтернативного сплайс-варіанту XBP1 за умов стресу ендоплазматичного ретикулулу, індукованого тунікаміцином (10 мкг/мл – 2 години). В дослідях з гіпоксією клітини поміщали у спеціальний інкубатор з 3 % кисню та 5 % діоксиду карбону на 16 годин. Дефіцит глюкози та глутаміну створювали шляхом заміни середовища, в якому була відсутня глюкоза або глутамін (Gibco) і витримували протягом 16 годин. РНК із клітин гліоми виділяли як описано раніше [20]. Осад РНК промивали 75 % етанолом, розчиняли у воді, вільній від рибонуклеаз, переосажували етанолом, знову розчиняли у воді і використовували для синтезу комплементарної ДНК.

Рівень експресії різних генів енолази та альдолази у клітинах гліоми визначали методом кількісної полімеразної реакції використовуючи "Mx 3000P QPCR" (Stratagene, США) та SYBRGreen Mix (AB gene, Велика Британія). Синтез кДНК проводили за допомогою QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN, Німеччина) згідно протоколу виробника. Для ампліфікації кДНК ENO1 були використані такі праймери: прямий (5'-GAGTCCGGGACAATGATAA-3' та зворотний (5'-TGTTCCATCCATCTCGATCA-3'). Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 664 – 683 та 822 – 803 кДНК ENO1 людини (GenBank номер

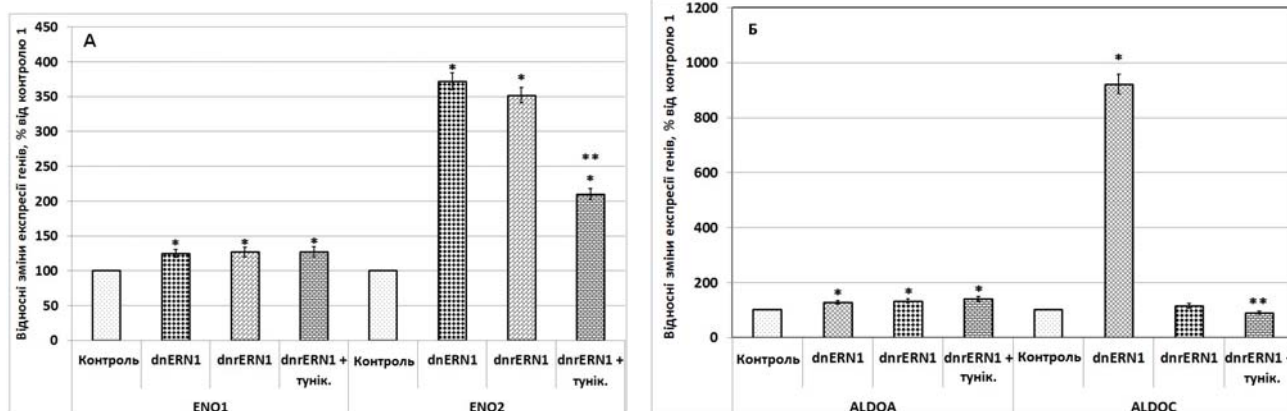
NM_001428). Розмір ампліфікованого фрагмента 159 п.н.з. Ампліфікацію кДНК *ENO2* проводили за допомогою прямого (5'- CTTGGAGCTGGTGAAGGAAG -3') та зворотного (5'- TTTTGGGTTGGTCACTGTCA -3') праймерів, які відповідають послідовності 891 – 910 та 1200 – 1181 кДНК *ENO2* людини (GenBank номер NM_001975). Розмір ампліфікованого фрагмента 310 п.н.з. Для ампліфікації кДНК *ALDOA* (aldolase A) були використані такі праймери: прямий – 5'- GCTGCTCACCACACACAAGT -3' та зворотний – 5'- ATGCTCCAGTGGACTCATC -3'. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 797-816 та 1126-1107 кДНК *ALDOA* людини (GenBank номер NM_000034). Розмір ампліфікованого фрагмента 330 п.н.з. Ампліфікацію кДНК *ALDOC* проводили за допомогою прямого 5'- GCCTCTAGCTGGGACTGATG -3' та зворотного (5'- TGTACACAGCAGCCAAGACC -3') праймерів, які відповідають послідовності 487 – 506 та 788 – 769 кДНК *ALDOC* людини (GenBank номер NM_005765). Розмір ампліфікованого фрагмента 302 п.н.з. Ампліфікацію кДНК бета-актину (*ACTB*) проводили за допомогою прямого – 5'- GGACTTCGAGCAAGAGATGG -3' та зворотного – 5'- AGCACTGTGTTGGCGTACAG -3' праймерів. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 747 – 766 та 980 – 961 кДНК *ACTB* людини (GenBank номер NM_001101). Розмір ампліфікованого фрагмента 234 п.н.з. По рівню експресії мРНК бета-актину оцінювали кількість РНК, взятої для аналізу. Праймери були отримані з компанії "Sigma-Aldrich" (США).

Аналіз результатів дослідження експресії генів *ENO1*, *ENO2*, *ALDOA* та *ALDOC* виконували з допомогою спеціальної комп'ютерної програми "Differential expression calculator" а статистичний аналіз – в Excel програмі. Значення експресії генів *ENO1*, *ENO2*, *ALDOA* та *ALDOC* нормалізували по рівню експресії бета-актину і представляли у відсотках від контролю (100 %). Представлені середні значення $\pm m$ чотирьох експериментів.

Результати дослідження та їх обговорення. Як видно із даних, приведених на рис. 1, пригнічення функції кіназної та ендорибонуклеазної активностей сенсорно-сигнального ензиму ERN1, основного сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулу, у клітинах гліоми лінії U87, посилює експресію генів, що кодуєть синтез двох варіантів ендолази (*ENO1* та *ENO2*), а також двох варіантів альдолази (*ALDOA* та *ALDOC*), причому ці зміни є більш вираженими для генів *ENO2* та *ALDOC*, у по-

рівнянні з контрольними клітинами гліоми, трансфектованими вектором pCDNA3.1. Разом з тим, пригнічення лише ендорибонуклеази сигнального ензиму ERN1 приводить також до збільшення рівня експресії генів *ENO1*, *ENO2* та *ALDOC* майже до такого ж рівня, як і у випадку пригнічення обох ензиматичних активностей ERN1 (рис. 1А та 1Б). Таким чином, збільшення експресії генів *ENO1*, *ENO2* та *ALDOA* опосередковано саме ендорибонуклеазної активністю ензиму ERN1, оскільки пригнічення лише ендорибонуклеазної активності ензиму ERN1 має подібний з виключенням обох ензиматичних активностей ефект. В той же час, посилення експресії гена *ALDOC*, що спостерігається у клітинах гліоми з пригніченою функцією обох ензиматичних активностей ERN1 можливо опосередковано кіназою, оскільки у клітинах з виключеною лише ендорибонуклеазною активністю не спостерігається змін в експресії *ALDOC* (рис. 1Б). Оскільки стрес ендоплазматичного ретикулу опосередковується трьома сенсорно-сигнальними системами (ERN1, PERK та ATF6) [4 – 7], нами були проведені дослідження експресії генів ендолази та альдолази у клітинах гліоми з пригніченою ендорибонуклеазною активністю ERN1 за умов індукції стресу ендоплазматичного ретикулу тунікаміном, з метою виявити роль сенсорно-сигнальних систем PERK та ATF6 в регуляції експресії цих генів. Як видно із даних, приведених на рис. 1, експресія генів *ENO1* та *ALDOA* регулюється переважно системою ERN1, а саме її ендорибонуклеазною активністю, оскільки тунікаміцин не змінює експресію генів *ENO1* та *ALDOA*, а впливає лише на експресію генів *ENO2* та *ALDOC*. Результати цих досліджень свідчать про можливу участь сигнальної системи PERK та/або ATF6 в регуляції експресії генів *ENO2* та *ALDOC*.

На рис. 2 та 3 представлені результати дослідження впливу гіпоксії на експресію генів *ENO1*, *ENO2*, *ALDOA* та *ALDOC* в контрольних клітинах гліоми та в клітинах з повним пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1. Встановлено, що гіпоксія посилює рівень експресії генів *ENO2* та *ALDOC* як у контрольних клітинах гліоми, так і у клітинах з пригніченою функцією ензиму ERN1, але в останньому випадку в значно меншій мірі. Так, в контрольних клітинах гліоми рівень експресії генів *ENO2* та *ALDOC* збільшується за умов гіпоксії майже в 7 разів, тоді як у клітинах з виключеною функцією ERN1 рівень індукції експресії цих генів є значно нижчим: експресія гена *ENO2* збільшується в два рази, а гена *ALDOC* – лише на +26 % (рис. 2 та 3).



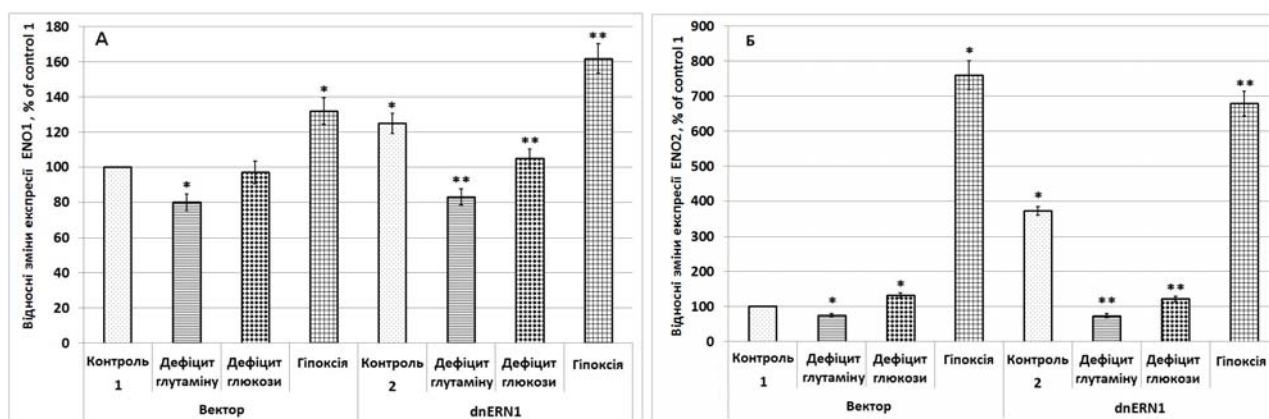


Рис. 2. Ефект гіпоксії та дефіциту глюкози або глутаміну на рівень експресії генів *ENO1* (А) та *ENO2* (Б) у клітинах гліоми лінії U87, трансфорованих вектором *pcDNA3.1* (Вектор) та клітин, стабільно трансфорованих домінант-негативною конструкцією ензиму *ERN1* (*dnERN1*) на основі вектору *pcDNA3.1*, за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції. Рівень експресії цих мРНК нормалізували по експресії бета-актину. Зміни в експресії генів *ENO1* та *ENO2* у клітинах гліоми за дії гіпоксії та умов дефіциту глюкози чи глутаміну у контрольних клітинах гліоми (Вектор) порівнювали з контролем 1 (100 %), а у клітинах, трансфорованих *dnERN1*, – з контролем 2; $n = 4$; * – $P < 0,05$ при порівнянні з контролем 1, а ** – $P < 0,05$ при порівнянні з контролем 2

Примітка: 2 та 3 Контроль 1 – це клітини, трансфоровані вектором *pcDNA3.1* а контроль 2 – клітини, трансфоровані *dnERN1*.

Крім того, нами показано, що рівень експресії генів *ENO1*, *ENO2* та *ALDOC* знижується в обох типах клітин за умов відсутності у середовищі глутаміну, але у клітинах з повним пригніченням функції сигнального ензиму *ERN1* цей ефект був більш вираженим для гена *ENO2* (рис. 2 та 3). Так, у контрольних клітинах гліоми відсутність глутаміну знижує рівень експресії гена *ENO2* на 25 %, а у клітинах з пригніченою функцією сигнального ензиму *ERN1* – у 5 разів (рис. 2Б). В той же час, в умовах відсутності глюкози у середовищі сут-

тєвих змін в рівнях експресії генів *ENO1*, *ALDOA* та *ALDOC* у контрольних клітинах гліоми та генів *ALDOA* і *ALDOC* – у клітинах з пригніченою функцією ензиму *ERN1* (рис. 2 та 3). Крім того, було виявлено відносно невелике збільшення рівня експресії гена *ENO2* (+32 %) у контрольних клітинах гліоми, але блокада функції ензиму *ERN1* у клітинах гліоми приводила до пригнічення експресії цього гена (-16 %) та більш вираженого зниження рівня експресії гена *ENO2* (in 3 fold) (рис. 2Б).

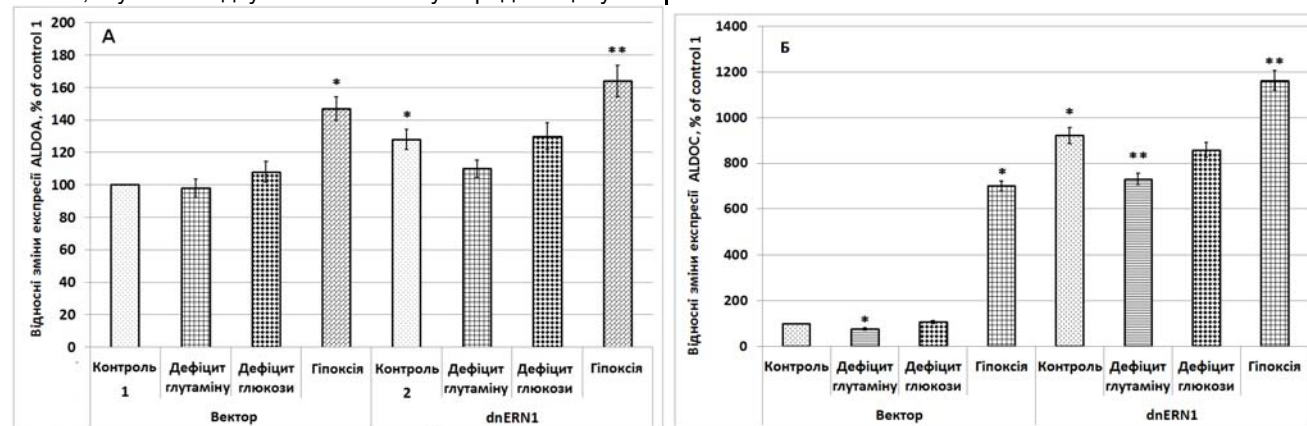


Рис. 3. Ефект гіпоксії та дефіциту глюкози або глутаміну на рівень експресії генів *ALDOA* (А) та *ALDOC* (Б) у клітинах гліоми лінії U87, трансфорованих вектором *pcDNA3.1* (Вектор) та клітин, стабільно трансфорованих домінант-негативною конструкцією ензиму *ERN1* (*dnERN1*) на основі вектору *pcDNA3.1*, за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції. Рівень експресії цих мРНК нормалізували по експресії бета-актину. Зміни в експресії генів *ALDOA* та *ALDOC* у клітинах гліоми за дії гіпоксії та умов дефіциту глюкози чи глутаміну у контрольних клітинах гліоми (Вектор) порівнювали з контролем 1 (100 %), а у клітинах, трансфорованих *dnERN1*, – з контролем 2; $n = 4$; * – $P < 0,05$ при порівнянні з контролем 1, а ** – $P < 0,05$ при порівнянні з контролем 2.

Результати цих досліджень продемонстрували залежність експресії обох генів енолази (*ENO1* та *ENO2*), як і обох генів альдолази (*ALDOA* та *ALDOC*) від функціональної активності сигнального ензиму *ERN1* у клітинах гліоми лінії U87, а також чутливість їх експресії до гіпоксії та дефіциту глюкози і глутаміну у середовищі. Більше того, суттєве посилення експресії генів *ENO2* та *ENO1* у клітинах гліоми з пригніченою функцією сигнального ензиму *ERN1* корелює з пригніченням росту пух-

лин з цих клітин *in vivo* [15, 16] і можливо вносить свій вклад у цей процес, оскільки енолаза 1 та енолаза 2 є мультифункціональними ензимами і приймають участь не лише у гліколізі, а і у багатьох інших процесах, зокрема у процесах проліферації шляхом зв'язування з промотором *c-myc*, виконуючи функцію пухлинного супресора та нейропротекторну функцію [17, 18].

Висновки: 1. Встановлено, що пригнічення обох ензиматичних функцій біфункціонального сенсорно-

сигнального ензиму ERN1, основного сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулуму, збільшує рівень експресії генів, що кодують синтез ENO1, ENO2, ALDOA та ALDOC у клітинах гліоми лінії U87, причому більш виражені зміни виявлені для генів ENO2 та ALDOC. 2. Показано, що збільшення експресії генів ENO1, ENO2 and ALDOA опосередковане ендорибонуклеазною активністю ензиму ERN1, оскільки пригнічення лише ендорибонуклеазної активності ERN1 має такий же ефект, як і пригнічення обох ензиматичних активностей ERN1. В той же час, збільшення рівня експресії гена ALDOC у клітинах гліоми з повним виключенням функції сигнального ензиму ERN1 можливо опосередковано кіназою ERN1, оскільки у клітинах з виключенням лише ендорибонуклеазної активності ERN1 змін в експресії гена ALDOC не виявлено. 3. Встановлено також, що експресія генів ENO1 та ALDOA регулюється переважно сенсорно-сигнальним ензимом ERN1, оскільки тунікамідин, індуктор стресу ендоплазматичного ретикулуму, не змінює експресію цих генів, а впливає на експресію лише генів ENO2 та ALDOC. Гіпоксія посилює експресію генів ENO1, ENO2, ALDOA та ALDOC в обох типах клітин, але у клітинах з повним пригніченням функції ERN1 ефект гіпоксії на експресію генів ENO2 та ALDOC є суттєво меншим. 4. Показано, що рівень експресії генів ENO1, ENO2 та ALDOC знижується при відсутності глутаміну у середовищі як у контрольних клітинах гліоми, так і у клітинах без функціонально активного ензиму ERN1, але у клітинах без ERN1 цей ефект на експресію гена ENO2 є значно більшим. Більше того, пригнічення функції ензиму ERN1 також змінює і ефект

дефіциту глюкози на експресію генів ENO1 та ENO2 у клітинах гліоми. 5. Результати досліджень свідчать про залежність експресії генів енолази та альдолази у клітинах гліоми U87 від функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1 і є чутливими до гіпоксії та відсутності глюкози або глутаміну у середовищі, причому ця чутливість здебільшого регулюється сигнальним ензимом ERN1.

Список використаної літератури. 1. Johnson A. B., Denko N., Barton M. C. // *Mutat. Res.* – 2008. – Vol. 640. – P. 174 – 179. 2. Denko N. C. // *Nature Reviews Cancer.* – 2008. – Vol. 8. – P. 705 – 713. 3. Zhang K., Kaufman R.J. *J. Biol. Chem.* – 2004. 279, N 25. – P. 25935 – 25938. 4. Bi M., Naczki C., Koritzinsky M. et al. *EMBO J.* – 2005. – 24, N 19. – P. 3470 – 34815. 5. Aragón T., van Anken E., Pincus D. et al. // *Nature.* – 2009. – 457, N 7230. – P. 736 – 740. 6. Fels D.R., Koumenis C. // *Cancer Biology & Therapy.* – 2006. – 5, N 7. – P. 723 – 728. 7. Korennykh A.V., Egea P.F., Korostelev A.A. et al. // *Nature.* – 2009. – 457, N 7230. – P. 687 – 693. 8. Moenner M., Pluquet O., Bouchecareilh M., Chevet E. // *Cancer Res.* 2007. – 67, N 22. – P. 10631 – 10634. 9. Romero-Ramirez L., Cao H., Nelson D. et al. *Cancer Res.* – 2004. – 64, N 17. – P. 5943 – 5947. 10. Acosta-Alvear D., Zhou Y., Blais A. et al. // *Molecular Cell.* – 2007. – 27. – P. 53 – 66. 11. Hollen J., Lin J.H., Li H. et al. // *J. Cell. Biol.* – 2009. – 186, N 3. – P. 323 – 331. 12. Lee J., Sun C., Zhou Y. et al. *Nature Medicine.* – 2011. – 17, N 10. – P. 1251 – 1260. 13. Zhou Y., Lee J., Reno C.M. et al. *Nature Medicine.* – 2011. – 17, N 3. – P. 356 – 365. 14. Park S.W., Zhou Y., Lee J. et al. *Nature Medicine.* – 2010. – 16, N 4. – P. 429 – 437. 15. Drogat B., Auguste P., Nguyen D.T. et al. // *Cancer Res.* – 2007. – 67. – P. 6700 – 6707. 16. Auf G., Jabouille A., Guérin S. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2010. – 107, N 35. – P. 1555 – 15558. 17. Yeh C.S., Wang J.Y., Chung F.Y. et al. *Oncol. Rep.* – 2008. – 19, N 1. – P. 81 – 91. 18. Hatakeyama K., Ohshima K., Fukuda Y. et al. *Proteomics.* – 2011 – 11, N 11. – P. 2275 – 2282. 19. Kounelakis M., Zervakis M., Giakos G. et al. *IEEE Trans Inf Technol Biomed.* – 2012. – May 14. [Epub ahead of print]. 20. Minchenko D.O., Kubajchuk K.I., Hubenia O.V. et al. *Adv. Biol. Chem.* – 2011. – 2, N 2. – P. 198 – 206.

Надійшла до редколегії 06.12.12

УДК 577.359:57.04:537.8:544.147.5/.032.5:546.41

М. Мельник, асп., В. Мартинюк, д-р біол. наук

СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ПРО ПЕРВИННІ Ca^{2+} -ОПОСЕРЕДКОВАНІ МЕХАНІЗМИ БІОЛОГІЧНОЇ ДІЇ СЛАБКИХ НИЗЬКОЧАСТОТНИХ ЕЛЕКТРОМАГНІТНИХ ПОЛІВ

Розглянуто основні теорії дії слабого електромагнітного поля на живі клітини. Показана важлива роль внутрішньоклітинних іонів, зокрема, кальцію як первинних мішеней дії фізичного фактору. Обговорюються експериментальні дані, що підтверджують теоретичні моделі щодо механізмів впливу слабого електромагнітного поля на живі клітини.

Ключові слова: електромагнітні поля, внутрішньоклітинні іони.

Рассмотрены основные теории действия слабого электромагнитного поля на живые клетки. Показана важная роль внутриклеточных ионов, в частности, кальция как первичных мишеней действия физического фактора. Обсуждаются экспериментальные данные, подтверждающие теоретические модели относительно механизмов влияния слабого электромагнитного поля на живые клетки.

Ключевые слова: электромагнитные поля, внутриклеточные ионы.

The main theories of weak electromagnetic influence on the living cells were considered. The main role of intracellular ions, particularly calcium, as primary targets affected by physical factor was shown. Some experimental data that verify theoretical models on the effect of weak electromagnetic influence on living cells had been discussed.

Keywords: electromagnetic fields, intracellular ions.

Вступ. Електромагнітне поле є невід'ємним фізичним фактором Землі, таким же як температура, освітлення, вологість. Живі організми за час існування та еволюції на нашій планеті пристосувались до впливу цього фактору, розробивши свої відповідні реакції на нього. Дослідження впливу електромагнітних полів на живі об'єкти є предметом магнітобіології. Велику цікавість для вчених являють собою слабкі електромагнітні поля (≥ 1 мТл), що за параметрами схожі на природні (геомагнітне поле в середньому 50 мкТл). Вплив слабких магнітних полів на живі об'єкти довгий час викликав сумніви. Але на сьогодні отримана достатня кількість експериментальних даних, що підтверджує вплив слабких полів на живі організми на усіх рівнях їх організації, – молекулярному, клітинному, органному. Головна проблема магнітобіології полягає у випередженні практикою теорії. Хоча різних теорій, моделей та гіпотез пояснення механізму дії електромагнітних полів на живі об'єкти існує багато, але чіткої й однозначної поки що

немає. Серед ряду існуючих, окремої уваги заслуговують ті, що пояснюють магнітобіологічні ефекти через вплив на йони в клітинах. З точки зору біофізики, особливо цікавим є вплив електромагнітних полів на йони кальцію, оскільки його роль є винятковою та безсуперечною для усіх типів живих клітин. Отже, в даному огляді ми зупинимось на теоріях, що пояснюють магнітобіологічні ефекти через вплив на йони Ca^{2+} (усі фізичні теорії магнітобіології описані в [55]).

Йон-резонансні теоретичні моделі впливу електромагнітних полів. Бінгі та Савін [55] умовно поділили всі моделі пояснення магнітобіологічних ефектів на три категорії: феноменологічні (стохастичний резонанс, складна поведінка кінетичних рівнянь, магніточутливі фазові переходи в біофізичних системах, "радіотехнічні" моделі), макроскопічні (біомагнетит в магнітному полі, Джоулеве тепло і вихрові електричні струми індуквані змінними магнітними полями, надпровідність на рівні клітинних структур та альфа-спіральных білкових

© Мельник М., Мартинюк В., 2013

молекул, магнітогідродинаміка) та мікроскопічні (рух заряджених частинок та частинок із спіном в магнітному полі, резонансні ефекти, осциляторні, інтерференційні, реакції за участі вільних радикалів, колективне збудження складних надмолекулярних систем). Тим не менш, найбільшу увагу дослідники звертають на іон-залежні механізми впливу електромагнітних полів, що згідно з вищенаведеної класифікації належать до категорії теоретичних мікроскопічних моделей. Згідно з гіпотезою Тенфорда [48], зовнішні електромагнітні поля індуюють струми в міжклітинному середовищі, що призводить до електрохімічних змін в біологічних мембранах. За гіпотезою Лібова [27], безпосередньою мішенню дії слабого магнітного поля (близько 50 мкТл) у біологічних об'єктах є йони Ca^{2+} , Mg^{2+} та, можливо, K^+ . Даний автор запропонував ідею, що магнітне поле може змінювати швидкість проходження цих йонів через канали цитоплазматичної мембрани за механізмом "циклотронного" резонансу, оскільки відповідні біологічно активні частоти комбінованого магнітного поля, що складається з постійної та змінної магнітної компоненти, формально співпадає з циклотронною частотою обертання йона, що рухається, відносно магнітного поля у вакуумі [24, 26]. Але в дійсності, циклотронний рух йонів в рідині є неможливим [24]. Тоді Лібов припустив, що лише всередині йонних каналів виникають задовільні умови для циклотронного руху. Це було б можливим тільки за умови, що канали цитоплазматичної мембрани спіралеподібно закручені і що йони Ca^{2+} рухаються в них не стикаючись і не викликаючи теплового руху [1, 28, 33]. Оскільки такий механізм не може функціонувати, теорія Лібова виявилась хибною.

Кіабрера зі співавторами [10] акцентують увагу на зв'язуванні йонів як першої сходинки подій при впливі слабких електромагнітних полів на живі клітини. В статті [13] автори говорять, що на поверхні цитоплазматичної мембрани є специфічні ділянки, які через свої фізико-хімічні властивості відштовхують молекули води. Біля цих ділянок йон втрачає свою гідратну оболонку і стикається з молекулами води вкрай рідко. Така теорія дозволяє математично описати взаємодію йона з електромагнітним полем. Але, тим не менш, виникає питання, як тепловий рух, енергія якого значно більша за енергію магнітного поля не порушує циркуляцію йона [4]. Певний акцент слід зробити на ідеях, що запропоновані Ледневим, які отримали назву теорії магнітного параметричного резонансу або, як її називають, "кальмодулінової" гіпотези [58]. Гіпотеза Лібова була помилковою [3, 11, 20, 43], але біоефективність "циклотронної" частоти була доведена експериментально [22, 26]. Леднев пояснив результати Лібова виходячи з уявлень про вплив комбінованих магнітних полів на зв'язані йони (в першу чергу,

Ca^{2+}), що регулюють швидкість біологічних реакцій, опосередкованих Ca^{2+} -кальмодуліном та протеїнкіназою-С [21, 23]. В теорії Леднева зв'язані йони розглядаються як осцилятори, які постійно та незалежно один від одного з'являються та розпадаються при постійній концентрації вільного Ca^{2+} . В основі теорії магнітного параметричного резонансу лежать такі уявлення [58]:

1) Ca^{2+} специфічно зв'язаний з Ca^{2+} -зв'язувальним центром білка є першою ланкою в ланцюгу подій при впливі слабких магнітних полів на біологічні об'єкти. Цей білок або сам має Ca^{2+} -залежну ферментативну активність (протеїнкіназа-С), або, як у випадку кальмодуліна, може модулювати активність інших ферментів. Взаємодія Ca^{2+} з білком має динамічний характер.

2) Зв'язаний Ca^{2+} розглядається як ізотропний осцилятор, що несе заряд, коливання якого збуджуються флуктуаціями структури білка, ударами оточуючих його кисневих лігандів. Збудження кожного з Ca^{2+} -осциляторів здійснюється незалежним чином. За момент збудження Ca^{2+} -осцилятора можна вважати момент його входу в Ca^{2+} -зв'язувальний центр білка. Вважається, що після такого збудження Ca^{2+} -осцилятор робить незатухаючі коливання, що припиняються лише його дисоціацією з центру зв'язування білка.

3) В кожному циклі Ca^{2+} -зв'язаних реакцій Ca^{2+} -осцилятор є частиною нерівноважної системи, в якій змінюється структура комплексу Ca^{2+} -білок та його енергія, яка викликається циклічними взаємодіями Ca^{2+} -залежного ферменту з субстратом та іншими лігандами. При цьому змінюється спорідненість Ca^{2+} до деяких центрів зв'язування.

4) Магнітне поле (постійне, змінне чи комбіноване) викликає прецесію вісі вібрацій Ca^{2+} -осцилятора відносно напрямлення магнітного поля. При певних взаємовідношеннях між часом життя Ca^{2+} -осцилятора та параметрами магнітного поля, можна суттєво змінити ступінь поляризації коливань Ca^{2+} -осцилятора в площині, перпендикулярній напрямленню магнітного поля.

5) Вірогідність зміни структури Ca^{2+} -зв'язувальних центрів в кожному циклі Ca^{2+} -залежних реакцій і, відповідно, вірогідність зміни спорідненості Ca^{2+} та Ca^{2+} -зв'язувальних центрів залежить від ступеню середньої за часом поляризації коливань Ca^{2+} -осцилятора. Така залежність лежить в основі біоефектів слабких магнітних полів. Очевидно, що в умовах термодинамічної рівноваги магнітне поле не впливає на спорідненість Ca^{2+} до центрів його зв'язування.

Поляризацію коливань Ca^{2+} -осцилятора в площині, перпендикулярній напрямку комбінованого магнітного поля, що рівне $B_{DC} + B_{AC} \cos 2\pi ft$, можна описати рівнянням [58]:

$$p = J_0^2 (2f_L/f) \frac{1}{1+f_c/\lambda^2} + \sum_{n=0}^{\infty} J_n^2 (2f_L/f) \left[\frac{1}{1+(nf-f_c)^2/\lambda^2} + \frac{1}{1+(nf+f_c)^2/\lambda^2} \right], \quad (1)$$

де J_0 та J_n – функції Бесселя нульового та n -го порядків, відповідно; $f = \Omega/2\pi$, $f_c = \Omega_c/2\pi$, $f_L = \Omega_L/2\pi$ – кругові частоти (Гц), де $\Omega_c = qB_{DC}/m$ – величина інтервалу між Зеємановськими коливальними підрівнями (в частотних одиницях), що формально збігаються з виразом для циклотронної частоти; Ω_L – величина, що відповідає Ларморовій частоті, $\lambda = 1/2\pi\tau = k/2\pi$, де τ – середній час життя осцилятора в центрі зв'язування білка, що відпові-

дає часу життя електрона у збудженому стані, $k = 1/\tau$ – константа дисоціації йона з цього центру.

При впливі на осцилятор лише постійного магнітного поля, з виразу (1) отримуємо:

$$p = 1/(1+f_c^2/\lambda^2). \quad (2)$$

При впливі на осцилятор тільки змінного магнітного поля $B_1 \cos 2\pi ft$, з (1) отримуємо:

$$p = J_0^2 (2f_L/f) \frac{2J_1^2(2f_L/f)}{1+f^2/\lambda^2} + \frac{2J_2^2(2f_L/f)}{1+4f^2/\lambda^2} + \frac{2J_3^2(2f_L/f)}{1+9f^2/\lambda^2} + \dots \quad (3)$$

В більшості випадків біоефекти магнітних полів можуть пояснюватись зміною констант швидкості деяких Ca^{2+} -залежних ферментативних реакцій. Можливо, ступінь поляризації коливань Ca^{2+} -осцилятора впливає на вірогідність змін Ca^{2+} -зв'язувальних властивостей білку при впливі, що виводить його зі стану рівноваги. Така ситуація може мати місце в ході деяких Ca^{2+} -залежних реакцій, наприклад в кожному циклі фосфорилювання субстрату Ca^{2+} -кальмодулін-залежною кіназою чи протеїнкіназою-С [58]. Відомо, що в результаті приєднання до комплексу кальмодулін-кіназа молекули легкого ланцюга міозину, вільна енергія зв'язаних йонів Ca^{2+} кальмодуліном змінюється на -1,9 ккал/моль [30]. Можна вважати, що обумовлена енергетичним спряженням зміна константи зв'язування Ca^{2+} в кожному циклі Ca^{2+} -кальмодулін-протеїнкіназа-С-залежної реакції визначається ступенем поляризації коливань Ca^{2+} -осцилятора [58].

Дія слабого магнітного поля на системи, що знаходяться в термодинамічній рівновазі, наприклад, розчин Ca^{2+} -зв'язувального білку та CaCl_2 , не зможе вплинути на рівновагу системи, зокрема, змінити константи зв'язування Ca^{2+} з Ca^{2+} -зв'язувальними центрами білку. Магнітне поле з індукцією до 200 мкТл може змінити енергію кожного з атомів системи лише на величину, що на 8-10 порядків нижче його власної теплової енергії. Тому негативні результати стосовно впливу слабого магнітного поля на зв'язування Ca^{2+} в термодинамічно рівноважній розчині CaCl_2 і кальмодуліну [9] є закономірними [58].

З формули (1) можна вивести, що величина біоефекту резонансно залежить від частоти змінної компоненти поля, і максимальний ефект досягається при частотах рівних "циклотронній" частоті та її субгармонікам, тобто при:

$$f = f_c / n = qB_{DC} / mn, n = 1, 2, 3, \dots \quad (4)$$

Теоретичні припущення отримали певні експериментальні підтвердження. Було показано, що максимальний біоефект досягався при частотах рівних "циклотронній" частоті та її субгармонікам [22, 24, 26, 52]. В роботах [1, 34, 35, 46] вказується на наявність лінійної залежності величини біоефекту "циклотронної" частоти від величини магнітної індукції постійної компоненти магнітного поля. Резонансна відповідь деяких біосистем має вузький пік від частки до кількох Герц, як наприклад, зміна швидкості фосфорилювання легких ланцюгів міозину при впливі комбінованого магнітного поля характеризувалась резонансною відповіддю в 0,5 Гц, що відповідає дисоціації Ca^{2+} з кальмодуліна [62]. Можна вважати, що комбіновані магнітні поля впливають на взаємодію двох із чотирьох сайтів зв'язування Ca^{2+} в кальмодуліні, що утворює комплекс з кіназою легких ланцюгів міозину. Це припущення було підтверджено експериментально [30]. Також було підтверджено залежність біоефектів комбінованого магнітного поля від співвідношення величин магнітної індукції кожного з компонентів – постійного та змінного [41, 56, 59]. В роботі [62] автор показує, що Ca^{2+} -кальмодулін-залежне фосфорилювання легких ланцюгів міозину сильно змінювалось при дії магнітного поля в режимі параметричного резонансу для Ca^{2+} . Показано, що рухова активність одноклітинних водоростей зростала при дії на них комбінованого магнітного поля налаштованого на "циклотронний" резонанс Ca^{2+} (основна частота Ca^{2+} становить 60 Гц), але інгібувалась при дії магнітних полів налаштованих на "циклотронний" резонанс K^+ [35]. Це було показано й на інших тест-системах [12, 45]. В роботах [31, 32] доведено експериментально, що Ca^{2+} -залежне фосфорилювання легких ланцюгів міози-

ну залежить від величини постійного магнітного поля в межах до 200 мкТл. Також є ряд експериментальних робіт, де продемонстровано вплив слабких змінних магнітних полів на інші об'єкти [36-38, 44, 52]. Отже, загалом теорія Леднева є досить цікавою і до того ж має практичні підтвердження, але деякі з її припущень ще потребують доказів та пояснень. Тому її можна розглядати як перспективну для пояснення магнітобіологічних ефектів. Існує припущення, що важливу роль в магнітобіологічних ефектах відіграє активація реакцій обміну фосфатидилінозитол 4, 5-дифосфату (PIP2) – фосфоліпиду клітинних мембран, що призводить до утворення вторинних посередників (інозитол 1, 4, 5-трифосфату й діацилгліцеролу), які, в свою чергу, впливають на рівень вільного Ca^{2+} в клітині [53]. Також увагу приділяють "кальцій-гідратаційній" теорії первинних фізико-хімічних реакцій біосистем на вплив магнітних полів [57]. Згідно з нею, вільні йони Ca^{2+} виконують роль посередника в магнітобіологічних ефектах, який змінює властивості рідини, в якій знаходиться дварий йон. Автор теорії до того ж припускає участь вторинних посередників, таких як циклічний АМФ, і ендогенних опіоїдів в гальмівній дії магнітного поля.

Інші автори [7, 54] для пояснення магнітобіологічних ефектів використали фізичне явище інтерференції квантових станів. Різне за величиною магнітне поле змінює фази хвильових функцій зарядженої частинки. А інтерференція зв'язує зміни фаз із спостережуваними величинами. Інтерференцію квантових станів спостерігають як для вільних частинок, так і для зв'язаних. Можливість існування інтерференції важких зв'язаних частинок (йонів) в біофізичних системах було підтверджено експериментально [5-7]. Інтерференція квантових станів в атомній спектроскопії пов'язана з когерентними квантовими переходами в атомі й не пов'язана з внутрішньою структурою хвильових функцій електрону. Тоді як саме ця внутрішня структура йонних функцій визначає інтерференцію йонів в білковій порожнині при дії змінного магнітного поля та за відсутності квантових переходів. Біоефекти, що пояснюються механізмом інтерференції, спостерігалися в різних експериментах. Математично розраховано залежність вірогідності дисоціації комплексу йон-білок від характеристик магнітного поля, частоти змінної компоненти, величин і взаємної орієнтації постійної та змінної компонент. Параметри спектрів інтерференції залежать від мас, зарядів та магнітних моментів йонів, і в більшості досліджень за цими характеристиками найбільш оптимально відповідали йони Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} та H^+ , гірше – K^+ .

Цікаву математичну модель трансмембранного перенесення запропонували Резніченко і Плюсіна зі співавторами [61], в якій виникають затухаючі коливання концентрації йонів у відповідь на змінне електричне поле. В даній роботі показано резонансний характер збільшення концентрації йонів в примембранному шарі від потенціалу середовища в присутності дії змінного електричного поля. Резонансна частота для калій-протонного антипорту за участю нігеріцину є меншою за 1 Гц, тобто наднизькою частотою. Напруженість експериментального електричного поля складала 0,0005 від такої в примембранній області. При цьому різниця рН становила від 0,04 до 1,18. Виникає питання, як така мала енергія електричного поля може спричинити таку відчутну відповідь. Автори висувають припущення, що при дії низькочастотних полів сприймати ці впливи можуть не молекули, а субклітинні структури, і будучи не-

лінійними системами, вони слугують при цьому підсилювачами, що створюють як наслідок коливання рН і концентрації йонів K^+ , Ca^{2+} та інших. До того ж, дія низькоінтенсивного електричного поля може посилюватись через нелінійність самої системи трансмембранного транспорту. Згодом ці ж автори [60] показали дію слабого електромагнітного поля на тригер трансмембранного транспорту. При дії низькочастотного поля можливі переходи з одного стійкого стану системи в інший, що відповідає коливанням рН та концентрації примембранних йонів. Автори припускають, що мультистаціонарні мембранні транспортери можуть регулюватись низькочастотними слабкими електромагнітними полями. При цьому, зміна потенційно можливих режимів функціонування системи відбувається при певних критичних частотах електромагнітного поля. Схожа ідея, як в [60, 61], була в Лібова [25].

Халгамуге й Абейратне [19] проаналізували поведінку йона в електромагнітному полі та показали, що як теорія циклотронного резонансу, так і теорія параметричного резонансу в дійсності не є коректними. Магнітобіологічні ефекти в клітинах необхідно пояснювати іншим чином, можливо механізмом змусеного коливання йонів [2, 40]. Автори статті роблять такі висновки [19]:

1) коли електромагнітне поле нульове, пояснення біоефектів задовольняється теорією циклотронного резонансу, якщо змінне і постійне магнітні поля паралельні чи змінне електричне і постійне магнітне поля перпендикулярні між собою. До того ж циклотронна поведінка можлива за присутності перпендикулярних змінного і постійного магнітних полів. Резонансна поведінка з'являється не лише на циклотронних частотах та їх субгармоніках, а й на інших частотах в залежності від конфігурації поля.

2) Коли електричне поле нульове, для паралельних змінного і постійного магнітних полів, рух частинок описується функцією Бесселя $J_1(B_{AC}/B_{DC})$, що задовольняє теорію параметричного резонансу. Хоча, якщо приймати до уваги змінне електричне поле, частинки зміщуються з B_{AC}/B_{DC} за функцією Бесселя $J_1(1.5B_{AC}/B_{DC})$ в резонансному стані.

3) Коли змінне магнітне поле нульове, зміщення частинок з E_0/B_{DC} є лінійним для перпендикулярних змінного електричного та постійного магнітних полів.

4) Частоти та кути, що впливають на мінімальне та максимальне зміщення частинок, змінюються в залежності від початкового положення та швидкості.

5) Зміщення частинок збільшується зі збільшенням початкової позиції та початкової швидкості.

6) Вплив комбінованого магнітного поля на зміщення більший ніж такий змінного магнітного поля.

7) Зміщення зменшується, а резонанси зникають зі збільшенням в'язкості середовища.

8) Зміщення частинок може збільшуватись внаслідок дії випадкових шумів.

Як згадувалось вище, в магнітобіології практика випереджує теорію, і на сьогодні отримана достатня кількість даних стосовно впливу слабких електромагнітних полів на живі організми в цілому та клітини зокрема. Були показані біоефекти постійного магнітного поля (35 мТл, 350 Е) на тучні клітини [49]. Крім того, біоефекти на тучних клітинах спостерігались і при дії змінного електромагнітного поля з частотою 1-100 Гц та індукцією 25 мкТл [52]. При цьому, було показано, що деградація тучних клітин збільшувалась при частотах 2, 8-

10, 50, 72-74 Гц, а при частоті 32-34 Гц – навпаки, зменшувалась. Постійне магнітне поле з індукцією 180 мТл збільшувало концентрацію мінералів в кістковій тканині при остеопорозі поперекового відділу хребта щурів [51].

Для вивчення впливу зовнішніх факторів на живі клітини найбільшу цікавість представляють збудливі клітини – такі, що здатні генерувати потенціали дії. Як відомо, до збудливих клітин належать нервові, м'язові та ендокринні. На них також був проведений ряд досліджень по впливу слабких магнітних полів. Так, було показано, що змінне магнітне поле в 40 Гц та з індукцією 7 мТл викликало збільшення кисневих вільних радикалів в серцевому м'язі [18]. Автори [47] вивчали проліферацію клітин різних типів і, зокрема, гладеньком'язових клітин аорти під впливом електромагнітного поля з параметрами 60 Гц і 2 мТл. При дії такого поля впродовж трьох годин за день через два тижні проліферація гладеньком'язових клітин зменшилась, тоді як лімфобластів-В, що знаходились в тих самих умовах, збільшилась. А в роботі [15] було продемонстровано, що культура скелетно-м'язових клітин при дії низькочастотного магнітного поля (60 Гц, 1-4 мТл) проліферувала у напрямку дії поля. Негативний ефект давало електромагнітне поле частотою 50 Гц на залозистий епітелій простати [42]. Магнітобіологічні дослідження проводились на серцевому м'язі [14], інтерстиціальних клітинах Кахалі [29]. Є роботи присвячені дослідженню впливу магнітних полів на мікроциркуляцію в судинах [8, 16, 17, 39, 50]. Але, при цьому, експериментальних даних стосовно впливу слабких електромагнітних полів на активність самих гладеньком'язових клітин немає. Враховуючи актуальність таких досліджень, це має стати справою майбутнього.

Висновки. Аналіз літератури свідчить, що єдиної, несуперечливої та абсолютно вірної теорії, що пояснює механізми впливу слабких низькочастотних електромагнітних полів на живі системи, немає. Водночас з цим, біологічна активність електромагнітних полів неодноразово була підтверджена експериментально, при чому на збудливих і не збудливих клітинах, на різних органах та живих організмах в цілому. Найбільш адекватними з точки зору відповідності експериментальним даним є теоретичні моделі, які базуються на резонансних (йон-резонансних) явищах. При цьому, ключову роль відіграють йони кальцію, які є одними з головних ланок у внутрішньоклітинній регуляції різноманітних функцій клітини.

Список використаної літератури. 1. $^{45}Ca^{2+}$ cyclotron resonance in human lymphocytes / Liboff A. R., Rozek R. J., Sherman M. L. and other. – J. Bioelectricity. – 1987. – N 8. – P. 12–22. 2. A mechanism for action of oscillating electric fields on cells / Panagopoulos D. J., Messina N., Karabarbounis A. and other. – Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2000. – Vol. 272, N. 3. – P. 634–640. 3. Adair R. K. Constraints on biological effects of weak extremely-low-frequency electromagnetic fields // Physical Review A. – 1991. – Vol. 48. – P. 1039–1048. 4. Adair R. K. On the model of parametric resonance in combined magnetic fields // Bioelectromagnetics. – 1992. – N 13. – P. 231–236. 5. Binh V. N. A formula for frequency and amplitude windows of some ELF and null MF bioeffects follows from the Schrodinger equation // Electricity and Magnetism in Biology and Medicine / Ed. Bersani F. – London: Kluwer/Plenum. – 1999. – P. 417–421. 6. Binh V. N. Interference mechanism for some biological effects of pulsed magnetic fields // Bioelectrochem. Bioenerg. – 1998. – Vol. 45, N. 1. – P. 73–81. 7. Binh V. N. Interference of ion quantum states within a protein explains weak magnetic field's effect on biosystems // Electro Magnetobiol. – 1997. – Vol. 16, N 3. – P. 203–214. 8. Biological effects of static magnetic fields on the microcirculatory blood flow in vivo: a preliminary report / Ichioka S., Iwasaka M., Shibata M. and other. – Med Biol Eng Comput. – 1998. – Vol. 36, N. 1. – P. 91–95. 9. Calcium binding to metallochromic dyes and calmodulin in the presence of combined, AC-DC magnetic fields / Brukner-Lea C., Durney C. H., Janata J. and other. – Bioelectromagnetics. – 1992. – Vol. 13, N. 2. – P. 147–162. 10. Chiabrera A., Bianco B., Bruna S., Giordano S. Bioelectromagnetics: The State of the Science // Rivista di Biologia / Biology Forum 91. – 1998. – P. 233–246. 11. Durney C. H., Rush

forth C. K., Anderson A. A. Resonant DC AC magnetic fields: Calculated response // *Bioelectromagnetics*. – 1988. – Vol. 9. – P. 315-336. 12. Effects of weak magnetic field on the rate of cell proliferation in cell culture / Rochev Y. A., Narimanov A. A., Sosunov E. A. and other. – *Stud. Biophys.* – 1990. – Vol. 135, N. 2. – P. 93-98. 13. Electric and magnetic field effects on ligand binding to the cell membrane / Chiabrera A., Bianco B., Caratozulo F. and other. – Chiabrera C., Nicolini C., Schwan M. P. eds. "Interaction between electromagnetic field and cells". – London Plenum Press. – 1985. – P. 253-280. 14. Electromagnetic Field at 15.95–16 Hz is Cardio Protective Following Acute Myocardial Infarction / Barzelai S., Dayan A., Feinberg M. S. and other. – *Annals of Biomedical Engineering*. – 2009. 15. Environmental Design for Muscle Cell Culture with Magnetic Field / Hashimoto S., Mochizuki S., Yusuke Morita Y. and other. – *Digital EcoSystems and Technologies Conference*. – 2007. – DEST '07. – P. 468-472. 16. Gmitrov J. Static magnetic field effect on the arterial baroreflex-mediated control of microcirculation: implications for cardiovascular effects due to environmental magnetic fields // *Radiat Environ Biophys.* – 2007. – Vol. 46, N. 3. – P. 281-290. 17. Gmitrov J., Ohkubo C., Okano H. Effect of 0.25 T static magnetic field on microcirculation in rabbits // *Bioelectromagnetics*. – 2002. – Vol. 23, N. 3. – P. 224-229. 18. Goraca A., Ciejkka E., Piechota A. Effects of extremely low frequency magnetic field on the parameters of oxidative stress in heart // *Journal of Physiology and Pharmacology*. – 2010. – Vol. 61, N. 3. – P. 333-338. 19. Halgamuge M. N. and Abeyaratne C. D. Behavior of Charged Particles in a Biological Cell Exposed to AC-DC Electromagnetic Fields // *Environmental Engineering Science*. – 2011. – Vol. 28. – N. 1. – P. 1-10. 20. Halle B. On the cyclotron resonance mechanism for magnetic field effects on transmembrane ion conductivity // *Bioelectromagnetics*. – 1988. – Vol. 9. – P. 381-385. 21. Lednev V. V. Electricity and Magnetism in Biology and Medicine // San Francisco: San Francisco Press. – 1993. – P. 550. 22. Lednev V. V. On the nature of electromagnetic field interactions with biological systems // Landers R. G. Company: Medical Intelligence Unit. – 1994. – P. 59. 23. Lednev V. V. Possible mechanism for the influence of weak magnetic fields on biological systems // *Bioelectromagnetics*. – 1991. – V. 12. – P. 71-75. 24. Liboff A. R. Cyclotron resonance in membrane transport // Chiabrera C., Nicolini C., Schwan M. P. eds. Interaction between electromagnetic field and cells. – London Plenum Press. – 1985. – P. 281-296. 25. Liboff A. R. Electric-field ion cyclotron resonance // *Bioelectromagnetics*. – 1997. – Vol. 18. – № 1. – P. 95-97. 26. Liboff A. R. Interaction mechanisms of low-level electromagnetic fields and living systems. Eds. Norden B., Ramel C. // Oxford: Oxford Univ. Press. – 1992. – P. 130. 27. Liboff A. R. The electromagnetic field as a biological variable // On the nature of electromagnetic field interactions with biological systems. Eds. Frey A. N., Langes R. J. Co. – Austin, 1994. – P. 59-72. 28. Liboff A. R., McLeod B. R. Kinetics of channelized membrane ions in magnetic fields // *Bioelectromagnetics*. – 1988. – N 9. – P. 12-22. 29. Loss of interstitial cells of cajal after pulsating electromagnetic field (pemf) in gastrointestinal tract of the rats / Kaszuba-Zwoińska J., Gil K., Ziomer A. and other. – *Journal of Physiology and Pharmacology*. – 2005. – Vol. 56, N. 3. P. 421-432. 30. Mamar-Bachi A., Cox Y. A. Quantitative analysis of the free energy coupling in the system calmodulin, calcium, smooth muscle myosin light chain kinase // *Cell Calcium*. – 1987. – Vol. 8. – P. 473-482. 31. Markow M. S., Ryaby J. T., Kaufmann J. J., Pilla A. Extremely weak AC and DC magnetic field significantly affect myosin phosphorylation // In: Allen M. J., Cleary S. F., Sowers A. E., Shillady D. D., eds. Charge and Field Effects in Biosystems-3, Birkhauser, Boston. – 1992. – P. 225-230. 32. Markow M. S., Wong S., Pilla A. Effects of weak low frequency sinusoidal and DC magnetic fields on myosin phosphorylation in cell-free preparation // *Bioelectrochem. Bioenerg.* – 1993. – Vol. 30. – P. 119-125. 33. McLeod B. R., Liboff A. R. Dynamic characteristics of membrane ions in multifold configurations of low frequency electromagnetic radiation // *Bioelectromagnetics*. – 1986. – N 7. – P. 177-189. 34. McLeod B. R., Smith S. D., Cooksey K. E., Liboff A. R. Ion cyclotron resonance frequencies enhance Ca^{2+} -dependent motility in diatoms // *J. Bioelectricity*. – 1987. – Vol. 6. – P. 1-12. 35. McLeod B. R., Smith S. D., Liboff A. R. Calcium and potassium cyclotron resonance curves and harmonics in diatoms // *J. Bioelectricity*. – 1987. – Vol. 6. – P. 153-168. 36. Mehta S., Berg M., Cerrato J. and other // Ann. review of research on biological effects of electric and magnetic fields from the generation, delivery and use of electricity, Albuquerque, 1994. 37. Mehta S., Berg M., Deeds S. and other // Ann. review of research on biological effects of electric and magnetic fields

from the generation, delivery and use of electricity, Albuquerque, 1994. 38. Mehta S., Cyan O., Blackinton D. and other // 16th Ann. Meet. Bioelectromagnetics Soc., Copenhagen, 1994. 39. Morris C. and Skalak T. Static Magnetic Fields Alter Arterial Tone InVivo // *Bioelectromagnetics*. – 2004. – P. 1-9. 40. Panagopoulos D. J., Karabarbounis A., and Margaritis L. H. Mechanism for action of electromagnetic fields on cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2002. – Vol. 298, N. 1. – P. 95-102. 41. Prato F. S., Kavaliers M., Carson J. J., Ossenkopp K. P. Possible mechanisms by which extremely low frequency magnetic fields affect opioid function // *FASEB*. – 1995. – Vol. 9. – P. 807-814. 42. Pre and post natal exposure of 50 Hz electromagnetic fields on prostate glands of rats: an electron microscopy study / Khaki A. A., Arash Khaki D. V. M., Garachloulou S. and other. – *Iranian Journal of Reproductive Medicine*. – 2008. – Vol. 6, N. 2. – P. 77-82. 43. Sandweiss J. On the cyclotron resonance model of ion transport // *Bioelectromagnetics*. – 1990. – Vol. 11. – P. 203-205. 44. Smith S. D., McLeod B. R., Liboff A. R. Effects of CR-tuned 60 Hz magnetic fields on sprouting and early growth of *Raphanus sativus* // *Bioelectrochem. Bioenerget.* – 1993. – Vol. 32. – P. 67-76. 45. Smith S. D., McLeod B. R., Liboff A. R. Effects of resonant magnetic fields on chick femoral development in vitro // *Bioelectromagnetics*. – 1991. – V. 10. – P. 81-99. 46. Smith S. D., McLeod B. R., Liboff A. R., Cooksey K. E. Calcium cyclotron resonance and diatom motility // *Bioelectromagnetics*. – 1987. – Vol. 8, N. 3. – P. 215-227. 47. Sul A. R., Park S.-N. and Suh H. Effects of Sinusoidal Electromagnetic Field on Structure and Function of Different Kinds of Cell Lines // *Yonsei Medical Journal*. – 2006. – Vol. 47, N. 6. – P. 852-861. 48. Tenforde T. S., Kaune W. T. Interaction of extremely low frequency electric and magnetic fields with humans // *Health Phys.* – 1987. – N 53. – P. 585-606. 49. Turieva-Dzodzikova M. E., Salbiev K. D., Kokabazde S. A. The tissue basophils of the rat mesentery under the influence of a permanent magnetic field // *Morfologiya*. – 1995. – Vol. 108, N. 1. – P. 46-49. 50. Xu S., Okano H., Ohkubo C. Acute effects of whole-body exposure to static magnetic fields and 50-Hz electromagnetic fields on muscle microcirculation in anesthetized mice // *Bioelectrochemistry*. – 2001. – Vol. 53, N. 1. – P. 127-135. 51. Xu S., Okano H., Tomita N. and Ikada Y. Recovery Effects of a 180mT Static Magnetic Field on Bone Mineral Density of Osteoporotic Lumbar Vertebrae in Ovariectomized Rats // *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. – 2011. – P. 1-8. 52. Абу Хада Р. Х., Мартынюк В. С. Реакция тучных клеток на действие переменных магнитных полей в условиях in vitro // Ученые записки Таврического национального университета имени Вернадского В. И., серия "биология". – 2001. – Том 14, № 2. – С. 3-7. 53. Агаджанян Н. А., Макарова И. И. Магнитное поле Земли и организм человека // Экология человека. – 2005. – № 9. – С. 3-9. 54. Бинги В. Н. Механизм магниточувствительного связывания ионов некоторыми белками // Биофизика. – 1997. – Т. 42. – С. 338-342. 55. Бинги В. Н., Савин А. В. Физические проблемы действия слабых магнитных полей на биологические системы // УФН. – 2003. – Т. 173, № 3. – С. 265-300. 56. Влияние слабого комбинированного магнитного поля на скорость регенерации планарий *Dugesia tigrina* / Тирас Х. П., Сребницкая Л. К., Ильясова Е. В. и др. – Биофизика. – 1996. – Т. 40, № 4. – С. 826-831. 57. Григорян Г. Е. Магниторецепция и механизмы действия магнитных полей на биосистемы // Ереван: Гитутюн. – 1995. – 54 с. 58. Леднев В. В. Биоэффекты слабых комбинированных, постоянных и переменных магнитных полей // Биофизика. – 1996. – Т. 41, № 1. – С. 224-232. 59. Магнитный параметрический резонанс в биосистемах: экспериментальная проверка предсказаний теории с использованием регенерирующих планарий *Dugesia tigrina* в качестве тестсистемы / Леднев В. В., Сребницкая Л. К., Ильясова Е. В. и др. – Биофизика. – 1996. – Т. 41, № 4. – С. 815-825. 60. Плюснина Т. Ю., Резниченко Г. Ю., Аксенов С. И., Черняков Г. М. Влияние слабого электрического воздействия на триггерную систему трансмембранного ионного переноса // Биофизика. – 1994. – Т. 39. – № 2. – С. 345-349. 61. Резниченко Г. Ю., Плюснина Т. Ю., Воробьева Т. Н. и др. Модель отклика мембранной транспортной системы на переменное электрическое поле // Биофизика. – 1993. – Т. 38. – № 4. – С. 667-671. 62. Шувалова Л. А., Островская М. В., Сосунев Е. А., Леднев В. В. Влияние слабого магнитного поля в режиме параметрического резонанса на скорость кальмодулин зависимого фосфорилирования миозина в растворе // ДАН СССР. – 1991. – Т. 317, № 1. – С. 227-230.

Надійшла до редколегії 15.11.12

УДК 612.82/83; 612.821

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

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

В результаті аналізу ЕЕГ в 16 відведеннях в дельта-, тета-, альфа-, бета1-, та бета2-діапазонах було виявлено, що функціональна система оперативної пам'яті у жінок при підвищенні рівня складності стимулів кардинально не перебудовується. Спостерігались лише певні локальні зміни: зниження синтаксичного аналізу стимулів – стимули запам'ятовувались скоріше як цілісні об'єкти, тобто відбувалось звуження нейромереж обробки інформації за рахунок підсистеми абстрактно-вербального мислення та зниження рівня уваги. При цьому спостерігалось збільшення активності в локальних структурах пам'яті. Крім цього, відбувалось зміщення центру уваги: зменшувалась концентрація на правильних відповідях та збільшувалась – на помилкових.

Ключові слова: абстрактно-вербальне мислення, локальні структури пам'яті, головний мозок

В результате анализа ЭЭГ в 16 отведениях в дельта-, тета-, альфа-, бета1- и бета 2 – диапазонах было обнаружено, что функциональная система оперативной памяти у женщин при повышении уровня сложности стимулов кардинально не перестраивается. Наблюдались лишь определенные локальные изменения: снижение синтаксического анализа стимулов – стимулы запоминались скорее как целостные объекты, т.е. происходило сужение нейросетей обработки информации за счет подсистемы абстрактно-вербального мышления и снижение уровня внимания. При этом наблюдалось увеличение активности в локальных структурах памяти. Кроме этого, происходило смещение центра внимания: уменьшалась концентрация на правильных ответах и увеличивалась – на ложные.

Ключевые слова: абстрактно-вербальное мышление, локальные структуры памяти, головной мозг

As a result of analysis of the EEG in 16-lead in the delta, theta, alpha, beta1 and beta2 bands it was found that the functional system working memory for women at the increase of level of the difficulty does not fundamentally restructured. There were only certain local changes: reducing of syntactic analysis of stimuli – the stimuli are remembered more as integral objects, there was the narrowing of neural networks processing subsystem through abstract verbal thinking and decreased the level of attention. At that, the activity in the local memory structures was increased. In addition, there was the shift of the center of attention: the concentration decreased to the correct answer and increased – on erroneous.

Keywords: through abstract verbal, local memory structures, brain.

Вступ. В сучасному динамічному та інформаційно-насиченому світі навантаження на психіку людини зростає. Так, за останні три десятиріччя було вироблено інформації більше, ніж за останні 5 тисячоріч. Більше 9000 періодичних видань видаються тільки в США і більше 1000 книг видаються щоденно в світі. Часто виникають ситуації, коли людина є пригніченою різноманітною інформацією, яка її оточує. Деякі люди в результаті інформаційного перенавантаження відчувають дезорієнтацію, депресію, запаморочення, інколи ейфорію та маніакальні стани. Як було встановлено, дезорієнтація та інші психофізіологічні негативні ефекти є корельованими з пізнавальним перенавантаженням, що є абсолютно неприпустимим в системах, коли прийняття рішення людиною торкається безпеки життя інших людей [1,2]. Особливо актуальною, наприклад, ця проблема є для військових. Так, при розробці концепції конкурентної переваги військових США проти майбутніх супротивників проблему ментального перенавантаження виділено як таку, що критично послаблює військову потужність. В NASA визначають інформаційне перенавантаження як ситуацію, коли інформаційні процеси потребують такого індивідуального часу для виконання операцій взаємодії та внутрішнього оцінювання, який переважає доступні ресурси часу [2]. Під інформаційним перенавантаженням також розуміють інформаційний синдром втоми, інформаційний вибух, інформаційне перенасичення [1,2]. Розрізняють особистісне (надмірний обсяг інформації) та організаційне (некерованість інформаційними потоками) інформаційне перенавантаження. Особистісне інформаційне перенавантаження може бути викликане великим обсягом непотрібної та незначущої інформації, недостатнім часом для усвідомлення інформації, одночасним багатоджерельним її надходженням [2]. Дослідження ролі ритмів ЕЕГ в забезпеченні інтегративної діяльності мозку людини при різних когнітивних навантаженнях є одним з провідних напрямків у сучасній нейрофізіології. Відомо також, що жінки краще виконують декілька завдань одночасно,

порівняно з чоловіками, однак невідомо, як змінюється електрична активність головного мозку жінок при зростаючому рівні складності одномодального завдання. Тому метою роботи було дослідити зміни активності головного мозку жінок при запам'ятовуванні геометричних фігур з однією та двома ознаками.

Об'єкт та методи досліджень. В експериментах як обстежувані добровільно взяли участь 10 жінок, правші, віком 19-21 рік, студенти 2-4 курсів Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Впродовж дослідження кожний обстежуваний послідовно проходив 2 комп'ютерні субтести оцінки розвитку короткочасної пам'яті. В першому субтесті оцінювалась оперативна пам'ять на прості геометричні фігури (Г1): круг, еліпс, квадрат, ромб, та інш. Обстежуваному для запам'ятовування пред'являлась деяка множина простих геометричних фігур, кількість яких у цій множині послідовно зростала від 2 до 7. Кожна множина фігур у субтесті повторювалась по 10 разів з випадковою комбінацією різних фігур. Час експозиції кожної множини фігур складав 1.5 с, після чого зображення фігури згасали, а через 1 с з'являлась тестова фігура стосовно якої необхідно було відповісти, чи була вказана фігура в попередній множині. В другому субтесті оцінювалась оперативна пам'ять на геометричні фігури з двома ознаками (Г2): форма (круг, еліпс, квадрат та прямокутник) і зафарбування вертикальної або горизонтальної половини фігури. Другий субтест був організований за аналогічною схемою. Другий субтест моделював стан інформаційного перенавантаження, оскільки за попередніми дослідженнями [3] виявлено, що рівень складності цього завдання є надмірним для більшості обстежуваних – в них вже при пред'явленні 4 стимулів різко зростала кількість помилок, а латентні періоди реакції падали, що свідчило про хаотичність, випадковість відповіді. В усіх субтестах реєстрували час реакції в мс з точністю до 10 мс, після чого обчислювався середній час реакції на певну кількість подразників в мс з точністю до 1 мс, крім того, фіксувалась правильність/ помилковість від-

повіді [3]. В усіх обстежуваних реєстрували електроенцефалограму (ЕЕГ) до початку обстеження (3 хв. фоновий запис, проба з заплющеними та відкритими очима) та під час проведення тестування. Для реєстрації та аналізу ЕЕГ використовували комплекс "Нейрон-Спектр-4/ВП" (ЕС-сертифікат № RQ043131-V від 08.11.2004р.). Обстежувані знаходились в звукоізолюваному приміщенні, з ними підтримувався аудіо-зв'язок. Запис ЕЕГ здійснювався монополярно, референтний електрод було розташовано на мочці вуха з кожної сторони, частота квантування ЕЕГ дорівнювала 500 Гц. Було використано чашечкові посріблені електроди, які накладались за міжнародною системою 10-20 у 16 стандартних відведеннях Fp1, Fp2, F3, F4, F7, F8, C3, C4, T3, T4, T5, T6, P3, P4, O1, O2. В кожному відведенні для частотних діапазонів ЕЕГ – δ - (0,5-3,9 Гц), θ - (4,0-7,9 Гц), α - (8,0-12,9 Гц), β_1 - (13,0-19,9 Гц), β_2 - (20,0-35,5 Гц) за допомогою програми "Нейрон-Спектр" обчислювались наступні показники: максимальна амплітуда спектру у відведенні – $A_{\text{максимальна}}$, мкВ/с; максимальна потужність спектру у відведенні – $S_{\text{максимальна}}$, мкВ²/с²; середня амплітуда спектру у відведенні – $A_{\text{середня}}$, мкВ/с; середня потужність спектру у відведенні – $S_{\text{середня}}$, мкВ²/с²; повна амплітуда спектру у відведенні – $A_{\text{повна}}$, мкВ/с; повна потужність спектру у відведенні – $S_{\text{повна}}$, мкВ²/с²; домінуюча частота спектру у відведенні – $F_{\text{домінуюча}}$, Гц; середня частота спектру у відведенні – $F_{\text{середня}}$, Гц; відношення повної потужності спектру в даному частотному діапазоні до повної потужності спектру в даному відведенні – індекс ритму, %.

Статистичний аналіз даних проводили за допомогою пакету STATISTICA 6.0 (StatSoft, USA, 2001). Нормальність розподілів змінних перевірялась тестом Шапіро-Віллка. Парні порівняння проводились за допомогою критерію Стюдента для нормально розподілених показників та критерію Вілкоксона – для ненормально розподілених. Критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез приймався рівним $p=0,05$. Для опису вибіркового розподілу нормально розподілених величин вказували середнє значення, 95% ДІ середнього значення та середньо квадратичне відхилення: M (-95%ДІ – 95%ДІ), s , а ненормально розподілених – вказували медіану (M_e) і нижній (25%) та верхній (75%) квартилі: M_e [25%; 75%].

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

В δ -діапазоні (Рис.1) в префронтальній зоні у відведенні Fp1A1 $A_{\text{макс}}$ значущо знизилась з 17,5 [13; 111] мкВ/с до 15,5 [13; 103] мкВ/с ($p = 0,01$) та в лівій центральній зоні C3A1 $A_{\text{повна}}$ знизилась з 24 [22; 33] мкВ/с до 22 [22; 32] мкВ/с ($p = 0,04$). Відомо, що коливання в δ -діапазоні генеруються в неокортикальних та таламокортикальних нейромережах. З точки зору їх функціонального значення для мозку, δ -хвилі важливі для велико-масштабної кортикальної інтеграції, а також для механізмів уваги та синтаксичного мовного процесу [4]. Крім того, в роботі [5] показано, що оцінка правильності виконання завдання відбувається саме в мережах, які активуються в δ -діапазоні. Правильні відповіді коре-

льовані з вербальними специфічними областями, такими як перисильвієва область лівої півкулі [6]. Така активація також проявляється під час запам'ятовування невербальної інформації та її вербального відновлення [6]. Нейромережі різного розміру припускають коливання з різними частотами: так, більші нейромережі генерують повільні частоти [4], тобто правильність реакції оцінюється в найбільшій нейромережі. Значуще зниження активності в лівій півкулі при виконанні тесту Г2 можливо пов'язане зі зниженням синтаксичного аналізу складної невербальної інформації. В θ -діапазоні (Рис.1) виявлено наступні значущі відмінності ($p < 0,05$): в префронтальній зоні у відведенні Fp1A1 $F_{\text{домінуюча}}$ значущо підвищилась з 4,8 [1,3; 5,1] Гц до 4,9 [4,6; 5,2] Гц ($p = 0,04$), а потужність значущо знизилась в C4A2 $A_{\text{макс}}$ з 4,1 [3,35; 10,9] мкВ/с до 3,7 [3,4; 8,5] мкВ/с ($p = 0,03$) та O2A2 $A_{\text{серед}}$ з 44 [29; 186] мкВ/с до 33 [29; 69] мкВ/с ($p = 0,02$). Згідно з даними [7] нейромережі, які активуються в тета – діапазоні беруть участь у кодуванні інформації та в прийнятті рішення, а саме: пошуку релевантної інформації, в т.ч. і в процесах пам'яті. Такі процеси відбуваються з залученням лобної кори. Передня кора головного мозку відповідальна за сигнальні помилки, тобто ті помилки, які були проаналізовані та які будуть враховані в подальшій роботі. Крім того, активація передньої кори забезпечує зворотній зв'язок, який потрібен для покращення роботи, а саме – корекцію процесів, що забезпечують запам'ятовування інформації виходячи з наявності усвідомлених помилкових реакцій. Порівняно з тестом Г1 при тестуванні Г2 не спостерігались значущі зміни активності в префронтальній та фронтальній зонах, що свідчить про збереження активності нейромереж, відповідальних за кодування інформації, та її корекцію. Зменшення активності в правій центральній зоні при її збереженні в лівій в θ -діапазоні та зниження активності в лівій центральній зоні в δ -діапазоні свідчить про зміщення центру уваги при запам'ятовуванні складної інформації: зменшувалась концентрація на правильних відповідях та збільшувалась – на помилкових.

Значуще підвищення домінуючої частоти в тета – діапазоні в лівій префронтальній зоні ми пов'язуємо зі зменшенням нейромережі, яка задіяна в кодуванні інформації, за рахунок послаблення семантичного аналізу невербальної інформації підвищеного рівня складності. В α -діапазоні (Рис.1) в правій потиличній зоні у відведенні O2A2 $A_{\text{повна}}$ значущо зменшилось з 18 [14; 24] мкВ/с до 18 [14; 24] мкВ/с ($p = 0,04$). Десинхронізація амплітуди α -відповідає активації top-down контролю – механізму, який виконує функцію контролю уваги над селективною, а в подальшому, і над релевантною інформацією, шляхом пригнічення інших областей головного мозку для якісного опрацювання даної інформації [8]. В β_1 -діапазоні (Рис.1) значущо знижувалась потужність у відведеннях F3A1 $S_{\text{повне}}$ з 13 [7,5; 22] мкВ²/с² до 9,3 [5,6; 21] мкВ²/с² ($p = 0,02$) F4A2 $S_{\text{повне}}$ з 12 [9,7; 58] мкВ²/с² до 11 [7,2; 26] мкВ²/с² ($p = 0,02$); в T4A2 $S_{\text{максимальне}}$ зменшилось з 3,1 [1,8; 4,9] мкВ²/с² до 2,1 [1,6; 3,5] мкВ²/с² ($p = 0,04$) O2A2 $S_{\text{повне}}$ з 19 [14; 47] мкВ²/с² до 14 [14; 10] мкВ²/с² ($p = 0,02$). Активність в β_1 – діапазоні пов'язують з моторною активністю, увагою, семантичним аналізом інформації, попередньою модальною інтеграцією [9]. В роботі [9] наводяться аргументи на користь гіпотези стосовно того, що активність в β – діапазоні обслуговує статус-кво поточного сенсомоторного та когнітивного стану, когнітивного контролю.

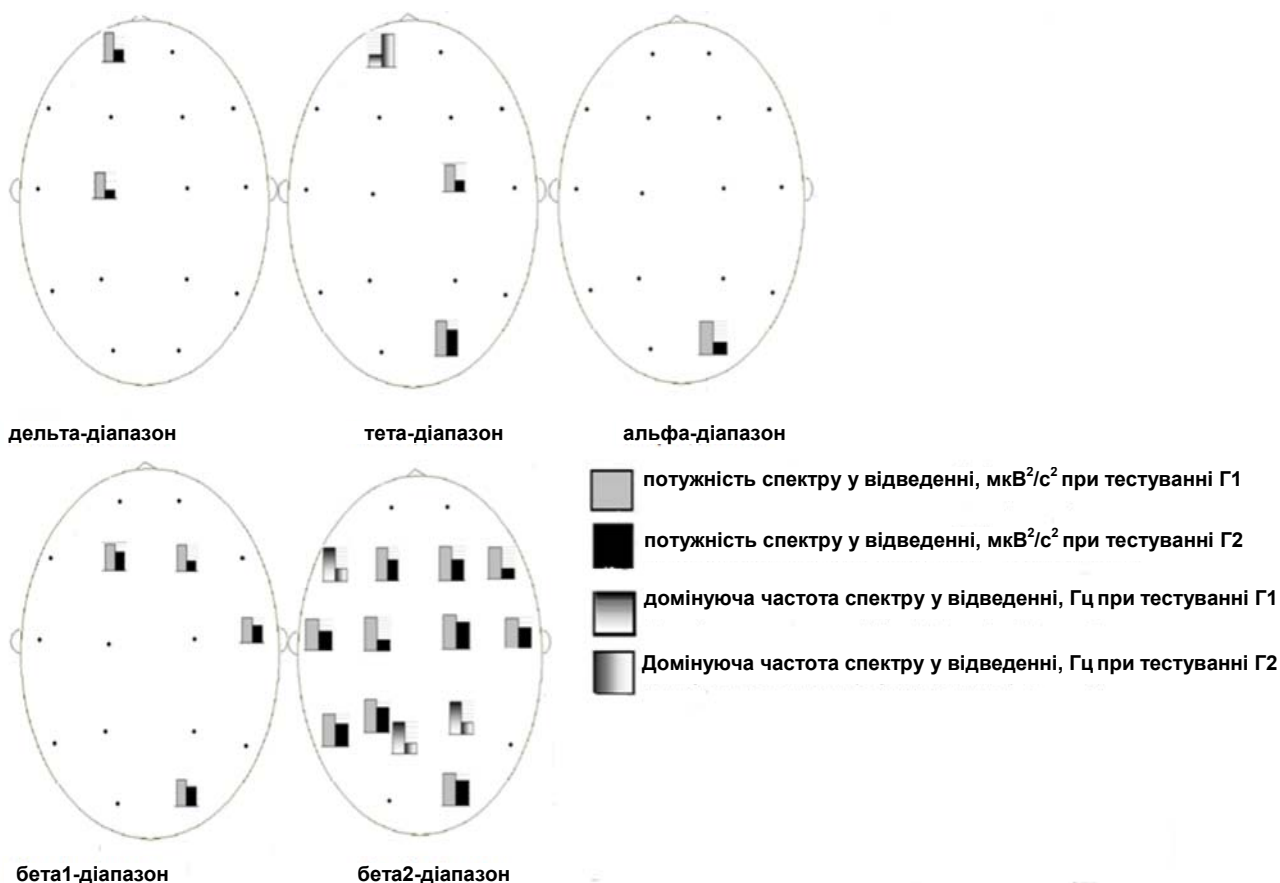


Рис.1 Значущі зміни активності головного мозку жінок (n=10) при тестуванні оперативної пам'яті на геометричні фігури з однією (Г1) та двома ознаками (Г2)

Отримані дані свідчать про наявність втоми та зниження уваги у обстежуваних в тесті Г2. В β_2 -діапазоні (Рис.1) спостерігалось зниження частоти у Р3А1 $F_{\text{середнє}}$ з 25,3 [24,5; 26,2] Гц до 24,9 [23,8; 24,2] Гц ($p=0,03$) та у відведенні F7А1 $F_{\text{середнє}}$ з 25,2 [24,6; 26,6] Гц до 24 [24; 25,9] Гц ($p=0,01$). Спостерігалось зниження потужності у таких відведеннях: F3А1 $S_{\text{повне}}$ з 16 [10; 34] мкВ²/с² до 10 [9,7; 32] мкВ²/с² ($p=0,01$) F4А2 $S_{\text{повне}}$ з 14 [10; 34] мкВ²/с² до 10 [14; 10] мкВ²/с² ($p=0,04$) C3А1 $A_{\text{повне}}$ з 15 [14; 42] мкВ/с до 13 [15; 41] мкВ/с ($p=0,01$) C4А2 $S_{\text{макс}}$ з 1,8 [1,3; 5] мкВ²/с² до 1,3 [1,3; 2,8] мкВ²/с² ($p=0,01$), Р3А1 $A_{\text{повне}}$ з 17 [18; 35] мкВ/с до 15 [15; 35] мкВ/с ($p=0,02$), О2А2 $S_{\text{повне}}$ з 20 [20; 42] мкВ²/с² до 12 [12; 35] мкВ²/с² ($p=0,01$), F8А2 $A_{\text{повне}}$ з 16 [14; 40] мкВ/с до 11 [11; 37] мкВ/с ($p=0,02$) Т3А1 $A_{\text{повне}}$ з 19 [15; 52] мкВ/с до 11 [11; 38] мкВ/с ($p=0,01$) Т4А2 $S_{\text{макс}}$ з 2 [1,5; 5,3] мкВ²/с² до 1,5 [1,5; 2,9] мкВ²/с² ($p=0,02$) Т5А1 $S_{\text{повна}}$ з 9,8 [9,3; 26] мкВ²/с² до 8,4 [8,4; 14] мкВ²/с² ($p=0,02$). Активність в β_2 -діапазоні відображає синхронізацію різних стратегій багатомодального інформаційного вибору впродовж процесів мислення, її також пов'язують з вищими когнітивними функціями та з пізнанням "per-se", тобто по-суті [10]. Таким чином, можна припустити, що у обстежуваних при підвищеному рівні складності завдання гальмувались процеси розпізнавання геометричних фігур, а відповіді ставали менш усвідомленими. Значуще зниження домінуючої частоти в β_2 -діапазоні вказувало на зниження когнітивної складової реакції на стимул в лівій скроневій та тім'яній зонах, оскільки згідно [8] фазичні зміни в ЕЕГ є стимул – залежними. Такі зміни можливо пов'язані з пригніченням процесу "проговорювання" завдання та збільшенням навантаженням

на оперативну пам'ять, що призводило до певної дезактивації задньої поясної кори. Загалом, зниження активності головного мозку жінок при запам'ятовуванні геометричних фігур з двома ознаками можливо пов'язати з розвитком втоми, оскільки згідно [8] тоничні зміни залежать від психофізіологічного стану обстежуваного. Аналіз ефективності оперативної пам'яті показав, що час реакції у жінок при пред'явленні геометричних фігур з двома ознаками, порівняно з фігурами з однією ознакою, значущо збільшився з 570 (481,0 – 659) мс, 132,8 мс до 881 (741,0 – 1021) мс, 208,5 мс ($p < 0,001$), а відносна кількість помилок значущо не змінилась ($p = 0,62$). Можна припустити, що функціональна система оперативної пам'яті у жінок при підвищенні рівня складності стимулів не перебудовувалась, а спостерігались лише зміщення акцентів в рамках єдиної системи.

Висновки. Функціональна система оперативної пам'яті у жінок при підвищенні рівня складності стимулів кардинально не перебудовується. Спостерігались лише певні локальні зміни: зниження синтаксичного аналізу стимулів – стимули запам'ятовувались скоріше як цілісні об'єкти, тобто відбувалось звуження нейромереж обробки інформації за рахунок підсистеми абстрактно-вербального мислення та зниження рівня уваги. При цьому спостерігалось збільшення активності в локальних структурах пам'яті. Крім цього, відбувалось зміщення центру уваги: зменшувалась концентрація на правильних відповідях та збільшувалась – на помилкових.

Список використаної літератури. 1. Prinzl L.J. 3rd. Research on hazardous states of awareness and physiological factors in aerospace operations. Technical Memorandum. Technical Paper NASA/TP-2002-211444. – Hampton: NASA Langley Research Center, 2002. – 80 p. 2. Bourne L.E.Jr., Yaroush R.A. Stress and cognition: A cognitive

psychological perspective. NASA Grant Number NAG2-1561. – Boulder, Colorado: University of Colorado, Department of Psychology, 2003. – 123 p. 3. Філімонова Н.Б., Куценко Т.В., Макаруч М.Ю. Особливості обробки зорової вербальної та невербальної інформації в оперативній пам'яті людини // Фізика живого. – 2006. – Т.14. – № 3. – С. 75 – 86. 4. Sauseng P., Klimesch W. What does phase information of oscillatory brain activity tell us about cognitive processes? // *Neurosci. Biobehav. Rev.* – 2008. – V. 32. – P. 1001–1013. 5. Bernat E., Lindsay D., Holroyd B., Gehring W. Separating cognitive processes with principal components analysis of EEG time-frequency distributions // *Proc. of SPIE.* – 2008. – Vol. 7074. – P. 326–333. 6. Dehaene S., Spelke E., Pined P., Stanescu R., Tsivkin S. Sources of

mathematical thinking: behavioral and brain imaging evidence // *Science* – 1999. – № 284. – p. 970–974. 7. Sasaki H. Frontal midline theta rhythm: comment on chan and HSU // *Perceptual and Motor Skills.* – 2010. – V.110. – P. 1010–1012. 8. Klimesch, W. EEG alpha and theta oscillations reflect cognitive and memory performance: a review and analysis // *Brain Res. Rev.* – 1999. – V.29. – P.169–195. 9. Engel A.K., Fries P. Beta-band oscillations-signalling the status quo? // *Curr Opin Neurobiol.* – 2010. – V. 20(2). – P.156–65. 10. Kukleta M., Brázdil M., Roman R., Bob P., Rektor I. Cognitive Network Interactions and Beta-2 Coherence in Processing Non-Target Stimuli in Visual Oddball Task // *Physiol. Res.* – 2009. – V.58. – P. 139–148.

Надійшла до редколегії 26.11.12

УДК 575.224.4 575.224.23

Т. Федоренко, інж., Л. Лазаренко, канд. біол. наук,
О. Городна, канд. біол. наук, С. Демидов, д-р біол. наук

ВПЛИВ ДЕЙТЕРІЄВОЇ ВОДИ НА ГЕНОМ ЕУКАРІОТ: ЦИТОГЕНЕТИЧНА АКТИВНІСТЬ В *ALLIUM*-ТЕСТІ

*Досліджено вплив дейтерієвої води на стабільність хромосом в клітинах кореневої меристеми проростків батуну (*Allium fistulosum* L.). Показана мутагенна активність важкої води в *Allium*-тесті. Зміни спектру аберацій хромосом під впливом дейтерієвої води можна пояснити гальмуванням репаративних процесів.*

Ключові слова: дейтерієва вода, геном еукаріот, аберація хромосом.

*Исследовано влияние дейтериевой воды на стабильность хромосом в клетках корневой меристемы проростков батуну (*Allium fistulosum* L.). Показана мутагенная активность тяжелой воды в *Allium*-тесте. Изменение спектра абераций хромосом под влиянием дейтериевой воды можно объяснить торможением репаративных процессов.*

Ключевые слова: дейтериевая вода, геном еукариот, аберация хромосом.

*The effects of D-water on stability of chromosomes in meristematic cells of Welsh onion (*Allium fistulosum* L.) was studied. Mutagen activity of heavy water in *Allium*-test was found. Changes of spectrum of aberrations of chromosomes under the influence of D-water may be explained by of reparative processes.*

Keywords: D-water, eukaryotic gene, aberrations of chromosomes.

Вступ. Життєво важливим фактором для кожного представника біоти є вода. В сучасних умовах забрудненості природного середовища дослідження її впливу, залежно від різного роду забруднень, досить актуальне, вимагає постійного моніторингу і вже протягом десятиліть перебуває у полі зору дослідників різних країн [2]. При цьому приділяється увага як питній воді, так воді з природних джерел і водойм [11;9;4], а також індустральним видам як можливим забруднювачам середовища [6].

Природна вода – це суміш, що складається переважно із звичайної, протієвої води ($^1\text{H}_2^{16}\text{O}$) і мізерної кількості всіх відомих ізотопів води, в тому числі дейтерієвої (D_2O) і тритієвої (T_2O). Так, в організмі людини 0,015 відсотків від усієї води (а це 70% від маси тіла) становить дейтерієва вода, тобто така, до складу молекул якої замість двох атомів гідрогену входить два атоми дейтерію. Оскільки зміна атомної маси елементів води веде до збільшення молекулярної маси і, відповідно, фізичних і хімічних властивостей води, після відкриття у 1939 році важкої (дейтерієвої) води проводяться дослідження її впливу на живі організми. В результаті перших досліджень зроблено висновок про несумісність важкої води з життям, оскільки спостерігалось інгібування багатьох життєво важливих функцій. Проте подальші дослідження на об'єктах різного рівня біологічної організації показали залежність ефекту як від концентрації D_2O , так і від об'єкту [7;10]. Так, клітини вищих організмів гинуть за концентрації важкої води у складі тіла більше 30% [7], але мікроорганізми, що легко пристосовуються до швидких змін оточуючого середовища, здатні жити і розмножуватись навіть у 98% важкої води [14]. Тобто, здатність до адаптації у великих концентраціях важкої води пов'язана з еволюційним рівнем організації: чим нижчий рівень розвитку живого, тим вища здатність до адаптації [15]. В цілому інформація про біологічний вплив дейтерію на життєдіяльність різних організмів в періодичній науковій літературі досить обмежена і неоднозначна. В переважній більшості робіт проаналізовано морфологічні зміни, ріст та розвиток, функціонування окремих органів та систем. Про здатність важкої води індукувати мутації у еукаріот (тобто,

мутагенну активність), відомості в доступній періодиці практично відсутні. Зокрема, повідомлялося, що важка вода гальмує мітоз в стадії профазі: цей ефект пропорційний концентрації важкої води у середовищі і особливо помітний у клітин, що швидко діляться. Кресні також показав, що присутність дейтерію в біологічних системах, окрім пригнічення багатьох функцій та життєздатності, з великою ймовірністю, призводить саме до змін структури і властивостей ДНК та білків[1]. Аберації хромосом є основним показником стабільності геному на клітинному рівні, за яким можна досліджувати потенційну мутагенну (генотоксичну) активність будь-якого фактора. Звичайно тестування на генотоксичність починається з так званого скринінгу із застосуванням відносно простих, дешевих і добре вже відпрацьованих тестів. Одним з таких тестів є *Allium*-тест в різних модифікаціях: аналізують клітини кореневої меристеми цибулин або насіння різних видів *Allium*, які пророщують у розчині досліджуваної речовини. Такі дані, стосовно впливу важкої води, у доступній для нас літературі не зустрічались.

Метою даної роботи був цитогенетичний аналіз впливу важкої води на стабільність хромосом проростків цибулі батун (*Allium fistulosum*). Дана робота виконувалась в межах проекту "Захист генофонду населення України", одним з напрямків якого було вивчення потенційної мутагенності факторів різної природи.

Матеріали і методи. У дослідженнях використовували насіння батуну, сорту "Майський", з колекції генетично однорідного насіння, що зберігається в лабораторії і щорічно поповнюється зі штучної популяції, створеної нами ще у 1992 році. Сухе насіння усіх партій зберігається в негерметично закритому скляному посуді в однакових лабораторних умовах. Насіння пророщували в термостаті при температурі 24°C в чашках Петрі з дистильованою водою (контроль) та у важкій (дейтерієвій) воді, наданій замовником (Інститут медико-біологічних проблем РАН) в необхідній для скринінгу кількості. Через 72 години від моменту замочування насіння обчислювали схожість насіння для виявлення цитотоксичного ефекту важкої води. Фіксацію проростків у кожному дослідному варіанті проводили одночасно

но, коли необхідної для фіксації довжини (4-9 мм) досягла максимальна кількість корінців. Корінці фіксували у фіксаторі Кларка – суміші етилового спирту 96 та льодяної оцтової кислоти (3:1). Для цитогенетичного аналізу готували тимчасові давлені препарати, фарбовані ацеторсеїном ("Merck"), згідно загальноприйнятим, частково модифікованим, методикам. Клітини кореневої меристеми проростків аналізували під мікроскопом відомим анафазним методом, який передбачає облік клітин на стадії анафази та ранньої телофази.

Обчислювали такі цитогенетичні показники:

частоту аберантних анафаз (ЧАА) – частку анафаз з абераціями від загальної кількості проаналізованих анафаз, виражену в процентах;

пошкодженість аберантної клітини (ПАК) – інтегральний показник, який складають показники КАБАК (кількість аберацій на аберантну клітину) і ЧМАА (частота мультиаберантних анафаз – частка мультиаберантних анафаз, від загальної кількості аберантних анафаз, виражена у відсотках). При обчисленні показника КАБАК мультиаберантні клітини не враховували.

Зміни спектру аберацій хромосом аналізували за **частотою дицентриків** (ЧД) – частка всіх дицентриків від всієї кількості аберацій, виражена в %), та **частотою подвійних дицентриків** (ЧПД) – частка дицентриків хромосомного типу від загальної кількості **дицентриків**, виражена в %).

Статистичну обробку проводили загальновизнаними методами [13]. Дослідження проводили в два етапи. Завданням першого етапу даного дослідження був відбір з наявних у колекції партій (років репродукції) насіння батуну саме такої, насіння якої, маючи достатню життєздатність (за критерієм схожості) було вже досить мутабільним (вразливим до дії мутагенів) за показником ЧАА – як найперш і найбільш інформативним цитогенетичним показником. Другим етапом дослідження було власне тестування на цитотоксичність та мутагенність (генотоксичність) важкої води. На цьому етапі постав-

лено два експерименти через певний проміжок часу (3 місяці) для визначення вікових відмінностей у реакції хромосом батуну на вплив важкої води.

Результати та їх обговорення. Чим вищі значення частоти аберантних анафаз у контрольних варіантах, що вказує на більшу вразливість хромосомного матеріалу до пошкоджуючих впливів, тим виразнішим буде ефект досліджуваного фактора. Так, мутагенний ефект пірогалолу на клітини *Vicia faba* L. спостерігався лише при значному рівні (10-40% аберантних анафаз) природного мутування і був відсутній при низькому – 3% аберантних анафаз, а формальдегід впливав як мутаген на клітини проростків батуну з контрольною частотою аберантних анафаз 11% і не виявляв мутагенної активності у варіантах з контрольним рівнем 6% і 7% аберантних анафаз [5]. Саме тому на першому етапі даного дослідження насіння чотирьох послідовних років репродукції пророщували в дистильованій воді для наступного цитогенетичного аналізу кореневої меристеми проростків. Отримані результати наведено в таблиці 1. Оскільки, для дотримання однакових умов експерименту на етапі пророщування, насіння всіх партій пророщували одночасно, вік насіння всіх досліджуваних варіантів відрізнявся на 12 міс. Цитогенетичні показники дозволяють аналізувати мутаційний процес, як за інтенсивністю, так і за спектром аберацій хромосом. Про інтенсивність мутаційного процесу свідчать кількісні показники: частота аберантних анафаз і пошкодженість аберантної клітини. Як видно з таблиці 1, частота аберантних анафаз в клітинах кореневої меристеми проростків батуну залежить від віку насіння (терміну зберігання) на момент постановки експерименту: чим старіше насіння, тим вища частота аберантних анафаз. З віком зростає також і пошкодженість аберантної клітини, як за показником КАБАК, так і за частотою мультиаберантних анафаз: як видно з таблиці 1, мультиаберантні клітини з'являються на третьому році зберігання (табл. 1).

Таблиця 1. Спонтанне утворення хромосомних аберацій в клітинах кореневої меристеми проростків батуну з насіння різного віку

Варіант досліджу	Вік насіння (місяці)	Схожість, %	Вивчено анафаз, n	ЧАА, %	Пошкодженість аберантної клітини		ЧД, %	ЧПД, %
					КАБАК	ЧМАА, %		
1	10	75,5±3,2	442	1,6±0,67	1,16±0,12	0	93,8±0,6	6,7±6,4
2	22	69 ± 3,3	566	5,5±0,9	1,32±0,11	0	59,0±7,9	21,7±8,6
3	34	67±3,3	883	16,2±1,2	1,41±0,06	1,41	54,0±3,5	35,2±4,6
4	46	27±2,6	734	21,5±1,4	1,56±0,09	5,62±1,78	47,4±2,9	53,6±4,1

Примітки: ЧАА – частота аберантних анафаз; КАБАК – кількість аберацій на одну аберантну клітину; ЧМАА – частота мультиаберантних анафаз; ЧД – частота дицентриків; ЧПД – частота подвійних дицентриків.

При формуванні аберацій внаслідок розриву хромосоми утворюються фрагменти (центричний – з центромерою, та ацентричні). Залежно від того, на якій стадії мітотичного циклу відбувається розрив хромосоми, серед хромосомних аберацій розрізняють аберації хромосомного типу (пошкодження хромосоми відбулося в період G1 інтерфази, коли хромосома перебувала в стані однієї ефективної нитки) та аберації хроматидного типу (пошкодження мало місце в постсинтетичному періоді інтерфази, коли хромосома знаходилась у стані двох ефективних ниток). Подальша доля фрагментів залежить як від ефективності репаративних процесів, так і, певною мірою, від взаємного розташування. При злитті "вільних" кінців центромерних фрагментів утворюються дицентрики, які розходяться на стадії анафази, під мікроскопом спостерігаються у вигляді "мостів" між хромосомними групами. Формування дицентриків – процес енергозатратний. Так, під впливом АТФ підви-

щувався рівень злиття центричних фрагментів у насінні пшениці [16] і *Vicia faba minor* L. (АТФ (2×10^{-3} М). Одночасно збільшилась і відносна кількість одиночних ацентричних фрагментів [16]. При цьому, як відмічають автори, рівень мутування клітин при дії АТФ знижувався. Тому наявність мостів розглядають як опосередковане свідчення інтенсивності біохімічних реакцій, в тому числі і репараційних процесів. За результатами власних досліджень та даними літератури для молодого насіння батуну (1-1,5 міс) за відсутності екстремальних умов характерно утворення "мостів", що природно впливає з вищесказаного. Причому, переважно це мости одиночні, що вказує на формування аберацій (хроматичних дицентриків) після реплікації – на стадії хроматид (G₂-період інтерфази). При подальшому зберіганні насіння на фоні зростання частоти аберантних анафаз і ступеню пошкодженості аберантних клітин частота дицентриків зменшується, і серед них зростає кількість дицен-

триків хромосомного типу (подвійних мостів). На відміну від *Vicia faba* var. *major* L. та видів *Triticum* L., *Vicia faba* var. *minor* L. процеси злиття центричних фрагментів у *A. fistulosum* L. на високому рівні спостерігають лише в молодому насінні, [17].

Дані таблиці 1 демонструють вікові відмінності спектру аберацій хромосом: частка дицентриків в цілому знижується, що опосередковано свідчить про зниження ефективності репараційних систем, які відповідальні за відновлення пошкоджень та усунення передмутаційних змін хромосом. Частка подвійних мостів (дицентриків хромосомного типу), як видно з таблиці 1, зростає – отже формування аберацій з часом відбувається переважно до реплікації хромосом (протягом G₁-періоду мітотичного циклу). Стабільність хромосом насіння 1-го року зберігання, як за кількісними цитогенетичними показниками (ЧАА, КАБАК, ЧМАА), так і за показниками спектру хромосомних аберацій (ЧД і ЧПД), ще досить висока. Вимогам для подальшого тестування відповідає насіння батуну 2-го року зберігання (22 місяці на момент постановки експерименту) із схожістю $69 \pm 3,3\%$ – достатньою для одержання матеріалу, необхідного для

аналізу, і частотою аберантних анафаз 5,48%. Тому на наступному етапі дослідження – вивчення цитогенетичної активності важкої води – використовували насіння саме цієї партії. На момент постановки першого дослідного етапу експерименту вік насіння становив 24 місяці. Зрозуміло, що протягом 2-х місяців зберігання мали місце деякі зміни в структурі хромосом, що, звичайно ж, могло відбитись на досліджуваних нами цитогенетичних параметрах. І справді, з таблиці 2 видно, що частота аберантних анафаз у контрольному насінні складала $7,5 \pm 1,5\%$ (табл. 1, 2).

У варіанті з дейтерієвою водою спостерігали значне збільшення кількості аберантних клітин – $15,9 \pm 2,8\%$. Показники пошкодженості аберантної клітини змін не зазнали (табл. 2). Отже інтенсифікація мутаційного процесу відбувалась за рахунок пошкодження хромосом в неаберантних ще клітинах. Показники спектру аберацій хромосом під впливом важкої води змінилися в напрямку, характерному для старіючого насіння батуну: зниження частоти дицентриків та підвищення частоти подвійних дицентриків.

Таблиця 2. Вплив важкої (дейтерієвої) води на утворення хромосомних аберацій в клітинах *Allium fistulosum* L.

Вік насіння, міс	Варіант досліджу	Схожість (%)	Вивчено анафаз, n	Частота аберантних анафаз (%)	Пошкодженість аберантних клітин (%)	ЧМАА	ЧМ	ЧПМ
24	H ₂ O	76 $\pm$ 3,02	294	7,5 $\pm$ 1,5	1,15 $\pm$ 0,10	0	64,3 $\pm$ 9,1	16,7 $\pm$ 8,9
	D ₂ O	62 $\pm$ 3,43	176	15,9 $\pm$ 2,8	1,12 $\pm$ 0,07	0	36,8 $\pm$ 7,8	35,7 $\pm$ 12,6
27	H ₂ O	59 $\pm$ 3,48	994	11,7 $\pm$ 1,0	1,34 $\pm$ 0,17	0	59,5 $\pm$ 3,8	37,6 $\pm$ 4,8
	D ₂ O	68 $\pm$ 3,30	513	21,3 $\pm$ 1,8	1,29 $\pm$ 0,06	0,92	49,0 $\pm$ 4,2	45,7 $\pm$ 6,0

Через 3 місяці частота аберантних анафаз у контрольному насінні становила вже 11,7%. Помітно зросла і пошкодженість аберантної клітини за показником КАБАК, проте мультиаберантні анафази ще відсутні (табл. 3). Зміни спектру аберацій хромосом такі, що вказують на помірне, звичайне за даних умов зберігання, старіння насіння.

У варіанті з важкою водою, як і у попередньому досліді, частота аберантних анафаз також зросла майже вдвічі ($21,3 \pm 1,8\%$), і вже з'явилися мультиаберантні анафази (табл. 2). Про зміни спектру в напрямку прискореного старіння насіння (зменшення частоти дицентриків та підвищення частоти подвійних дицентриків) в даному разі можна говорити лише як про тенденцію. Однак, враховуючи результати, одержані для більш молодого насіння, можна все ж говорити про стійку тенденцію до наростання частоти подвійних дицентриків під впливом саме важкої води як діючого фактора. Варто нагадати, що частота і спектр хромосомних аберацій залежать від особливостей генотипу організму, фізіологічного стану клітини і фази клітинного циклу в момент мутагенної дії, активності апарату репарації ДНК, природи мутагенів, інтенсивності й тривалості їх дії та інших факторів. Проте дослідження стабільності хромосом при пожиттєвому зберіганні насіння батуну показали, що 20-відсоткового рівня частота аберантних анафаз сягала в переважній більшості вже після 3-х років зберігання, коли насіння вже помітно старіє як за кількісними цитогенетичними показниками, так і за спектром аберацій хромосом, та за умов екологічно несприятливих для формування і досягання насіння. Оскільки утворення дицентричних хромосом – опосередковане свідчення інтенсивності репараційних процесів, зниження частоти дицентриків під впливом дейтерієвої води свідчить про гальмування процесів репарації (табл. 2).

Частота аберантних клітин в кореневій меристемі проростків вже звично розглядається як показник старіння насіння, оскільки аберації аналізують протягом першого мітозу клітин кореневої меристеми, коли фіксуються аберації, утворені при зберіганні насіння до першого мітозу. Вікові зміни показників стабільності хромосом в контрольних варіантах даного дослідження відтворюють звичну, за відсутності екстремальних умов, картину динаміки хромосомної нестабільності, що розвивається у насінні батуну при зберіганні останнього в лабораторних умовах. Тому зростання кількісних показників нестабільності хромосом та відповідні зміни спектру аберацій в клітинах кореневої меристеми проростків дослідних варіантів свідчать про генотоксичний вплив середовища, у якому насіння пророщували. Таким чином, виявлено мутагенну активність важкої води в *Allium*-тесті.

Список використаної літератури. 1. Crespi H.L. Biosynthesis and uses of per-deuterated proteins. In: Synt. and Appl. of Isot. Label. Compd. // Ed. R.R. Muccino. – Elsevier. – Amsterdam, 1986. 2. Guidelines for Drinking-Water Quality. Vol. 1 / WHO. Geneva, 1984. 3. Jung K. // Studia Biophysica. – 1967 – V. 4. 4. Kutsokon N.K., Lazarenko L.M., Bezrukov V.F. Age-Related features of chromosome instability of welsh-onion seeds grown in water samples from different sources. // Third European Cyto-genetics Conference. July 7-10, 2001, Paris, France. 5. Lazarenko L.M., Bezrukov V.F. Sensitizing of Genome of Welsh Onion (*Allium fistulosum* L.) by Environmental Conditions // Sixth International Symposium and Exhibition on Environmental Contamination in Central and Eastern Europe and the Commonwealth of Independent States. Prague, 2003. 6. J.Rank and M.H.Nielsen. Evaluation of the *Allium* anaphase-telofase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater // Mutation research, 1994. V.312. P. 17-24. 7. Денько Е.И. Действие тяжелой воды (D₂O) на клетки животных, растений и микроорганизмы. // Успехи современной биологии. – 1970. – Т.70. вып.1(4). – С.41-64. 8. Дубинин Н.П., Щербаков В.К., Юкова Г.С. Мутагенный эффект пирогаллола на фоне разных уровней естественного мутирования клеток // Генетика. – 1967. – N1. – С. 47-52. 9. Дубинина Л.Г., Дубинин Н.П. Исследование мутагенности питьевой воды из разных районов г. Москвы // Генетика. – 1996. – т. 32, N9. – С. 1225-1228. 10. Ерёмин В.А., Чекулаева Л.Н., Харатьян Е.Ф., Островский Д.Н. Выращивание бактерий *Micrococcus lysodeikticus* на дейтерированной среде. // Микробиология. – 1978. – Т.37, Вып.4. – С.629-635.

11. Курашова З.И., Дубинина Л.Г., Волкова И.В. Изучение мутагенной активности воды и илистых отложений в разных районах Астраханской области // Генетика. – 1992. – Т.28. – №6. 12. Лазаренко Л.М., Безруков В.Ф. Цитогенетичний моніторинг штучної популяції *Allium fistulosum* L. Значення та перспективи стаціонарних досліджень для збереження біорізноманіття. Матеріали Міжнародної наукової конференції, присвяченої 50-річчю функціонування високогірного біологічного стаціонару "Пожижевська". Львів-Пожижевська, 23-27 вересня 2008 р. Львів, 2008. 13. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. школа. – 1990. 14. Мосин О.В. Разработка методов биотехнологического получения белков, аминокис-

лот и нуклеозидов, меченных ^{2}H и ^{13}C с высокими степенями изотопного обогащения. Автореф.к.д.х.н. – 1996. 15. Мосин О.В., Складнев Д.А., Швец В.И. Исследование физиологической адаптации бактерий на тяжелодородной среде. – Биотехнология. – 2000 – №8. 16. Щербаков В.К. Естественный мутационный процесс (Цитогенетические закономерности). В кн.: Общая генетика (мутагенез, мутации) 1967, М., 1969. 17. Дубинин Н.П., Щербаков В.К., Руднева С.В. Внутривидовые различия в спектре естественно возникающих мутаций хромосом и основные типы естественного мутационного процесса // Генетика. – 1966. – №6. – С. 20-27.

Надійшла до редколегії 08.11.12

УДК 578.81

Л. Семчук, канд. біол. наук, С. Ромашев, пров. інж., А. Бурхан, магістр

ВІЯВЛЕНІ ЗМІНИ У ГЕНОМАХ МУТАНТІВ ФАГА 8573SM, ЗДАТНИХ РОЗМНОЖУВАТИСЬ НА РЕЗИСТЕНТНИХ КЛОНАХ ХАЗЯЇНА *PSEUDOMONAS FLUORESCENS*

Аналізували взаємодію фага 8573sm та хазяїна Pseudomonas fluorescens. До резистентних мутантів бактерій, що вижили після інфікування фагом, виявили h-мутанти останнього. Вони мали строгі специфічності до окремих клонів бактерій. Проводили порівняння геномів материнського генотипу фагу 8573 sm та мутантів, адаптованих до резистентних клонів. За допомогою ендонуклеази Hind III виявлено, що геноми мутантів мали змінене число сайтів рестрикції.

Ключові слова: геном, бактериофаги, ендонуклеаза.

Анализировали взаимодействие фага 8573sm и хозяина Pseudomonas fluorescens. В резистентных мутантах бактерии, выжившие после инфицирования фагом, обнаружили h-мутанты последнего. Они имели строгую специфичность к отдельным клонам бактерий. Проводили сравнение геномов материнского генотипа фагу 8573 sm и мутантов, адаптированных к резистентности клонов. С помощью эндонуклеазы Hind III выявлено, что геномы мутантов имели изменённое число сайтов рестрикции.

Ключевые слова: геном, бактериофаги, эндонуклеаза.

Found changes in genome mutants of phage 8573 sm, reproducing on resistant clones of host, Pseudomonas fluorescens. Analyzed the interaction of phage 8573sm and its host Pseudomonas fluorescens. After infection by phages resistant mutants of host, were isolated h-mutants phages. They had a strict specificity for individual clones. Researched DNA of mutants phage 8573 sm, adapted to resistance clones. Restriction analysis, with use endonuclease Hind III, testify that genomes differed from parent on number of sites restriction

Keywords: genome, bacteriophages, endonuclease.

Вступ. Бактеріофаги в природі, виконують роль важливого чинника, що обмежує чисельність бактерій. Аналізу взаємодії антагоністичних систем "хижак-жертва" присвячено багато робіт, проте, більша частина дослідників концентрувала свою увагу навколо пошуку умов стабільного існування популяцій і генетичних варіантів [2]. При інфікуванні фагами, частина бактерій, за рахунок мутацій, стає стійкою до інфікування. В такому випадку виникають передумови для неконтрольованого розмноження бактерій в природі. Однак, паралельно, в популяції фагів спонтанно утворюються мутанти, що здатні переборювати резистентність бактерій та інфікувати їх. Такі події замикають перше коло антагоністичних взаємовідносин, та призводять до нового етапу коєволюції хижака та жертви. Шляхом послідовних змін поколінь мутантних бактерій і фагів склад присутніх в екосистемі фагів змінюється. Взаємодія антагоністів дозволяє їм не вироджуватися, а еволюціонувати, шляхом послідовної зміни мутантних варіантів. Зміни у хазяїна можуть стосуватися синтезу білків рецепції і адсорбції, захисту клітинної стінки шаром речовини, яка перешкоджає нормальній адсорбції, розщепленню бактерією ко-факторів адсорбції, впливом бактеріальних систем рестрикції-модифікації. За допомогою останніх бактерії можуть руйнувати геном фага. У відповідь фаг здатний синтезувати ранні фагоспецифічні ферменти – антирестриктази [4, 8].

Мутації рецепторів у бактерій виникають значно легше і частіше, ніж у фагів. Однак, оскільки у навколишньому середовищі, фагів значно більше ніж бактерій, то ця різниця нівелюється. Мутації в генах, що контролюють синтез рецепторів на поверхні бактеріальних клітин ділять на групи. Вони потребують компенсаторних мутацій фага [7]. Для них вдається "відібрати" в експерименті "коадаптивні" мутації фага, який змінює коло хазяїв (host-range) тобто h-мутанти. Останні є об'єктом наших досліджень. Вивчення взаємного пристосування

бактерій, що викликають хвороби рослин та їх фагів, що зараз позначають терміном "гонка озброєнь", є актуальною науковою задачею. Вона має не лише теоретичне, але і практичне значення, оскільки визначає необхідні умови для штучного обмеження чисельності патогенної мікрофлори у рослинних біоценозах. Вивчення цього процесу в експериментальних умовах має обмеження, оскільки лабораторна модель взаємодії фагу та бактерії є ідеалізованою. В ній відсутні зовнішні фактори впливу, зокрема існуючі в природі ресурсні обмеження. В лабораторії бактерії безперервно активно розмножуються, специфічні до них вірулентні фаги викликають лізис їх клітин. Для вивчення властивостей h-мутантів, тобто фагів, що здатні переборювати бар'єр резистентності хазяїна, в наших дослідженнях використано штам *Pseudomonas fluorescens* IMV 8573. Для іншого штаму, цього виду, Brockhurst M.A та ін. було показано, що в популяції досліджуваного ними фага утворюється біля $2 \cdot 10^5$ часток, які є h-мутантами, і здатні інфікувати резистентні клони *P. fluorescens* [6]. Одним із селективних факторів для хазяїна є наявність або відсутність фага [9], а для фагів, відповідно, присутність в популяції хазяїна чутливих мутантів бактерій.

Метою представленої роботи було вивчення утворення мутантів фага 8573 sm при їх коєволюційній адаптації до резистентних варіантів штаму бактерії *Pseudomonas fluorescens* IMV 8573.

Об'єкт та методи досліджень. В роботі використовували отриманий з колекції музею Інституту мікробіології та вірусології Д.К.Заболотного НАН України, відділу фітопатогенних бактерій, штам фітопатогенної бактерії *Pseudomonas fluorescens* IMV 8573.

Дикий тип фага 8573sm, що був використаний в роботі, виділений в нашій лабораторії. Він утворював прозорі з чіткими краями негативні колонії, діаметром до 3 мм. У назву фага включали номер штаму першого хазяїна, використаного при його виділенні із природи

(8573), відповідно, він був названий, 8573 sm (small – дрібні бляшки).

Титування фагів проводили по Грація [1]. Резистентні клони бактерій виявляли на чашках Петрі, після інфікування бактерій (10^5 кл/мл) суспензією фага 8573sm (10^9 БУО/мл).

Накопичення фагів проводили у бульйоні із примусовою аерацією, що дозволяло отримати фаголізат із титром 10^9 – 10^{10} БУО/мл. Після чого його освітлювали при 4000g, 20 хв. Концентрацію фагів проводили шляхом центрифугуванням при 90000g, температурі 5°C, протягом 2 годин. Осад ресуспендували у 1/30 вихідного об'єму, в 0,1М трис–НСІ буфері, рН 7,4. Остаточну очистку проводили центрифугуванням в градієнті щільності 1,4–1,6 см³ хлористого цезію протягом 3 годин, при прискоренні 90000g.

Виділення ДНК з отриманих препаратів фагів здійснювали методом високотемпературної обробки, з використанням 10% SDS [5]. Порівняльну характеристику геномів материнського генотипу фагів та їх h-мутантів проводили методом рестрикційного аналізу [3]. В роботі використовували ендонуклеазу *Hind* III. Гідролізовані ДНК розділяли в 0,7% агарозі, використовуючи TBE буфер [3].

У використаній системі "фаг 8573 sm – бактерія *P. fluorescens*" спостерігали високу ефективність утворення як резистентних форм бактерій, так і мутантних фагів, здатних переборювати таку стійкість. При цьому виявили цікавий факт: фаги утворювали виключно клоноспецифічні мутанти, що не були здатні інфікувати інші резистентні варіанти бактерій. Крім того, важливо відмітити ефект: один генотип фага та один генотип бактерії, у процесі коєволюції дають початок великому числу субпопуляції антагоністів із зміненими властивостями. Відповідно, за умови утворення резистентних бактерій в екосистемі, для обмеження чисельності необхідна присутність великого різноманіття мутантних фагів.

Виникало питання, чи відбуваються зміни у фагів випадковим чином, чи вони мають певний механізм.

Дослідження ДНК мутантів фагу 8573 sm, адаптованих до резистентних клонів, проводили за допомогою рестрикційного аналізу з використанням ферменту *Hind* III.

Отримана картина електрофоретичного розподілу їх фрагментів ДНК в 0,7% агарозі, дозволила виявити у їх геномах особливості щодо чутливості до ферменту. У порівнянні із материнським генотипом, зміни відбувались у всіх фагів (рис.1).

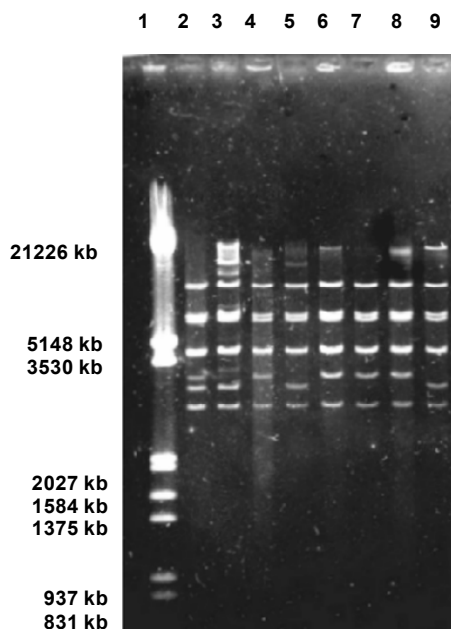


Рис. 1. Профілі розділення фрагментів ДНК материнського 8573sm та мутантних фагів, після їх гідролізу рестриктазою *Hind* III.

1. ДНК λ , гідролізована ферментами *Hind* III та *EcoRV*; 2. ДНК 8573 sm; 3. ДНК 8573 sm R2; 4. ДНК 8573 sm R3; 5. ДНК 8573 sm R4; 6. ДНК 8573 sm R5; 7. ДНК 8573 sm R6; 8. ДНК 8573 sm R7; 9. ДНК 8573 sm R8

Їх геноми, як видно з рис. 1, відрізнялися від материнського за числом сайтів рестрикції ендонуклеазою *Hind* III. Найбільші модифікації ДНК спостерігались у мутанта R2/8573, де крім спільних змін, він містив фрагменти більшої довжини, ніж присутні у материнському генотипі. Оскільки, використання іншої рестриктази, *Bgl* III не виявляла у даного клону фага аномалій щодо розмірів ДНК [10], ми вважаємо, що вони утворились у частини популяції за рахунок делецій у них сайтів рестрикції *Hind* III.

Одночасно звертала на себе увагу та особливість, що лише фрагменти геному, що знаходились у діапазоні довжин від 3100 бп до 2800 бп змінювали свою довжину, інші залишались незмінними. Для материнського генотипу характерна присутність двох фрагментів ДНК, розміри яких становлять 3100 бп та 2800 бп. У всіх мутантів, в указаному діапазоні один із двох фрагментів

відсутній. Серед мутантів у двох випадках і присутній фрагмент із довжиною 2800 бп, а у шести – 3100 бп.

Таким чином, дослідження свідчать, що адаптація фагів до змінених хазяїв *P. fluorescens*, відбувається на рівні генотипу. Зміни у геномах фагів, при аналізі особливостей розділення фрагментів рестрикції, що утворені після гідролізу *Hind* III спостерігаються лише у окремих фрагментів. Ми припускаємо, що, фрагмент геному, що їх включає, є відповідальним за адаптацію фага до резистентного хазяїна. Потрібно відмітити, що паралельно, із направленим на адаптацію змінами певних ділянок можуть відбуватись і випадкові мутації. Про це свідчать зміни у мутанта 8573 sm R2.

Отримані дані вказують на важливість продовження дослідження коєволюції фагів та їх хазяїв, з метою вивчення процесів, що відбуваються в природі, на лабораторних моделях.

Список використаної літератури. 1. Адамс М. Бактериофаги. – Москва: Мир, 1961. – 527 с. 2. Вольтерра В. Математическая теория борьбы за существование. – М.: Наука, 1976. – 287 с. 3. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. – С. 430. 4. Свиричев Ю.М., Логофет Д.О. Устойчивость биологических сообществ. – М.: Наука, 1978. – 352 с. 5. Єфименко Т.В., Андрійчук О.М., Ромашев С.А. та ін. Швидке та ефективне виділення ДНК, чутливих до специфічних ендонуклеаз із фажів *Pseudomonas* та *Xanthomonas* // Вісн. Київ. Ун-ту. Біологія. – 2001. – 35. – С. 13-16. 6. Brockhurst et al. Experimental coevolution with bacteria and phage: the *Pseudomonas fluorescens*-Φ2 model system // Infect. Genet. Evol. – 2007. – Vol. 7. –

P.547–552. 7. Schwartz M. Adsorption of coliphage lambda to its host: effect of variations in the surface density of receptor and in phage receptor affinity // J.Mol.Biol. – 1976. –Vol.103. – P.121-136. 8. Spoerel N., Herrlich P., Bickle T.A. A novel bacteriophage defense mechanism: the antirestriction protein // Nature. – 1979. – Vol.278. – P.30-34. 9. Paterson S. Antagonistic coevolution accelerates molecular evolution // Nature. – 2010. – Vol.44. – P.25-29. 10. Семчук Л., Бурхан А., Ромашев С. Особливості утворення мутантів фажу 8573sm, що регулює чисельність *Pseudomonas fluorescens*. 36. наук. праць до 50-річчя від дня заснування Інституту сільськогосп. мікробіол. НААН Чернівці. – 2011. – С. 101-106.

Надійшла до редколегії 14.11.12

УДК 612.82/.83; 612.821

А. Лозовська, студ., С. Соловйова, студ.,
Р. Усеїнов, студ., Т. Куценко, канд. біол. наук

ЗМІНИ ПОКАЗНИКІВ ЕЕГ ПРИ ТРИРАЗОВОМУ ПРОХОДЖЕННІ ЕМОЦІЙНОГО ТЕСТУ СТРУПА В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД СТАТІ І ПРАВО-ЛІВОРУКОСТІ

Виявлено, що емоційний ефект Струпа у жінок-правшів і жінок-лівшів виражений краще, ніж у чоловіків-правшів, що узгоджується із відомими з літератури даними про сильніше реагування жінок на негативну, загрозливу інформацію. Порівняння стану спокою з першим проходженням емоційного тесту Струпа у жінок-правшів і жінок-лівшів виявило значну білатеральну активацію в β-діапазоні по всьому скальпу з переважанням в передніх і центральних відділах, тоді як у чоловіків-правшів активація більше виражена в лівій півкулі. При подальших проходженнях тесту у жінок-правшів спостерігались білатеральні перебудови в активності мозку, тоді як у чоловіків-правшів і жінок-лівшів вони більше стосувались лівої півкулі.

Ключові слова: емоційний Тест Струпа, білатеральна активація, активність мозку.

Виявлено, что эмоциональный эффект Струпа у женщин-правшей и женщин-левшей выражен лучше, чем у мужчин-правшей, что согласуется с известными из литературы данными о более выраженном реагировании женщин на негативную, угрожающую информацию. Сравнительное состояние покоя с первым прохождением эмоционального теста Струпа у женщин-правшей и женщин-левшей выявило значительную билатеральную активацию в β-диапазоне по всему скальпу с преобладанием в передних и центральных отделах, тогда как у мужчин-правшей активация более выражена в левом полушарии. При последующих прохождении теста у женщин-правшей наблюдались билатеральные перестройки в активности мозга, тогда как у мужчин-правшей и женщин-левшей они больше касались левого полушария.

Ключевые слова: эмоциональный эффект Струпа, билатеральная активация.

It was appeared that the emotional Stroop effect in right-handed and left-handed women expressed better than in right-handed men, which is consistent with the known from the literature data on stronger women responding to negative, threatening information. Comparing of resting state with the first passage of the emotional Stroop test in right-handed and left-handed women revealed significant bilateral activation in the β-band around the scalp with a predominance in the anterior and central parts, whereas in right-handed men activation was more pronounced in the left hemisphere. With further test passing in right-handed women there were bilateral changes in brain activity, while in the right-handed men and left-handed women changes were more related to the left hemisphere.

Keywords: emotional Stroop effect, bilateral activation, brain activity.

Вступ. Тест Струпа широко використовується у психологічних обстеженнях і клінічній практиці, і навіть названий золотим стандартом тестування довільної уваги, оскільки дозволяє досліджувати зміни функціонування лобних ділянок кори, які найтісніше пов'язані із вищими психічними функціями [9]. Тест Струпа полягає у тому, що обстежуваному подається слово, яке означає певний колір, написане або відповідним кольором – конгруентне (напр., "червоне" червоним), або білим кольором (нейтральне), або невідповідним кольором – неконгруентне ("червоне" зеленим). При співпадінні семантичного значення і кольору реакції здійснюються найшвидше (явище полегшення), при неспівпадінні – найповільніше (явище інтерференції), при реагуванні на нейтральні подразники (назви кольорів, написані білим кольором) латентний період реакції (ЛП) займає проміжне значення. При використанні емоційного тесту Струпа (ЕмЕфСтр) теж потрібно називати колір, яким написане слово, але це є лише, так би мовити, відволікаючий маневр, оскільки слова, які використовуються в тесті, є або нейтральними, або емоційно значущими, і важливою є реакція обстежуваного на слова в залежності від їх емоційного значення. ЕмЕфСтр базується на тому, що емоційні стимули, як більш значущі, ніж нейтральні, довгий час обробляються в нейронних мережах. Емоційний тест Струпа (ЕмСтр), власне, не тестує ефект Струпа, оскільки при його використанні не відбувається взаємодії між словом і його семантичним значенням (напр., колір і назва кольору) [4]. ЕмЕфСтр відображає мимовільне звертання уваги на емоційно значущі стимули, що проявляється у довшому часі реакції на них у порівнянні з нейтральними стимулами.

ЕмСтр широко використовується як в наукових дослідженнях, так і в клініці для дослідження спрямованої уваги і здатності її підтримувати. Інтерференція – це різниця між латентним періодом (ЛП) реакції на емоційно-значущі та нейтральні стимули. Чим більша інтерференція, тобто ЕмЕфСтр, тим сильніше втручаються мимовільні емоційні процеси у систему довільної уваги, порушуючи її. Відомо, що ЕмЕфСтр сильніше проявляється при пред'явленні негативних слів, ніж позитивних. У жінок ЕмЕфСтр сильніше виражений у правій, ніж у лівій півкулі [11]. При пред'явленні емоційно-значущих і нейтральних слів окремими блоками ЕмЕфСтр проявляється сильніше, ніж при змішаному їх пред'явленні, внаслідок явища післядії. ЕмСтр чутливий до умов тестування. Часто повідомляється про відсутність прояву ЕмЕфСтр у здорових обстежуваних. До виникнення ЕмЕфСтр залучена передня системи уваги та емоційно-генні структури мозку [6]. Ймовірно, що за механізмами виникнення ЕмЕфСтр близький до орієнтувального рефлексу [4]. Проте, попри широке практичне використання, невідомими залишаються відмінності у прояві ЕмЕфСтр між здоровими чоловіками і жінками, відмінності у прояві ЕмЕфСтр між праворукими та ліворукими обстежуваними, а також нейрофізіологічні механізми ЕмЕфСтр. Нами були отримані дані відносно змін показників ЕЕГ при повторних проходженнях ЕмСтр, але без урахування статі і право-ліворукості [8]. Тому метою роботи стало дослідження змін у показниках потужності частотних діапазонів ЕЕГ при триразовому проходженні ЕмСтр, який включає в себе гальмівний подразник, в залежності від статі та право-ліворукості.

Об'єкт та методи досліджень. Було обстежено 39 студентів-добровольців університету віком 17-22 роки (14 чоловіків-правшів, 16 жінок-правшів, 9 жінок-лівшів). Результати обстеження чоловіків-лівшів не представлені, оскільки не вдалось набрати репрезентативну вибірку. Обстежувані проходили комп'ютеризований ЕмСтр [1]. По центру екрана з'являлися слова, написані червоним або зеленим кольорами, на які потрібно було реагувати натисканням клавіш правою або лівою рукою відповідно. Обстежуваному пред'являлася серія з 240 слів, по 120 для кожної руки, які пред'являлись у псевдовипадковому порядку. Подразниками були негативні емоційно-значущі слова, емоційно-нейтральні слова, а також гальмівні слова – назви рослин і тварин, у випадку появи яких натискання на клавішу не потрібне. Особливістю використаного тесту є те, що обстежуваний дає відповіді обома руками, тому можна говорити про міжпівкульні відмінності у реакціях на подразники. Другою особливістю цього тесту є використання гальмівного подразника, що, разом із необхідністю співвіднести кольори, якими написані слова, з реакціями правої і лівої руки, значно захоплює увагу обстежуваного і відволікає її від емоційного значення слів. Аналізувались показники латентних періодів (ЛП) реакцій обстежуваних на емоційно-значущі та нейтральні слова, а також кількість помилок правої та лівої рук. Комп'ютеризований ЕмСтр обстежувані проходили 3 рази підряд (ЕмСтр1-3) з 5-хв. станами спокою з відкритими очима, що передували тестам (Сп1-3). Припускалось, що при повторних проходженнях тесту буде спостерігатись ефект навчання (скорочення ЛП реакції) для нейтральних слів, тоді як для емоційних такого ефекту не спостерігатиметься [2]. Паралельно з проходженням комп'ютеризованого ЕмСтр у обстежуваних реєстрували ЕЕГ монополярно за допомогою комплексу "Нейрон-Спектр" за системою "10-20%" у 16 симетричних точках обох півкуль. Аналізувалась повна спектральна потужність діапазонів α -1 (8-9,5 Гц), α -2 (9,6-10,5 Гц), α -3 (10,6-13,0 Гц), β -низькочастотний (β -н, 14-19,9 Гц), β -високочастотний (β -в, 20-35,0 Гц), θ -ритм (4-7,9 Гц). Статистичний аналіз результатів виконувався за допомогою пакету STATISTICA 6.0 (Statsoft, USA, 2001). Нормальність розподілів змінних перевірялась тестом Шапіро-Уїлка ($n \leq 50$). Критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез приймався рівним $p < 0,05$. Оскільки розподіл даних був відмінним від нор-

мального, для аналізу залежних даних використовувався критерій Вілкоксона, незалежних даних – критерій Мана-Вітні. При аналізі результатів враховувались значення медіани та верхнього і нижнього кuartилів.

Результати та їх обговорення. Дослідження латентних періодів реакції для обстежуваних усіх груп показало, що при першому проходженні ЕмСтр час реакції як на емоційні, так і на нейтральні подразники довший, ніж при другому і третьому проходженнях, що відображає ефект впрацювання. Отже, припущення про те, що ефект навчання проявлятиметься лише на нейтральні слова, не підтвердилось. Розбіжності з попереднім дослідженням, можливо, пояснюються тим, що в ньому використовувалась інша модифікація ЕмСтр [2]. ЕмЕфСтр виявився сильніше вираженим для реакцій лівої руки (управляє права півкуля), незалежно від статі і право-ліворукості. Це узгоджується з відомим даними про те, що негативні подразники активують праву лобову кору, а позитивні – ліву [5], оскільки у застосованому нами тесті використовувались подразники саме з негативним емоційним забарвленням. При цьому у жінок ЕмЕфСтр виражений краще, ніж у чоловіків. Отримано, що при повторних проходженнях тесту прояв ЕмЕфСтр посилюється. У жінок обох груп ЕмЕфСтр проявлявся з першого проходження тесту. У жінок-правшів при третьому проходженні тесту ЕмЕфСтр проявлявся як для лівої, так і для правої руки. У чоловіків ЕмЕфСтр виявився при другому і третьому проходженнях тесту. Функціональна асиметрія (відмінності ЛП реакцій правої і лівої руки) при проходженні тесту проявлялась лише на емоційні подразники (з довшими ЛП реакцій лівої руки), і була краще вираженою у жінок-правшів і чоловіків-правшів, ніж у жінок-лівшів. Як за ЛП реакцій, так і за кількістю помилок відмінностей між обстежуваними різними групами не було, що вказує на однакову ефективність виконання завдань.

За результатами ЕЕГ (рис.), при порівнянні СП1 з ЕмСтр1 у жінок обох груп спостерігалась білатеральна активація в β -діапазоні по всьому скальпу з переважанням в передніх і центральних відділах, тоді як у чоловіків-правшів активація була більше вираженою у лівій півкулі. Перше проходження тесту відображає впрацювання, і мозок жінок більше активований, ніж у чоловіків, незалежно від рукості. При подальших проходженнях тесту активація мозку жінок в β -діапазоні значно знижується.

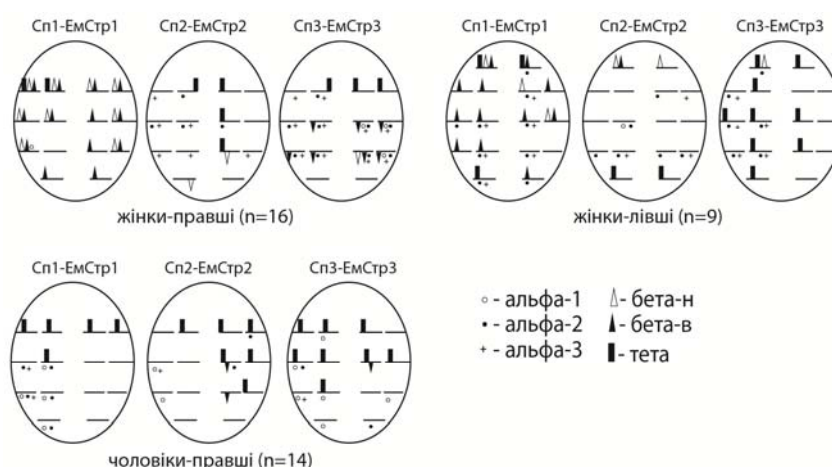


Рис. Відмінності потужностей діапазонів ЕЕГ між етапами проходження емоційного тесту Струпа та станами спокою

Примітки: Сп1,2,3 – стани спокою перед виконаннями тесту, ЕмСтр1,2,3 – етапи проходження тесту

При порівнянні СП2 з ЕмСтр2 у жінок-правшів перебудови виявлялись переважно у лівій півкулі – знижен-

ня α -2 і -3, у жінок-лівшів – зниження α -1,-2,-3, виражене в тім'яних відведеннях білатерально, тоді як у чоловіків-

правшів домінував тета-ритм переважно в передніх та середніх відведеннях правої півкулі. При порівнянні СПЗ з ЕмСтрЗ у жінок-правшів тета-активація проявлялась в лобних відведеннях білатерально, у чоловіків-правшів також білатерально, але не лише в лобних, а і в центральних та тім'яних зліва. У жінок-лівшів прояв тета-діапазону більше виражений по всій лівій півкулі, включаючи скроневі і потиличні ділянки. В цілому у жінок-правшів і чоловіків-правшів сильніше проявляється тета-активація в лобних ділянках у порівнянні з жінками-лівшами. При повторних проходженнях тесту у жінок-правшів спостерігаються білатеральні перебудови в активності мозку, тоді як у чоловіків-правшів і жінок-лівшів вони більше стосуються лівої півкулі.

Підвищення тета-ритму в лобних відведеннях, можливо, пов'язане з індивідуальною готовністю уваги і можливістю адекватної концентрації уваги, якої потребує виконання завдання [7]. Функціональне значення тета-ритму – це забезпечення стану уваги та готовності до переробки інформації. Існують відомості, що тета-активність зареєстрована в нейронах мигдалини, вона з'являється при емоційному збудженні. М. Н. Ліванов розглядав тета-ритм як показник емоційно-мотиваційного стану, а альфа-ритм – як показник спокою, що цілком узгоджується з отриманими даними. Між функціональними змінами тета- і альфа-ритму спостерігається реципрокна взаємодія: при зростанні ефективності виконання задачі фазичні зміни потужності (викликані сенсорною стимуляцією або виконанням задачі) в тета-діапазоні полягають в її збільшенні, а потужність альфа-ритму навпаки, зменшується [3]. Ця теза узгоджується з даними, отриманими при аналізі поведінкових реакцій: спостерігався ефект навчання по мірі повторних проходжень ЕмСтр, тобто останній раз обстежувані краще справлялися з завданням, ніж перший чи другий раз. За останніми даними, при виконанні ЕмСтр спостерігається дельта-бета поєднання (позитивна кореляція між потужністю швидких бета і повільних дельта частотних діапазонів) у лобових ділянках кори [10], тому такий аналіз ми плануємо провести в подальших дослідженнях.

Слід також наголосити, що як за тривалістю ЛП реакцій, так і за показниками ЕЕГ перше проходження тесту значно відрізняється від другого і третього, тоді як два останніх мало відрізняються між собою. А це означає, що для отримання валідних результатів потрібно враховувати ефект впрацювання.

Ймовірно, що значна білатеральна активація мозку жінок з самого початку виконання тесту дозволяє залучити частину ресурсів уваги на виявлення не релевантних, проте, важливих для організму емоційно-значущих подразників, тоді як мозок чоловіків більше зосереджений на виконанні основного завдання, на яке і звернута його увага, що на неврологічному рівні проявляється у залученні лівої півкулі і лобних ділянок кори білатерально. Отримані поведінкові результати щодо кращого прояву ЕмЕфСтр у жінок у порівнянні з чоловіками підтверджують відомості про більшу емоційність жінок, яка особливо стосується реагування на негативні, небезпе-

чні стимули. Білатеральна активація мозку жінок, особливо на етапі впрацювання, узгоджується із відомими з літератури даними про тісніші міжпівкульні зв'язки у жінок. У жінок-лівшів за ЛП реакцій була менше виражена функціональна асиметрія, яка чітко проявилась у жінок-правшів і чоловіків-правшів.

Висновки: Емоційний ефект Струпа краще виражений у жінок-правшів і жінок-лівшів у порівнянні із чоловіками-правшами, що узгоджується із відомими з літератури даними про сильніше реагування жінок на негативну, загрозливу інформацію. Порівнянні стану спокою з першим проходженням емоційного тесту Струпа виявило ефект впрацювання, який у жінок обох груп виражається в значній білатеральній активації в β -діапазоні по всьому скальпу з переважанням в передніх і центральних відділах, тоді як у чоловіків-правшів активація більше виражена у лівій півкулі. Ймовірно, що значна білатеральна активація мозку жінок з самого початку виконання тесту дозволяє залучити частину ресурсів уваги на виявлення не релевантних, але важливих для організму емоційно-значущих подразників, тоді як мозок чоловіків більше зосереджений на виконанні основного завдання. При подальших проходженнях тесту у жінок-правшів перебудови в активності мозку білатеральні, тоді як у чоловіків-правшів і жінок-лівшів вони більше стосуються лівої півкулі. При цьому у жінок-правшів і чоловіків-правшів тета-активація більше пов'язана з фронтальними ділянками кори, тоді як у жінок-лівшів вона більш генералізована.

Список використаної літератури. 1. Костенко С.С., Кравченко В.І., Макачук М.Ю. Тест для оцінки явища інтерференції під час обробки нерелевантних емоційно значущих стимулів // Науковий вісник Волинського університету імені Лесі Українки. Серія "Біологічні науки". Вип.3. – 2008. – С. 70-73. 2. Куценко Т.В., Філімонова Н. Б., Новицька О. К. Ефект навчання при багаторазовому проходженні емоційного Струп-тесту// Вісник Київського університету (серія Біологія). – 2010. – Вип. 55. – С.30-32. 3. Разумникова О. М. Мышление и функциональная асимметрия мозга. – Новосибирск: Издательство СО РАН. – 2004. – 272 с. 4. Algom, D., Chajut, E., & Lev, S. A rational look at the emotional Stroop phenomenon: A generic slowdown, not a Stroop effect.//Journal of Experimental Psychology: General. – 2004. – 133(3). – P. 323–338. 5. Baeken C., De Raedt R., Van Schuerbeek P., Vanderhasselt M.A. Right prefrontal HF-rTMS attenuates right amygdala processing of negatively valenced emotional stimuli in healthy females // Behavioural Brain Research. – 2010. – Volume 214, Issue 2. – P. 450–455. 6. Compton, R. J., Banich, M. T., Mohanty, A., Milham, M. P., Herrington, J., Miller, G. A., et al. Paying attention to emotion: An fMRI investigation of cognitive and emotional Stroop tasks // Cognitive, affective, and behavioural neuroscience. – 2003. – 3(2). – P. 81–96. 7. Gundel A., Wilson G. F. Topographical changes in the ongoing EEG related to the difficulty of mental tasks // Brain Topogr. – 1992. – Vol. 5. – N 1. – P. 17-25. 8. Kutsenko T.V., Solov'yova S. V., Makarchouk N. E., Kostenko S. S. Modifications of EEG Related to Repeated Realizations of the Emotional Stroop Task// Neurophysiology. – 2012. – Vol. 43, No. 5. – P.413-416. 9. MacLeod C. M. (1991) Half a Century of Research on the Stroop Effect: An Integrative Review. // Psychological Bulletin. – 1991. – Vol. 101, No. 2. – P. 163-203. 10. Putman P. Resting state EEG delta-beta coherence in relation to anxiety, behavioral inhibition, and selective attentional processing of threatening stimuli //Int J Psychophysiol. – 2011. – 80(1) – P. 63-68. 11. Van Strien J. W., Valstar L. H. The lateralized emotional stroop task: left visual field interference in women. //Emotion (Washington, D.C.). – 2004. – 4 (4). – P.403-409.

Надійшла до редколегії 13.11.12

УДК 577.21:612.34:616.33-008.821.14

К. Дворченко, канд. біол. наук, А. Драницина, канд. біол. наук,
У. Савко, асп., Л. Остапченко, д-р біол. наук

ЕКСПРЕСІЯ ГЕНА *TGFB1* У ЕПІТЕЛІОЦИТАХ ДВНАДЦЯТИПАЛОЇ КИШКИ ЩУРІВ ЗА УМОВ ТРИВАЛОЇ ГІПОАЦИДНОСТІ ТА ПРИ ВВЕДЕННІ МУЛЬТИПРОБІОТИКА СИМБІТЕР

Виявлено зростання експресії гена *Tgfb1* в епітеліоцитах ворсинок та зменшення рівня мРНК *Tgfb1* в епітеліоцитах крипт дванадцятипалої кишки за гіпоацидних умов. При введенні мультипробіотика "Симбітер"® ацидофільний концентрований за тих же умов вміст мРНК *Tgfb1* у епітеліоцитах ворсинок та крипт був на рівні контрольних значень.

Ключові слова: експресія гена, епітеліоцити ворсинок, епітеліоцити крипт, мультипробіотик Симбітер.

Выявлен рост экспрессии гена *Tgfb1* в эпителиоцитах ворсинок и уменьшение уровня мРНК *Tgfb1* в эпителиоцитах крипт двенадцатиперстной кишки в условиях гипoaцидных умов. При введении мультипробіотика "Симбітер"® ацидофильный концентрированный при тех же условиях содержание мРНК *Tgfb1* в эпителиоцитах ворсинок и крипт был на уровне контрольных значений.

Ключевые слова: экспрессия гена, эпителиоциты ворсинок, эпителиоциты крипт, мультипробіотик Симбітер.

The elevation of *Tgfb1* gene's expression in rat's duodenal villus epithelial cells and the decreasing of mRNA level of *Tgfb1* in crypt epithelial cells upon hypoaacidic conditions were shown. The level of *Tgfb1* mRNA both in villus and crypt epithelial cells with administration of multiprobiotic "Symbiter"® acidophilic concentrated upon the same conditions was similar to control.

Keywords: gene's expression, epithelial cells, crypt epithelial, multiprobiotic "Symbiter"® acidophilic concentrated.

Вступ. Родина TGF- β належить до мультифункціональних цитокінів, яка складається з гетеродимерних протеїнів TGF- β -1, -2, -3 та -4. В організмі найбільш розповсюдженою є ізоформа 1 трансформуючого фактору росту β (TGF- β 1), яку кодує ген *Tgfb1*. Цитокін TGF- β 1 спричинює множинні впливи на різні типи клітин, приймаючи участь у регуляції росту клітин, їх диференціації, апоптозі, імунної відповіді та ремоделюванні екстрацелюлярного матриксу. TGF- β 1 на початкових стадіях канцерогенезу діє як супресор пухлин, а на більш пізніх етапах, коли клітини стають нечутливими до пригнічення росту ззовні, він виконує роль онкопротора, стимулюючи ангиогенез, імуносупресію та синтез позаклітинного матриксу, що сприяє росту та метастазуванню пухлин [9, 10, 12, 14].

Безпосередня або опосередкована активація певного сигнального шляху в клітині під дією TGF- β 1 залежить від типу клітини-мішені, стадії її диференціювання, стану позаклітинного матриксу та концентрації інших цитокінів. За фізіологічних умов ген *Tgfb1* експресується в клітинах різних органів, зокрема, у шлунку, дванадцятипалій кишці (ДПК), підшлунковій залозі, проте встановлено, що зміна його експресії асоційована з розвитком запальних процесів та канцерогенезом [9, 10, 12]. В експериментальних та клінічних дослідженнях показана участь трансформуючого фактору росту β 1 у патогенезі ряду захворювань. Виявлено, що при атрофічному процесі у клітинах слизової оболонки антрального відділу шлунка, обумовленого структурно-функціональними особливостями пілоричних залоз, спостерігається зниження експресії TGF- β 1 [12]. При целиакиї (глютенова ентеропатія, яка характеризується порушенням кишкового всмоктування, суб- чи атрофією слизової оболонки тонкої кишки) у біопсійних зразках ДПК дітей рівень мРНК гену TGF- β 1 знижується, особливо у ворсинках. Також показано зниження експресії TGF- β 1 як у ворсинках, так і в крипах ДПК дітей при множинній харчовій алергії [9]. При хронічному панкреатиті у людей та експериментальному у щурів TGF- β 1 відіграє важливу роль у прогресуванні захворювання за рахунок посилення місцевої реакції запалення, стимуляції фібробластів і секреції колагену, що, у свою чергу, призводить до фіброзу підшлункової залози [12]. Підвищення ризику розвитку канцерогенезу у органах ШКТ пов'язано з втраченою чутливістю до гальмівного ефекту TGF- β 1 або із надмірною його експресією. Так, у шлунку надекспресія гену TGF- β 1 пов'язана із синтезом колаге-

ну в пухлині, що призводить до розвитку пластичного лініту (дифузний рак шлунка) людини. В панкреатичних клітинах рівень ізоформ TGF- β та надекспресія їх мРНК зростає за умов розвитку раку підшлункової залози, що корелює з розповсюдженістю пухлинного процесу в тканині [10, 12]. У хворих з гепатоцелюлярною карциномою відбувається надекспресія гену TGF- β 1 у трансформованих клітинах печінки, які нерідко набувають стійкості до цього фактору [7].

Таким чином, будь-які зміни експресії гену TGF- β 1 можуть індукувати розвиток різних патологічних станів травної системи. В зв'язку з цим рівень експресії гену *Tgfb1* може бути використаний як прогностичний маркер розвитку захворювань органів шлунково-кишкового тракту (ШКТ). Одним із ключових наслідків тривалої гіпоацидності є колонізація ШКТ умовно-патогенною мікрофлорою, яка формує резервуари стійкої ендогенної інфекції [11]. Для корекції порушень дисбалансу мікрофлори використовують пробіотичні препарати, які не лише ефективно усувають дисбіотичні стани, але й безпосередньо зменшують ступінь ураження органів ШКТ [3, 4]. Тому в наших дослідженнях було використано мультикомпонентний пробіотичний препарат "Симбітер"® ацидофільний концентрований (Симбітер), який являє собою максимально наближену до природних мікробіоценозів організму людини та тварин симбіотичну суміш клітин біфідобактерій, лактобацил, лактококів та пропіоновокислих бактерій [4]. З урахуванням цього було висловлено припущення про зміну експресії гена *Tgfb1* у епітеліоцитах ДПК щурів за умов тривалої гіпоацидності та при введенні мультипробіотика Симбітер. Для підтвердження або спростування цієї гіпотези були проведені експериментальні дослідження, метою яких було визначення експресії *Tgfb1* у епітеліоцитах ДПК щурів за умов тривалої пригнічення шлункової секреції гідрохлоридної кислоти омегапролоном та при введенні мультипробіотика Симбітер.

Об'єкт та методи досліджень. У досліді використовували білих нелінійних статевозрілих щурів-самців із початковою вагою 180-200 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. У роботі дотримувалися міжнародних рекомендацій стосовно проведення медико-біологічних досліджень із використанням тварин згідно Європейської конвенції (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes).

Тварин розділяли на чотири групи. В якості контролю (перша група) використовували щурів, яким протягом 28 днів вводили інтраперитонеально 0,2 мл та перорально 0,5 мл води для ін'єкцій. Тварини другої групи протягом 28 днів перорально отримували Симбітер (виробництва ТОВ "О.Д. Пролісок") у дозі 0,14 мл/кг, розчинений у 0,5 мл води для ін'єкцій. Моделювання гіпоацидного стану (третя група) проводили за допомогою внутрішньочеревного введення 14 мг/кг омепразолу, 1 раз на добу протягом 28 днів [13]. Четверта група щурів одночасно з інтраперитонеальним введенням омепразолу перорально отримувала Симбітер у вищезазначеній дозі.

Епітеліоцити ворсинок та крипт із ДПК ізолювали за допомогою низькотемпературного методу [5]. РНК отримували за методом Chomczynski [2]; кДНК синтезували в 20 мкл реакційної суміші, яка містила 2 мкг РНК, 1 мМ дНТФ, 200 од. зворотної транскриптази RevertAid M-MuLV, відповідний буфер, 20 од. рибонуклеазного інгібітору (RiboLock), 20 пкМ зворотного праймеру. Синтез проводився за таких умов: 70°C – 5 хв., далі 37°C – 5 хв., 42°C – 1 год. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили в 30 мкл реакційної суміші, що містила 10 мкл кДНК, буфер для ПЛР, по 200 мкМ кожного дНТР, по 30 пкМ кожного праймера, до 2,5 мМ MgCl₂ та 1,5 од. Taq ДНК полімерази ("MBI Fermentas", Литва). Ампліфікацію фрагментів ДНК здійснювали за таких температурних умов: ініціююча денатурація 94°C – 4 хв.; далі 35 циклів (для β-актину (ген, що використовується в якості внутрішнього контролю реакції завдяки конститутивній експресії) – 30 циклів): денатурація ДНК 94°C – 45 сек.; гібридизація праймерів 52°C – 45 сек. для *Tgfb1* (298 п.н.) та 49°C – 40 сек. для β-актину (521 п.н.); добування ланцюга 72°C – 1 хв. 15 сек (для *Tgfb1*) або 1 хв. (для β-актину). Після цього проводили добування ампліфікатів при 72°C – 5 хв. У реакціях було використано такі послідовності праймерів: для *Tgfb1* – прямий – CTTCAGCTCCACAGAGAAGAACTGC та зворотний –

CACGATCATGTTGGACAACTGCTCC; для β-актину – прямий – TGGGACGATATGGAGAAGAT та зворотний – ATTGCCGATAGTGATGAXCT. Розділення продуктів полімерізацій ланцюгової реакції проводили електрофоретично в 1,6% агарозному гелі ("Gibco", Німеччина), у 0,5 кратному TBE буфері, при напрузі 5-10 В/см. Для напівкількісного аналізу експресії ампліконів на основі денситометрії було використано програму ImageJ 1.45s (NIH, США). Індекси експресії мРНК визначали для кожного зразку, як описано в Konturek et al. [6].

Математичну та статистичну обробку результатів досліджень проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики на комп'ютері з використанням програмного пакету GraphPad Prism 4.03 (GraphPad Software Inc., США). Отримані дані тестувалися на нормальне розподілення за допомогою тесту Шапіро-Вілкі. Подальший обрахунок результатів відбувався за допомогою двофакторного дисперсійного аналізу (two-way ANOVA) із пост тестом Бонферонні. Значення $p \leq 0,05$ було прийнято як вірогідне.

Результати та їх обговорення. У результаті проведених експериментальних досліджень встановлено наявність мРНК гена *Tgfb1* (продукт ЗТ-ПЛР, розміром – 298 п.н.) у зразках ДПК усіх чотирьох груп тварин як у ворсинках, так і в крипах епітеліальних клітин ДПК. Рівні експресії гена *Tgfb1* у контролі епітеліоцитів як ворсинок, так і крипт достовірно не відрізнялися. Рівні експресії цього гена в епітеліоцитах як ворсинок, так і крипт, у групі щурів, які отримували Симбітер, та в групі тварин, яким сумісно вводили омепразол та Симбітер, достовірно не відрізнялися між собою та від рівнів відповідної мРНК в епітеліальних клітинах ворсинок та крипт ДПК контрольної групи, на відміну від рівнів експресії цього гена у ворсинках та крипах епітелію ДПК, у групі щурів, яким вводили омепразол ($F=799,2$, $DFn=3$, $DFd=40$, $p \leq 0,0001$) (табл. 1, рис. 1).

Таблиця 1. Рівень експресії мРНК *Tgfb1* у епітеліоцитах ДПК щурів за умов тривалої гіпоацидності та при введенні мультипробіотика Симбітер, ($m \pm SD$, $n=6$)

Група тварин	Епітеліоцити	Відносна експресія TGF-β/β-актин
Контроль	ворсинки	$0,670 \pm 0,0736$
	крипти	$0,665 \pm 0,0723$
Симбітер	ворсинки	$0,685 \pm 0,1060$
	крипти	$0,678 \pm 0,0750$
Омепразол	ворсинки	$2,747 \pm 1,0511^c$
	крипти	$0,350 \pm 0,0565^c$
Омепразол + Симбітер	ворсинки	$0,704 \pm 0,0421^*$
	крипти	$0,669 \pm 0,0944^*$

Примітки: SD – середньоквадратичне відхилення (дисперсія); * – $p \leq 0,0001$ порівняно з контролем; # – $p \leq 0,0001$ порівняно з групою тварин, яким вводили омепразол; c – $p \leq 0,0001$ ворсинки порівняно з крипами

Як видно з таблиці 1 та на рисунку 1, за умов тривалої шлункової гіпохлоргідрії в епітеліальних клітинах ворсинок ДПК вміст мРНК гена *Tgfb1* зростав у 4,1 рази у порівнянні з контролем ($p \leq 0,0001$); у той же час, при одночасному введенні мультипробіотика Симбітер та омепразолу, рівень відповідної мРНК знижувався в 3,9 рази по відношенню до групи тварин з гіпоацидним ста-

ном ($p \leq 0,0001$). В епітеліоцитах крипт ДПК за умов тривалої гіпоацидності рівень експресії гена *Tgfb1* знижувався в 1,9 рази у порівнянні з контролем ($p \leq 0,0001$). При одночасному введенні мультипробіотика Симбітер та омепразолу рівень відповідної мРНК повертався до контрольних значень ($p \leq 0,0001$) (табл. 1, рис. 1).

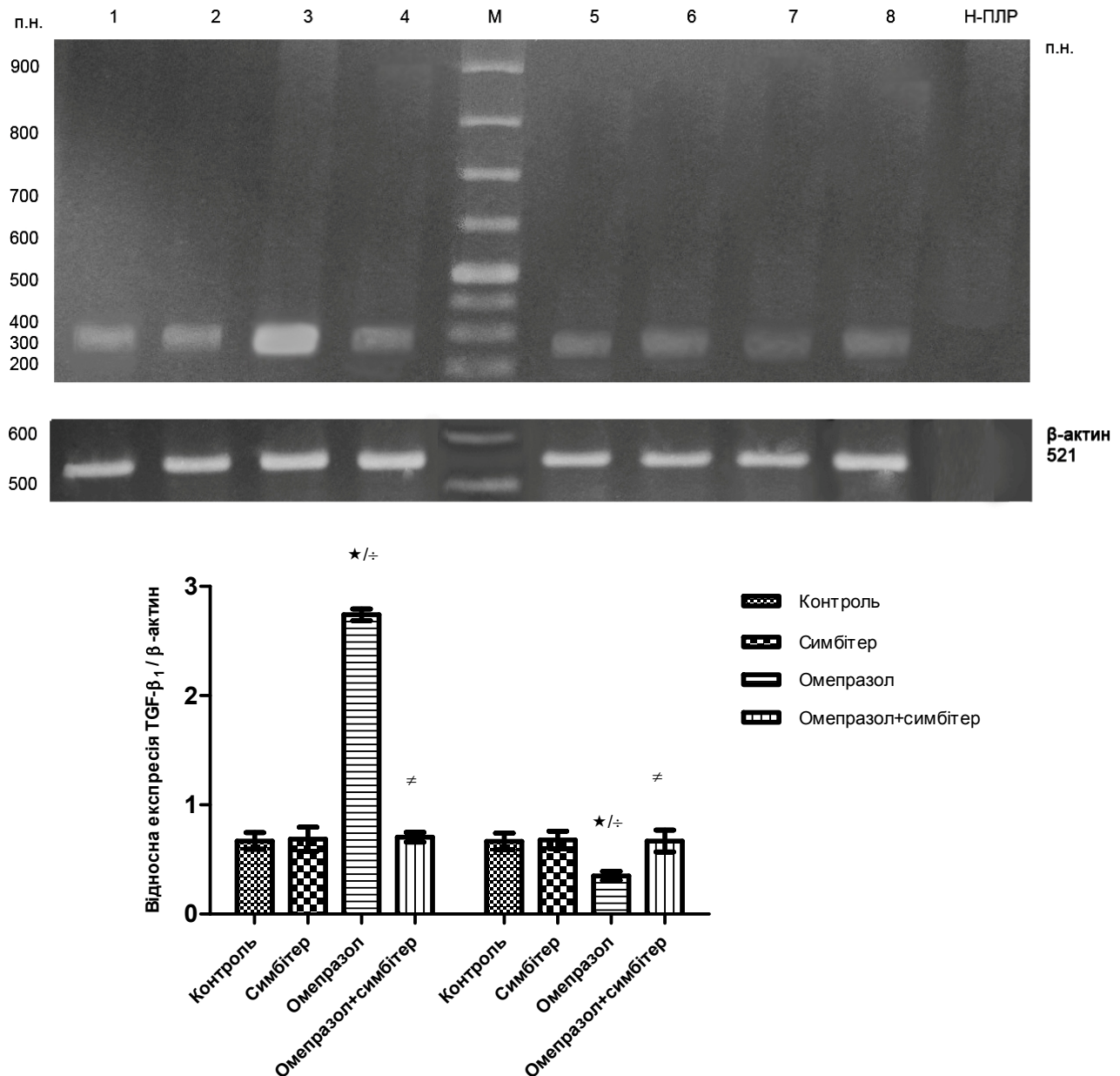


Рис. 1. Рівень експресії мРНК трансформуючого фактору росту β у епітеліоцитах ДПК шурів за умов тривалої гіпоацидності та при введенні мультипробіотика Симбітер

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

Встановлене в наших дослідженнях підвищення рівня експресії TGF- β_1 в епітеліоцитах диференційованих ворсинок за умов тривалої гіпоацидності може свідчити як про посилення запальних реакцій у ДПК, так і про можливу втрату чутливості до гальмівного ефекту TGF- β_1 , що може сприяти пухлинній трансформації епітеліальних клітин на більш пізніх стадіях розвитку патологічного процесу [9, 12, 14]. Зниження рівня експресії гену TGF- β_1 в епітеліоцитах крипт ДПК при тривалій шлунковій гіпохлоргідрії може свідчити про нестачу цього важливого цитокіну, необхідного для інгібування проліферації та диференціації певного роду клітин [9, 14]. Відомо, що функцією крипт є репродукція клітин, які відновлюють кишковий епітелій. Крім проліферуючих клітин, що дозрівають та рухаються в напрямку до ворсинок, у

криптах представлені високодиференційовані секреторні клітини: клітини Панета, келиховидні та ентерохромафінні (ендокринні) клітини [8, 11].

Таким чином, встановлені зміни у рівні експресії гену TGF- β_1 в епітеліоцитах ворсинок та крипт за умов тривалої шлункової гіпохлоргідрії, свідчать про розвиток патологічних зрушень у тканині ДПК. Різноманітність змін експресії гену TGF- β_1 в епітеліальних клітинах ворсинок та крипт ДПК обумовлена їх структурно-функціональними особливостями. Відомо, що на ранніх стадіях запальних захворювань тонкої кишки в першу чергу пошкоджуються епітеліоцити крипт за рахунок міграції нейтрофілів із судин у просвіт крипт, що призводить до формування криптових абсцесів [8]. Серед можливих механізмів впливу мультипробіотика Симбітер

на експресію генів у ДПК, у першу чергу, слід зазначити його здатність ліквідувати бактеріальну колонізацію ШКТ та дисбіоз, що знімає зі ШКТ та асоційованих органів навантаження з боку патогенної мікрофлори [3, 4]. Крім того, продукти життєдіяльності бактеріальних штамів, які представлені в препараті Симбітер, володіють антиоксидантними властивостями, завдяки чому вони здатні гальмувати розвиток окисного стресу та знижувати інтенсивність запальних процесів у ДПК [1].

Висновки. Стан експериментальної тривалої гіпоацидності супроводжується зміною характеру експресії гена *Tgfb1* в епітеліальних клітинах дванадцятипалої кишки щурів, тоді як при введенні мультипробиотика Симбітер патерн експресії зазначеного гена подібний до контролю. Виходячи з отриманих даних, можна припустити про залучення гена *Tgfb1* у розвиток патологічних процесів у ДПК за умов тривалого прийому інгібіторів протонної помпи парієтальних клітин шлунка.

Список використаної літератури. 1. An H., Zhai Z., Yin S. et al. Coexpression of the superoxide dismutase and the catalase provides remarkable oxidative stress resistance in *Lactobacillus rhamnosus* // J. Agric. Food Chem. – 2011. – Vol. 59(8). – P. 3851-3856. 2. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction // Anal. Biochem. – 1987. – Vol. 162. – P. 156-159. 3. Culligan E., Hill C., Sleator R. Probiotics and gastrointestinal disease: successes, problems and future prospects //

Gut Pathogens. – 2009. – Vol.1, №19. – P. 38-49. 4. Falaleeva T.M., Virchenko O.V., Beregova T.V., Iankovsky D.S. Correction of stress-induced changes in hypothalamic-pituitary-adrenal system by multiprobiotic "Symbiter" // World of medicine and biology. – № 1. – 2012. – P. 173-178. 5. Flint N., Cove F.L., Evans G.S.H. A low-temperature method for the isolation of small-intestinal epithelium along the crypt-villus axis // Biochem J. – 1991. – Vol. 280 (Pt 2). – P. 331-334. 6. Konturek P.C., Brzozowski T., Pierzchalski P. et al. Activation of genes for spasmolytic peptide, transforming growth factor alpha and for cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 during gastric adaptation to aspirin damage in rats. // Aliment Pharmacol. Ther. – 1998. – 12. – P. 767-777. 7. Lee D., Chung YH., Kim JA et al. Transforming growth factor beta 1 overexpression is closely related to invasiveness of hepatocellular carcinoma // Oncology. – 2012. – Vol. 82(1). – P. 11-18. 8. Physiology of the gastrointestinal tract / L. R. Johnson. – Academic Press; 4th edition, 2006. – 2080 p. 9. Perez-Machado M.A., Ashwood P., Thomson F.L. et al. Reduced transforming growth factor- β -1-producing T cells in the duodenal mucosa of children with food allergy // Eur. J. Immunol. – 2003. – Vol. 33. – P. 2307-2315. 10. Rane S., Lee J-H., Lin H-M. Transforming growth factor- β pathway: role in pancreas development and pancreatic disease // Cytokine & Growth Factor Reviews. – 2006. – Vol. 17. – P. 107-119. 11. Textbook of gastroenterology / T. Yamada, D. Alpers, A. Kalloo et al. – Wiley-Blackwell; 5th edition, 2008. – 3712 p. 12. Truty M., Urrutia R. // Transforming growth factor- β : what every pancreatic surgeon should know // Surgery. – 2007. – Vol. 141. – P. 1-6. 13. Tsyriuk O.I., Beregova T.V. Effect of omeprazole-induced hypergastrinemia on the basal gastric secretion in rats // Bulletin of biological and medical issues. – 2007. – № 3. – P. 38-43. 14. Yoshimura A., Wakabayashi Y., Mori T. Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF- β // J. Biochem. – 2010. – 147 (6). – P. 781-792.

Надійшла до редколегії 26.11.12

УДК 577.3

О. Хома, асп., В. Сорока, канд. біол. наук,
Д. Ноздренко, канд. біол. наук

МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ УЛЬТРАСТРУКТУРИ САРКОМЕРА ШТУЧНО ІШЕМІЗОВАНОГО М'ЯЗА ЩУРА

Досліджено структуру литкового м'язу щура після 5денної ішемізації. Показано, що першою ознакою ішемізації м'язового волокна є зміни в Z-дисках, які втрачають свою взаємну орієнтацію та паралельне розміщення. Ще однією ознакою, яка вказує на некротичне ураження м'язів і яка проявляється вже на перших стадіях ішемії є зміна топології мембрани міоцитів, з утворенням численних випинів, помітних навіть при застосуванні світлової мікроскопії. Визначено, що міоцити ішемізованого м'язу активно заміщуються на сполучну тканину.

Ключові слова: саркомер, ішемізований м'яз, сполучна тканина.

Исследована структура икрожной мышцы крысы после 5 дневной ишемизации. Показано, что первым признаком ишемизации мышечного волокна являются изменения в Z-дисках, которые теряют свою взаимную ориентацию и параллельное размещение. Еще одним признаком, указывающим на некротическое поражение мышцы и которая проявляется уже на первых стадиях ишемии является изменение топологии мембраны миоцитов, с образованием многочисленных выпуклостей, заметных даже при применении световой микроскопии. Определено, что миоциты ишемизированной мышцы активно замещаются на соединительную ткань.

Ключевые слова: саркомер, ишемизированная мышца, соединительная ткань.

Calf muscle of the rat was investigated after 5 days of ischaemisation. Shown that the first sign of muscle fiber ischaemisation is a change in Z disks location, which lose their mutual orientation and proper placement. Another sign that indicates necrotic lesion of the muscle, which could be manifested even j first stages of ischemia is the loss of normal membrane topology of myocyte, with forming of numerous protrusion, visible even with the use of light microscopy. Quick replacement of myocytes by fibrous tissue in ischemized muscle was specified.

Keywords: sarcomere, muscle fiber ischaemisation, fibrous tissue.

Вступ. Ішемія посмугованих скелетних м'язів – поширена патологія опорно-рухового апарату людини. Вона може виникати як ускладнення після різноманітних травматичних ушкоджень кінцівки, тяжких інфекцій, опіків, судинних патологій, так і при недостатньому лікуванні, і навіть як результат тривалої компресії кінцівки та після спортивних навантажень [1]. Необхідно зазначити, що м'язова тканина є найбільш чутливою до тривалої ішемії кінцівки, повна ішемізація якої протягом 4-5 годин призводить до незворотних змін в м'язі і втрати скоротливої функції, а також некротизації тканин, що потенційно може стати причиною не тільки інвалідності, а і смерті постраждалого (Краш синдром) [2]. Часткова ішемія є більш поширеною і складнішою у діагностуванні ніж гостра, при цьому швидкість розвитку патології обернено пропорційна степеню погіршення трофіки тканин і становить зазвичай 3-5 діб при оклюзіях магістральних судин [3]. У клінічній практиці накопичено значний об'єм емпіричних даних підсумовуючи які можна

зробити висновки, що ішемія посмугованих м'язів є поліморфним явищем з різними ступенями і часом прояву, симптоматикою і динамікою, що нерідко маскується проявами інших патологій. Загроза виникнення ішемії часто буває недооціненою і як правило, виявляється на пізніх етапах розвитку, що створює необхідність в значних хірургічних втручаннях без гарантії на повне одужання [4]. Це пов'язано з відсутністю узагальнених фундаментальних уявлень про патогенез ішемічного ураження кінцівок, а також неефективністю існуючих методів діагностування ішемії на ранніх етапах розвитку процесу. Метою роботи було з'ясування морфологічних і ультраструктурних змін м'язів ссавців при частковій п'ятиденній ішемії.

Методи та матеріали. Дослідження проводили на 8 дорослих щурах (самцях) масою від 0,2 до 0,3 кг, які були поділені на 2 групи: контрольну (4 тварини) і дослідну (4 тварини). Анестезію здійснювали внутрішньочеревним введенням нембутала (40 мг/кг). Контроль життєвих функцій і хірургічне втручання проводили згідно

© Хома О., Сорока В., Ноздренко Д., 2013

дно стандартних рекомендацій для ветеринарної хірургії дрібних гризунів [5]. Для індукції часткової ішемії нижньої кінцівки в дослідній групі тварин робили розріз на шкірі внутрішньої поверхні стегна паралельно кістці, довжиною 2 сантиметри, на відпрепаровану ліву стегову артерію (a. femoralis) в місці її виходу з черевної порожнини накладали дві лігатури на відстані 5 мм одна від одної, артерію між лігатурами перерізали. Ішемізація м'язів нижньої кінцівки тривала протягом 5 діб. Після цього проводили повторну операцію для виділення ішемізованого m. gastrocnemius. У контрольній групі тварин проводили симуляцію операції.

Світлова мікроскопія. Зразки м'язової тканини (розміром 5x5x5мм) фіксували протягом двох тижнів у 10% формаліні, після чого витримували протягом 10 днів у 7% формаліні додатково. Зневоднення зразків проводили в розчинах етилового спирту зростаючої концентрації. Зразки заливали в парафінові блоки і нарізали мікротомом (MC-2) на слайси товщиною 10 мкм. Фарбування проводили за Ван Гізоном [6]. Мікроскопічне дослідження і фотографування проводили на мікроскопі Axioscop фірми "Carl ZEISS" обладнаному цифровою камерою SEO.

Електронна мікроскопія. Зразки м'язової тканини (1x1x1мм) фіксували у 2 % розчині глютарового альдегіду на 0,1 М кокодилатному буфері (pH 7,4) з наступною постфіксацією у 1 % розчині тетроксиду осмію протягом 0,5 год. Дегідратацію зразків проводили у ацетоні зростаючої концентрації з наступною їх заливкою у блоки епоксидної смоли (SPI-CHEM, США). Нарізку зразків

здійснювали на ультрамікромомі UMC (SEO, Україна, Суми). Товщина зрізів 20 нм. Контрастування проводили цитратом свинцю та ураніл ацетатом. Зразки вивчалися на електронному мікроскопі ПЕМ-100 (SEO, Україна, Суми) при прискорюючій напрузі у 75 кВ. Фотографії, отримані за допомогою світлової та електронної мікроскопії обробляли в програмі "ВідеоТест Морфологія 5.0"

Результати та обговорення. До 4 доби зміни структури тканини є слабо вираженими. При дослідженні м'язових тканин у тварин дослідної групи після 5 денної часткової ішемії почали відбуватись морфологічні зміни. Перш за все, в ішемізованому м'язі змінюється співвідношення скоротливих і сполучнотканинних компонентів, в бік кількісного накопичення останніх, тоді як парціальний об'єм некротичних м'язових елементів помітно зменшується. Збільшення кількості сполучної тканини, на нашу думку, спричинене зростанням чисельності і активності фібробластів, що добре видно на фото поперечного зрізу ішемізованої тканини де в лівому верхньому кутку знаходиться велика кількість цих клітин ядра яких забарвлені в темний колір (рис. 1). Товщина прошарку сполучної тканини (що є необхідним структурним компонентом м'язу) між міоцитами ішемізованої тканини в середньому становила $0,92 \pm 0,04$ мкм, тоді як в нормі цей показник дорівнює $0,19 \pm 0,04$ мкм, тобто кількість сполучної тканини в ішемізованому м'язі збільшилась майже у 5 разів. Необхідно також додати, що оскільки ішемія є частковою більша частина міоцитів зберігала морфологію характерну для здорових клітин. (більше 60-70 відсотків).

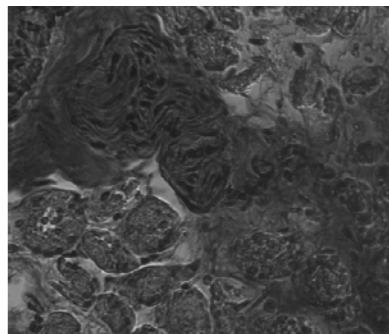
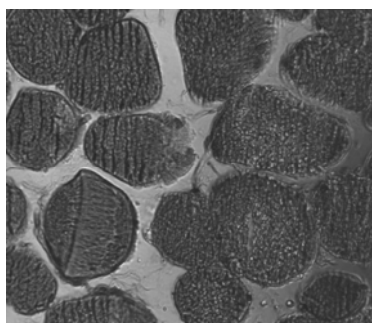


Рис. 1. Поперечний переріз м'язової тканини литкового м'яза щура: справа – ішемізована тканина, зліва – контроль. (світлова мікроскопія, x100)

Майже на усіх фото помітно, що для міоцитів, які почали руйнуватися (з подальшим заміщенням сполучною тканиною) характерними є значні зміни топології мембрани, а саме: утворення хвиляподібних випинів і вп'ячувань, деформації форми клітин, розриви мембрани з виходом ядер в міжклітинний простір, що має різкий контраст з формою здорових міоцитів контрольної групи (рис.2.). Очевидно, що таке спотворення нормальної морфології клітин є результатом некротизації

міоцитів (для апоптозу характерні інші цитологічні ознаки). Отже, як бачимо, морфологічні зміни м'язового волокна набувають помітного прояву вже на 5 добу часткової ішемії, а саме: відбувається збільшення кількості фібробластів у міжклітинному просторі, м'язова тканина заміщується сполучною, з'являються випини та вп'ячування плазматичної мембрани. Всі ці перетворення посилюються при подальшому розвитку патології і є незворотніми.

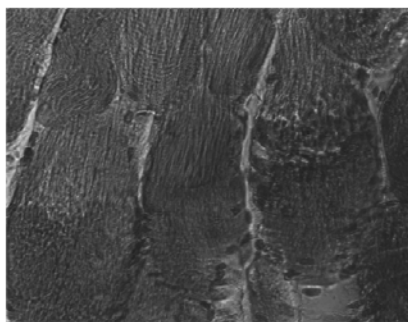
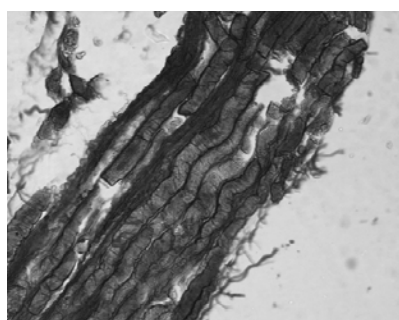


Рис. 2. Поздовжній переріз м'язової тканини литкового м'яза щура, праве фото – ішемізована тканина, контроль – зліва (світлова мікроскопія, x100)

Відмічено, що рухливість ішемізованих задніх кінцівок прооперованих тварин значною мірою знижена порівняно з контрольною групою, що скоріше за все викликано причинами глибшими за біль після хірургічного втручання. Про це свідчить збереження нормальної рухливості контрольних тварин, яким робили симуляцію операції. Отже, можна зробити висновок що зміни морфології і цитології клітин ішемізованого м'язу слідують у хронологічному порядку за функціональними порушеннями скоротливого

апарату міоцитів. Оцінити характер змін саркомерів в ішемізованій тканині м'язів можливо за допомогою методів електронної мікроскопії. Ми виявили, що відбувається часткове руйнування індивідуальних скоротливих елементів, а саме Z-лінії, які є строго паралельними в нормі, втрачають свою взаємну орієнтованість, у них з'являються численні розриви і зміщення, що порушує механічну цілісність скоротливого апарату і призводить до зростання пасивної жорсткості м'язу в цілому (рис. 3.).

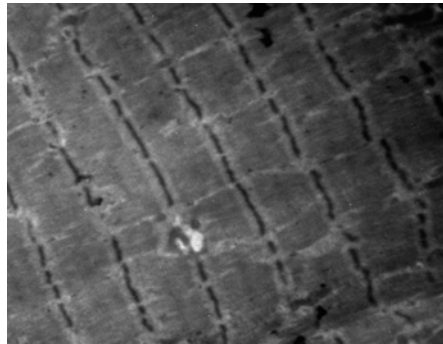
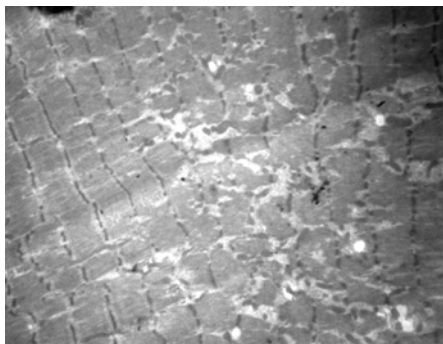


Рис.3 Саркомери м'язового волокна литкового м'язу щура, праве фото – ішемізована тканина, контроль – зліва (електронна мікроскопія, x6000)

Таким чином тривала часткова ішемія скелетних м'язів є причиною комплексу послідовних подій, які призводять до морфологічних змін в міоцитах. Характер цих змін має цитологічні ознаки некрозу. Численні клінічні спостереження і експерименти в лабораторних умовах свідчать про те, що ішемія скелетних м'язів після досягнення певного (чітко не визначеного) рівня ураження тканин набуває тенденції до подальшого розвитку і самоіндукції навіть після усунення первинних причин її виникнення[7]. Показано, що ці зміни можливо зафіксувати за допомогою мікроскопічних досліджень які дозволяють кількісно і якісно оцінити перебіг процесу ішемізації скелетного м'язу. Отримані дані можуть бути корисні при феноменологічному описі характеру і направленості деградації скоротливої функції м'язу при ішемії і пошуку коректних стратегій з

розв'язання питань ефективної діагностики і лікування клінічних станів пов'язаних з ішемією.

Список використаної літератури. 1. Matsen, F.A., Compartmental syndrome: a unified concept, Clin. Orthop., 113, 8, 1975. 2. Mubarak, S. and Owen, C.A., Compartment syndrome and its relation to the Crush syndrome: a spectrum of disease, Clin. Orthop., 113, 81, 1975. 3. McQueen, M.M., The epidemiology and outcome of acute compartment syndrome, Hefte. zu. Der. Unfallchirurg, 267, 14, 1998. 4. Sheridan, G.W. and Matsen, F.A., Fasciotomy in the treatment of the acute compartment syndrome, J. Bone Jt. Surg., 58-A, 112, 1976. 5. F. A. Mann, G. M. Constantinescu Fundamentals of Small Animal Surgery, Wiley-Blackwell, 2011. 6. Jocelyn H. Bruce-Gregorios, M.D.: Histopathologic Techniques, JMC Press Inc., Quezon City, Philippines, 1974. 7. Rosfors, S. and Styf, J., Deep venous valvular function assessed with intramuscular pressure recordings, Clin. Physiol., 10, 77, 1990.

Надійшла до редколегії 22.11.12

УДК 577.112.7

О. Ратушна, асп., Д. Мінченко, канд. мед. наук,
І. Клімеш, проф., О. Мінченко, проф.

ЕКСПРЕСІЯ PFKFB ТА ЦИРКАДІАЛЬНИХ ГЕНІВ У ПІДШКІРНІЙ ЖИРОВІЙ ТКАНИНІ ЧОЛОВІКІВ ЗА ДІАБЕТУ 2 ТИПУ

Наявні дані підтримують гіпотезу, що дисрегуляція важливих механізмів біологічного годинника, який контролює більшість метаболічних процесів, задіяна у розвитку ожиріння, метаболічного синдрому та діабету 2 типу. Проведено вивчення експресії основних молекулярних компонентів циркадіального годинника та їх зв'язок з експресією HK2 та різних PFKFB генів, що кодують основні регуляторні ензими гліколізу та проліферації, у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням та діабетом 2 типу. Встановлено, що рівень експресії генів PER2, CLOCK, CRY1 та PFKFB4 у підшкірній жировій тканині пацієнтів з ожирінням, ускладненим діабетом 2 типу, є зниженим у порівнянні з чоловіками, що мали також ожиріння без ознак діабету 2 типу, але з порушеною толерантністю до глюкози, причому показана негативна кореляція цих змін з підвищенням рівнем глюкози у крові натщесерце. В той же час, експресія генів ARNTL, PFKFB2, PFKFB3 та HK2 суттєво збільшується у діабетиків 2 типу з ожирінням і це збільшення позитивно корелює з високим рівнем глюкози у крові натщесерце. Результати даної роботи вказують на те, що дисрегуляція експресії генів HK2, PFKFB, а також циркадіальних генів у підшкірній жировій тканині асоціюється з розвитком діабету 2 типу у індивідуумів з ожирінням, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози.

Ключові слова: циркадіальні гени, жирова тканина, діабет 2-го типу.

Имеющиеся данные поддерживают гипотезу, что дисрегуляция важных механизмов биологических часов, который контролирует большинство метаболических процессов, задействована в развитии ожирения, метаболического синдрома и диабета 2 типа. Проведено изучение экспрессии основных молекулярных компонентов циркадиальных часов и их связь с экспрессией HK2 и различных PFKFB генов, кодирующих основные регуляторные ферменты гликолиза и пролиферации, в подкожной жировой ткани мужчин с ожирением и диабетом 2 типа. Установлено, что уровень экспрессии генов PER2, CLOCK, CRY1 и PFKFB4 в подкожной жировой ткани пациентов с ожирением, осложненным диабетом 2 типа, является сниженным по сравнению с мужчинами, которые имели также ожирение без признаков диабета 2 типа, но с нарушенной толерантностью к глюкозе, причем показана отрицательная корреляция этих изменений с повышенным уровнем глюкозы в крови натощак. В то же время, экспрессия генов ARNTL, PFKFB2, PFKFB3 и HK2 существенно увеличивается у диабетиков 2 типа с ожирением и это увеличение положительно коррелируется с высоким уровнем глюкозы в крови натощак. Результаты данной работы показывают, что дисрегуляция экспрессии генов HK2, PFKFB, а также циркадиальных генов в подкожной жировой ткани ассоциируется с развитием диабета 2 типа у индивидуумов с ожирением, осложненным нарушенной толерантностью к глюкозе.

Ключевые слова: циркадиальные гены, жировая ткань, диабет 2-го типа.

Accumulating evidence raises the hypothesis that dysregulation of intrinsic biological clock mechanisms which control most metabolic processes are involved in the development of obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus, the most

© Ратушна О., Мінченко Д., Клімеш І., Мінченко О., 2013

profound public health problems. We studied the expression of main molecular components of circadian clock and its connection with the expression of HK2 and different PFKFB genes, encoded the key regulatory enzymes of glycolysis and proliferation, in subcutaneous adipose tissue of obese men with type 2 diabetes. The expression levels of PER2, CLOCK, CRY1 and PFKFB4 genes in subcutaneous adipose tissue in obese type 2 diabetics versus obese individuals with impaired glucose tolerance is decreased and these changes negatively correlated with increased fasting blood glucose. At the same time, the expression of ARNTL, PFKFB2, PFKFB3 and HK2 genes significantly increased in obese type 2 diabetics and these increases positively correlates with increased fasting blood glucose. Results of this study provide strong evidence that dysregulation of HK2, PFKFB and circadian gene expressions in subcutaneous adipose tissue is associated with development type 2 diabetes in obese individuals with impaired glucose tolerance.

Keywords: circadian genes, adipose tissue, type 2 diabetes.

Вступ. Численні дані вказують на те, що біологічний годинник є інтегральним компонентом практично всіх аспектів життєдіяльності організмів і контролює різноманітні процеси, в тому числі і найважливіші метаболічні шляхи, змінюючи експресію багатьох генів [1 – 4]. Більше того, дослідження, проведені на молекулярному та клітинному рівнях, продемонстрували наявність взаємозв'язків між дисрегуляцією біологічного годинника і метаболічними порушеннями, в тому числі з розвитком ожиріння, резистентності до інсуліну та діабету 2 типу [5 – 8]. Звичайно, ожиріння та діабет 2 типу, як і багато інших захворювань, є результатом тісної взаємодії генетичних факторів і різноманітних зовнішніх чинників [3, 4, 6, 9]. В досліджах на мишах, нокаутних за різними циркадальними генами, було встановлено, що функція біологічного годинника тісно пов'язана з метаболічним гомеостазом і порушення циркадального ритму є відповідальним за розвиток метаболічних захворювань, включаючи ожиріння, резистентність до інсуліну та діабет 2 типу, але, і порушення метаболізму можуть, в свою чергу, призводити до змін у функціонуванні біологічного годинника [10]. Так, при дослідженні експресії циркадальних генів у лейкоцитах крові пацієнтів з діабетом 2 типу було виявлено порушення у їх експресії, що вказує на можливість тісної асоціації функції біологічного годинника з патофізіологією діабету 2 типу [8]. Це можна пояснити тим, що процеси транспорту глюкози, гліколіз і глюконеогенез, ліполіз і адипогенез, а також багато інших процесів контролюються сіткою транскрипційних процесів, що тісно пов'язані з факторами біологічного годинника і є залежними від добових ритмів [11]. Можна сподіватися, що пізнання механізмів взаємодії молекулярних компонентів біологічного годинника з фізіологічними та метаболічними ритмами на молекулярному, клітинному та системному рівнях допоможе зрозуміти асоціацію порушень функції біологічного годинника з такими захворюваннями як ожиріння та діабет 2 типу.

Метаболізм глюкози і гліколіз, зокрема, переважно контролюються родиною біфункціональних ензимів 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази (PFKFB) та гексокіназами (HK), що є ключовими регуляторними ензимами [12–15]. Недавно було показано, що посилена експресія PFKFB3 та HK2 у злоякісних пухлинах є складовою *de novo* синтезу нуклеїнових кислот, чим пояснюється спряженість посиленого гліколізу з проліферацією клітин [14]. Експресія генів PFKFB3 та PFKFB4 є залежною від гіпоксії і є обов'язковим фактором посиленого гліколізу та проліферації у пухлинах [15]. Недавно було також показано, що PFKFB3 функціонує в ядрах і посилює проліферацію, активуючи циклін-залежну кіназу і збільшуючи експресію цикліну D3 та інших факторів, які контролюють клітинний цикл. Більше того, було показано, що андрогени для *de novo* синтезу ліпідів стимулюють гліколіз збільшуючи активність HK2 та PFKFB2 [13]. Важливо відмітити, що характер адсорбції глюкози у кишечнику також має циркадальну ритмічність, який опосередковується переносником глюкози SGLT1 і експресія якого контролюється генами

біологічного годинника на рівнях транскрипції, трансляції та функції [16].

Відомо, що за діабету суттєво змінюється інтенсивність гліколізу в результаті порушення метаболізму глюкози, в тому числі і шляхом дерегуляції активності PFKFB ізoenзимів [15, 17]. Так, порушення експресії гена PFKFB1 у печінці за діабету приводить до гіперглікемії та резистентності до інсуліну, а надекспресія цього гена зменшує рівень глюкози у крові і відновлює чутливість до інсуліну. Більше того, встановлено, що експресія PFKFB3 у печінці мишей з експериментальним цукровим діабетом посилюється на рівні транскрипції за рахунок проліферативних сигналів [17]. Посилення експресії гена PFKFB3 також виявлено у печінці та мозку щурів з експериментальним цукровим діабетом, але при цьому відмічалось зниження рівня експресії цього гена у скелетному м'язі та серці, що переконливо свідчило про тканино-специфічний характер змін в експресії гена PFKFB3 за умов цукрового діабету [18]. Більше того, за цукрового діабету виявляються істотні зміни і в альтернативному сплайсингу мРНК PFKFB3, які також мають тканино-специфічний характер [18]. Характерною детермінантою ожиріння та діабету 2 типу, як і злоякісного росту, є стрес ендоплазматичного ретикулуму [19]. Він є центральним фактором виникнення резистентності до інсуліну, оскільки за стресу ендоплазматичного ретикулуму порушується сигналінг з рецептора інсуліну. Стрес ендоплазматичного ретикулуму є чинником, що контролює експресію великої кількості генів, в тому числі генів біологічного годинника і PFKFB і пов'язує між собою ожиріння, дію інсуліну та діабет 2 типу. Разом з тим, детальні молекулярні механізми розвитку ожиріння та діабету 2 типу не зовсім з'ясовані і заслуговують на подальше детальне вивчення.

Метою даної роботи було вивчити рівень експресії генів CLOCK, ARNTL, PER1, PER2, CRY1, PFKFB1, PFKFB2, PFKFB3, PFKFB4 та HK2 у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням, ускладненим діабетом 2 типу у порівнянні з пацієнтами, що мали ожиріння без ознак діабету 2 типу, але з порушеною толерантністю до глюкози, для виявлення тих генів, зміна експресії яких може бути пов'язана з розвитком діабету 2 типу.

Матеріали і методи досліджень. Дослідження проведені на підшкірній жировій тканині, яку було взято шляхом біопсії у чоловіків віком біля 48 років з ожирінням, ускладненим діабетом 2 типу (6 чоловік; індекс маси тіла 33 ± 2.4), а контролем до цієї групи були чоловіки аналогічного віку також з ожирінням без ознак діабету, але мали порушену толерантність до глюкози (6 осіб; індекс маси тіла 34 ± 1.4). Клінічна характеристика пацієнтів і отримання біологічного матеріалу було проведено в Інституті експериментальної ендокринології Словацької академії наук з дотриманням всіх біотичних вимог, що детально описано раніше [20]. У чоловіків з діабетом 2 типу рівень глюкози в крові натщесерце був більше 7,0 ммоль/л, а через 2 години після глюкозотолерантного тесту більше 11,1 ммоль/л, що відповідає критеріям ВООЗ (1999) до діабету 2 типу. РНК із жиро-

вої тканини виділяли за допомогою спеціального набору реагентів (RNasy Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN, Німеччина) згідно протоколу виробника. Експресію генів *CLOCK*, *ARNTL*, *PER1*, *PER2*, *CRY1*, *PFKFB1*, *PFKFB2*, *PFKFB3*, *PFKFB4* та *HK2*, а також бета-актину, як контрольного гена, досліджували методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції (у реальному часі), яку проводили на апараті "The 7900 HT Fast Real-Time PCR System" (Applied Biosystems), використовуючи для проведення реакції Absolute QPCR SYBR-Green Mix (Thermo Scientific, Великобританія) та пари праймерів, специфічних для кожного гена, отриманих із компанії Sigma-Aldrich (США). Для синтезу комплементарної ДНК (кДНК) використовували тотальну РНК із жирової тканини як матрицю та набір "QuantiTect Reverse Transcription" (QIAGEN, Німеччина), в якому передбачено етап, що забезпечує елімінацію можливих залишків геномної ДНК. Для цього 1 мкг РНК спочатку короткочасно (протягом 2 хвилин) інкубували з буфером gDNA Wipeout, а потім з Quantiscript зворотною транскриптазою в присутності суміші праймерів (Primers mix) та буферу, що уже містив інгібітор рибонуклеаз і набір чотирьох дезоксирибонуклеотидів, при 42°C протягом 15 хвилин. Реакцію зупиняли прогріванням реакційної суміші при 95°C протягом 3 хвилин, проби швидко охолоджували і отриману таким чином кДНК використовували для дослідження експресії генів. Для вивчення рівня експресії гена *CLOCK* (circadian locomotor output circuits kaput) були використані такі праймери: прямий 5'-AGGTTTGATCACAGCCCAAC -3' і зворотний 5'-TATCATGCGTGTCCGTTGTT -3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 1605 – 1624 та 1949 – 1930 кДНК *CLOCK* людини (GenBank номер NM_004898); розмір ампліфікованого фрагмента 345 пар нуклеотидних залишків (п.н.з.). Для гена *ARNTL1* (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like, BMAL1) кДНК – 5'-AGTAGGTCAGGGACGGAGGT -3' прямий і 5'-CACACAGGAAGCCCTCTAGC -3' зворотний, які відповідали нуклеотидним послідовностям 41 – 60 та 262 – 243 кДНК *ARNTL1* людини (GenBank номер NM_001178); розмір ампліфікованого фрагмента 222 п.н.з. Для ампліфікації *PER1* (period 1) кДНК ми використали прямий 5'-CACCTGTATGACCCACTCTT -3' та зворотний 5'-GGTAAGGCTGGACTGGATGA -3' праймери з послідовністю 3878 – 3897 та 4086 – 4067 в кДНК *PER1* людини (GenBank номер NM_002616, а довжина фрагмента ампліфікації – 209 п.н.з.). Ампліфікацію кДНК *PER2* (period 2) cDNA проводили з праймерами 5'-CGTGCCAAGCAGTTGACTTA -3' – прямий та 5'-CAGCAAGGCTCAACAAATCA -3' – зворотний, що відповідали нуклеотидним послідовностям 6000 – 6019 та 6207 – 6188 кДНК *PER2* людини (GenBank номер NM_022817; довжина фрагмента – 208 п.н.з.). Для дослідження експресії гена *CRY1* (cryptochrome 1, photolyase-like) були використані такі праймери: прямий – 5'-TTGCTTGATGCAGATTGGAG -3' і зворотний – 5'-TTTTGCAGGGAAGCCCTCTTA -3', послідовність яких відповідала нуклеотидним залишкам 2012 – 2031 та 2185 – 2166 в кДНК *CRY1* людини (GenBank номер NM_004075; довжина фрагмента ампліфікації – 174 п.н.з.). Для дослідження експресії генів *PFKFB* та *HK2* були використані такі пари праймерів: для *PFKFB1* (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-1) –

5'- GTTTACCAGCTCGAGGCAAG -3' і 5'-AAAACCGCAACATGACCTTC -3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 217 – 236 та 460 – 441 кДНК *PFKFB1* людини (GenBank номер NM_002625); для *PFKFB2* – 5'-GACATCTGAAGAGCTGCCATG -3' і 5'-CCAATCCAGTTGAGGTAGCG -3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 92-112 and 306-287 кДНК *PFKFB2* людини (GenBank номер NM_006212); для *PFKFB3* – 5'-CTTGTCGCTGATCAAGGTGA -3' і 5'-TTCTGCTCCTCCACGAACCTT -3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 1011-1030 and 1253-1234 кДНК *PFKFB3* людини (GenBank номер NM_004566); для *PFKFB4* – 5'-GGAGTTCAATGTTGGCCAGT -3' і 5'-TCAGGATCCACACAGATGGA -3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 230 – 249 and 505 – 486 кДНК *PFKFB4* людини (GenBank номер NM_004567), і для *HK2* (hexokinase 2): 5'-TCTATGCCATCCCTGAGGAC -3' і 5'-TCTCTGCCTTCCACTCCACT -3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 2258 – 2267 та 2477 – 2458 кДНК *HK2* людини (GenBank номер NM_000189). Розміри ампліфікованих фрагментів в парах нуклеотидних залишків: *PFKFB1* – 244, *PFKFB2* – 215, *PFKFB3* – 243, *PFKFB4* – 276 та *HK2* – 220. Відносну кількість транскриптів досліджених генів нормалізували по рівню експресії бета-актину (*ACTB*), для ампліфікації якого використовували наступні праймери: прямий – 5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG -3' та зворотний – 5'-AGCACTGTGTGGCGTACAG -3', що починаються із 747-го (5'-позиція) та 980-го (3'-позиція) нуклеотидних залишків, відповідно; GenBank номер NM_001101; довжина фрагмента ампліфікації – 234 п.н.з.). Аналіз результатів виконували з допомогою спеціальної комп'ютерної програми "Differential expression calculator" а статистичний і кореляційний аналізи – в Excel програмі. Значення експресії генів *CLOCK*, *ARNTL*, *PER1*, *PER2*, *CRY1*, *PFKFB1*, *PFKFB2*, *PFKFB3*, *PFKFB4* та *HK2* нормалізували по рівню експресії бета-актину і представляли у відсотках від контролю (100 %).

Результати дослідження та їх обговорення. Як видно із даних, приведених на рис. 1, рівень експресії генів *PER2*, *CRY1* та *CLOCK* у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням, ускладненим діабетом 2 типу, суттєво знижується за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції порівняно з жировою тканиною від пацієнтів з ожирінням, що не мали ознак діабету, а мали лише порушену толерантність до глюкози, (контрольна група). В той же час, рівень експресії гена *ARNTL* збільшується, а гена *PER1* істотно не змінюється у діабетиків 2 типу з ожирінням, що свідчить про наявність різно-направлених змін в експресії окремих генів біологічного годинника, що відповідають за синтез його основних молекулярних компонентів, про дисрегуляцію експресії цих генів за умов діабету 2 типу. Ці результати узгоджуються з даними літератури про зміни в експресії циркадальних генів у клітинах крові за умов діабету 2 типу, про важливу роль циркадальних факторів у регуляції різноманітних метаболічних процесів в організмі, зокрема з даними по виключенню гена *CLOCK*: в організмі мишей [8 – 10]. Так, у нокаутних за геном *CLOCK* мишей (*CLOCK*^{-/-}) розвивається ожиріння і метаболічний синдром, який асоціюється з гіперглікемією [10].

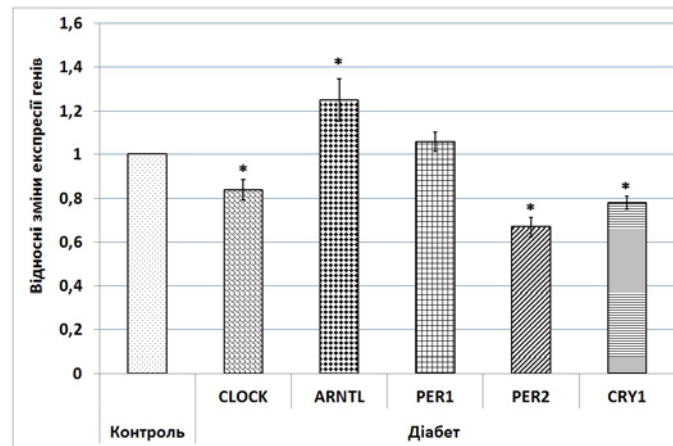


Рис. 1. Відносний рівень експресії генів *CLOCK*, *ARNTL*, *PER1*, *PER2* та *CRY1* у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням, ускладненим діабетом 2 типу, який визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції (у реальному часі). Контролем слугувала група чоловіків з ожирінням, які не мали ознак діабету, а лише порушену толерантність до глюкози. Величину експресії генів *CLOCK*, *ARNTL*, *PER1*, *PER2* та *CRY1* нормалізували по експресії бета-актину, причому рівень експресії всіх досліджених генів у контролі був прийнятим за 1; $n = 6$; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем

Наведені на рис. 1 дані також вказують на можливість кореляції цих змін в експресії циркадальних генів з розвитком діабету 2 типу. Проведений нами корелятивний аналіз між змінами в експресії досліджуваних генів і рівнем глюкози у крові чоловіків з діабетом 2 типу показав наявність негативної кореляції між високим

рівнем глюкози у крові натщесерце та зниженим рівнем експресії генів *PER2* ($r = -0,78$), *CLOCK* ($r = -0,69$) і *CRY1* ($r = -0,61$) за умов діабету 2 типу, а також позитивної кореляції з підвищеним рівнем експресії гена *ARNTL* ($r = 0,76$), що частково відображено на рис. 2.

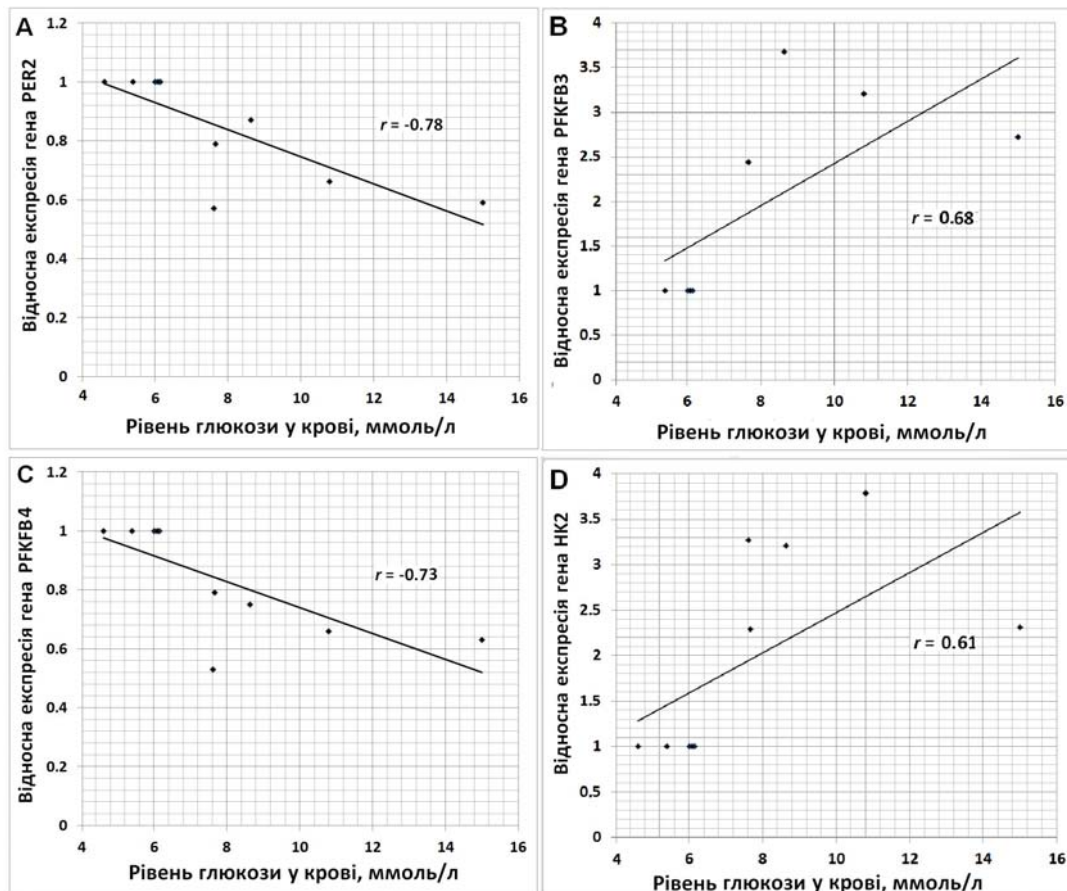


Рис. 2. Кореляція змін у рівні експресії генів *PER2*, *PFKFB3*, *PFKFB4* та *HK2* у підшкірній жировій тканині з рівнем глюкози у крові натщесерце у чоловіків з ожирінням, ускладненим діабетом 2 типу. Контролем слугувала група чоловіків з ожирінням, які не мали ознак діабету, а лише порушену толерантність до глюкози

Метаболізм глюкози і гліколіз, зокрема, контролюються значною мірою родиною біфункціональних ензимів 6-фосфоглюкозо-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази (PFKFB), а також гексокіназою (HK), ключовими регуляторними ензимами [12 – 15]. Дослідження експресії різних генів *PFKFB* показало, що у підшкірній жировій тка-

нині чоловіків з ожирінням, ускладненим діабетом 2 типу, у порівнянні з пацієнтами, що мали також ожиріння, але без ознак діабету 2 типу, спостерігається значне посилення експресії гена *PFKFB3* і менш виражене – *PFKFB2* (рис. 3).

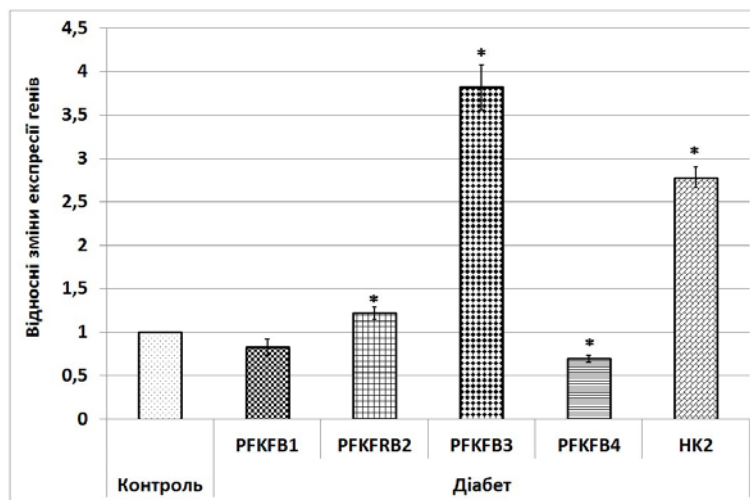


Рис. 3. Відносний рівень експресії генів *PFKFB1*, *PFKFB2*, *PFKFB3*, *PFKFB4* та *HK2* у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням, ускладненим діабетом 2 типу, який визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції. Контролем слугувала група чоловіків з ожирінням, які не мали ознак діабету, а лише порушену толерантність до глюкози. Величину експресії генів *PFKFB1*, *PFKFB2*, *PFKFB3*, *PFKFB4* та *HK2* нормалізували по експресії бета-актину, причому рівень експресії всіх досліджених генів у контролі був прийнятим за 1; $n = 6$; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем

В той же час, рівень експресії гена *PFKFB4* – знижується, а *PFKFB1* – істотно не змінюється. Різноманітність змін в експресії різних *PFKFB* чи їх відсутність може бути обумовлена дещо різними функціональними властивостями *PFKFB1*, *PFKFB2*, *PFKFB3* та *PFKFB4*, а також відмінностями їх регуляторних ділянок [15]. Разом з тим треба відмітити, що за цукрового діабету були виявлені виражені зміни в спектрі альтернативних сплайс-варіантів мРНК *PFKFB3*, що мають різну функціональну значимість [15, 18]. У зв'язку з цим, на даний момент ще важко оцінити функціональне значення змін в експресії *PFKFB3*, виявлених нами у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням, ускладненим діабетом 2 типу, оскільки альтернативний сплайсинг мРНК *PFKFB3* за цих умов ще не досліджувався.

Нами проведено також дослідження експресії гена *HK2*, що є залежним від інсуліну і задіяний у регуляції гліколізу, процесів проліферації та апоптозу клітин [14]. Як видно із даних, представлених на рис. 3, рівень експресії гена *HK2* у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням, ускладненим діабетом 2 типу, порівняно з жировою тканиною пацієнтів контрольної групи, що мали ожиріння без наявності ознак діабету, але з порушеною толерантністю до глюкози збільшується майже в 3 рази. Посилення експресії гена *HK2* супроводжується значним збільшенням рівня експресії гена *PFKFB3*, що узгоджується з даними літератури про можливість взаємодії цих протеїнів у процесах метаболізму глюкози, зокрема гліколізу [15]. Більше того, посилення експресії гена *PFKFB3*, виявлене нами у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням, ускладненим діабетом 2 типу, в деякій мірі узгоджується з даними літератури [17, 18] про підвищений рівень експресії цього гена у інших органах (печінці мозку за умов експериментального цукрового діабету 1 типу, а не діабету 2 типу).

Була також виявлена наявність позитивної кореляції між підвищеним рівнем експресії генів *PFKFB3* і *HK2* у підшкірній жировій тканині та високим рівнем глюкози у

крові натщесерце у чоловіків з ожирінням за умов діабету 2 типу: для гена *PFKFB3* $r = 0,68$, а для гена *HK2* $r = 0,61$ (рис. 2). Разом з тим, показана наявність негативної кореляції між високим рівнем глюкози у крові натщесерце у чоловіків з ожирінням за умов діабету 2 типу та рівнем експресії гена *PFKFB4* у підшкірній жировій тканині у цих пацієнтів. Більше того, виявлена негативна кореляція між зниженням рівня експресії генів *PER2* і *CRY1* за умов діабету 2 типу та різким збільшенням експресії гена *PFKFB3* ($r = -0,76$ для гена *PER2* і $-0,92$ для гена *CRY1*), а також гена *HK2* ($r = -0,82$ для гена *PER2* і $-0,83$ для гена *CRY1*).

Таким чином, результати даної роботи вказують на те, що дисрегуляція експресії циркадальних генів у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням, ускладненим діабетом 2 типу, супроводжується дисрегуляцією генів *HK2*, *PFKFB3* та *PFKFB4* і асоціюється з розвитком діабету 2 типу на фоні ожиріння та порушеної толерантності до глюкози. Ензими, що кодується геном *HK2* та різними генами *PFKFB*, є надзвичайно важливими регуляторами як метаболізму глюкози, так і ряду інших процесів, зокрема процесів проліферації і життєздатності клітин [8, 17]. Посилена експресія генів *HK2* та *PFKFB3* у підшкірній жировій тканині за умов діабету 2 типу на фоні ожиріння може бути обумовлена резистентністю до інсуліну і високим рівнем глюкози в крові, необхідністю протидіяти цим порушенням. Разом з тим, детальні молекулярні механізми розвитку ожиріння та діабету 2 типу заслуговують на подальше всебічне вивчення.

Висновки:

1. Встановлено, що за умов діабету 2 типу у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням порушується експресія генів біологічного годинника: знижується рівень експресії генів *PER2*, *CLOCK* та *CRY1*, істотно не змінюється експресія гена *PER1* і підвищується рівень експресії гена *ARNTL*.

2. Показано, що рівень експресії генів, що контролюють процеси гліколізу та проліферації, істотно пору-

шується у підшкірній жировій тканині діабетиків 2 типу з ожирінням: *PFKFB2*, *PFKFB3* та *HK2* суттєво збільшується, а *PFKFB4* – знижується, при відсутності істотних змін в експресії гена *PFKFB1*.

3. Виявлена позитивна кореляція посиленої експресії генів *ARNTL*, *PFKFB2*, *PFKFB3* та *HK2* у підшкірній жировій тканині у пацієнтів з ожирінням, ускладненим діабетом 2 типу, з високим рівнем глюкози у крові натщесерце. В той же час, показана негативна кореляція між змінами рівня експресії генів *PER2*, *CLOCK*, *CRY1* та *PFKFB4* у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням за умов діабету 2 типу з гіперглікемією натщесерце.

4. Отримані результати вказують на те, що дисрегуляція експресії циркадальних генів, а також генів *HK2* та *PFKFB* у підшкірній жировій тканині асоціюється з розвитком діабету 2 типу у чоловіків з ожирінням, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози.

Список використаної літератури. 1. Bray M.S., Young M.E. // *Obes. Rev.* – 2009. – 10, Suppl. 2. – P. 6 – 13. 2. Bray M.S., Young M.E. // *J. Biol. Chem.* – 2011. – 286, 14. – P. 11883 – 11889. 3. Turek F.W., Joshu C.,

Kohsaka A. et al. // *Science*. – 2005. – 308, – P. 1043 – 1045. 4. Kovac J., Husse J., Oster H. // *Mol. Cells*. – 2009. – 282. – P. 75 – 80. 5. Green C.B., Takahashi J.S., Bass J. // *Cell*. – 2008. – 134. – P. 728–742. 6. Ramsey KM, Marcheva B, Kohsaka A, Bass J. // *Annu. Rev. Nutr.* – 2007. – 27. – P. 219 – 240. 7. Ando H., Kumazaki M., Motosugi Y. et al. // *Endocrinology*. – 2011. – 152. – P. 1347 – 1354. 8. Ando H., Takamura T., Matsuzawa-Nagata N. et al. // *Diabetologia*. – 2009. – 52. – P. 329 – 335. 9. Shimba S., Ogawa T., Hitosugi S. et al. // *PLoS One*. – 2011. – 6. – P. e25231. 10. Duong H.A., Robles M.S., Knutti D., Weitz C.J. // *Science*. – 2011. – 332. – P. 1436 – 1439. 11. Huang W., Ramsey KM, Marcheva B, Bass J. // *J. Clin. Invest.* – 2011. – 121. – P. 2133 – 2141. 12. Atsumi T., Nishio T., Niwa H. et al. // *Diabetes*. – 2005. – 54. – P. 3349–3357. 13. Moon J.S., Jin W.J., Kwak J.H. et al. // *Biochem J.* – 2011. – 433. – P. 225–233. 14. Wolf A., Agnihotri S., Micallef J. et al. // *J. Exp. Medicine*. – 2011. – 208. – P. 313 – 326. 15. Мінченко Д.О., Бобарикіна А.Ю., Кундієва А.В. та співавт. // *Біологічні студії/Studia Biologica*. – 2009. – 3, №3. – С. 123 – 140. 16. Balakrishnan A., Stearns A.T., Ashley S.W. et al. // *Dig. Dis. Sci.* – 2012. – 57. – P. 1525 – 1536. 17. Duran J., Obach M., Navarro-Sabate A. et al. // *FEBS J.* – 2009. – 276. P. 4555–4568. 18. Mykhailchenko V.G., Tsuchihara K., Minchenko D.O. et al. // *Biopolymers & Cell*. – 2009. – 24. – P. 260–266. 19. Lombardi A., Ulianich L., Treglia A.S. et al. // *Diabetologia*. – 2012. – 55. – P. 141–153. 20. Ratushna O.O., Minchenko D.O., Danilovskiy S.V. et al. // *Studia Biologica*. – 2012. – 6, N 2. – P. 17 – 32.

Надійшла до редколегії 03.12.12

УДК 637.354:637.18

К. Пашук, асп., Г. Насирова, канд. біол. наук,
Ф. Федін, канд. техн. наук

ФЕРМЕНТУВАННЯ СИРНИХ ПРОДУКТІВ З КОМБІНОВАНОЮ ЖИРОВОЮ ФАЗОЮ

Досліджували вплив заміників молочного жиру – "Делікон", "Сонола", "Біфілінг 54" та "Феттимілк-сир", на ферментування сирних продуктів. Замінники вводили у кількості 30% від жирової фази. Показано їх вплив на початкові стадії вироблення продуктів та на подальше ферментування сирного тіста. Сирні продукти з замінниками мали підвищену вологість та кислотність. Більш низький вміст розчинних азотомісних сполук у дослідних варіантах свідчить про меншу інтенсивність ферментативних процесів.

Ключові слова: замінники молочного жиру, сирні продукти, ферментація

Исследовали влияние заменителей молочного жира – "Деликон", "Сонола", "БИФИЛИНГ 54" и "Феттимилк-сыр", на ферментацию сырных продуктов. Заменители вводили в количестве 30% от жировой фазы. Показано их влияние на начальные стадии выработки продуктов и на дальнейшее ферментирование сырного теста. Сырные продукты с заменителями имели повышенную влажность и кислотность. Более низкое содержание растворимых азотсодержащих соединений в опытных вариантах свидетельствовало о меньшей интенсивности ферментативных процессов.

Ключевые слова: заменители молочного жира, сырные продукты, ферментация

The influence of milk fat replacements – "Delicon", "Sonola", "Bifiling 54" and "Fettimilk-cheese" on the process of fermentation was investigated. Replacements were added in the quantity of 30% from the fat phase. Effect on initial stage of manufacturing of products and on the following fermentation of the cheese curd showed. Cheese products with replacements had higher moisture and acidity. More lower content of dissolve nitrogen-containing compounds in researched variants tells about less intensity of fermentation process.

Keywords: milk fat replacements, cheese products, fermentation.

Вступ. Для отримання сирних продуктів з максимально наближеними до натуральних сирів властивостями у виробництві застосовують замінники молочного жиру (ЗМЖ), вироблені з рослинних олій, більш вигідними економічно і здатними гарантувати харчову цінність готової продукції в умовах дефіциту молочної сировини [1]. Як відомо, первинну структуру сиру складає неперервний білковий каркас, утворений міцелами казеїну. У лагунах казеїнового каркасу містяться жирова і водна фази, які значним чином впливають на структурно-механічні властивості та консистенцію продукту. Показано, що підвищений вміст жиру або вологи послаблює білковий каркас сиру, продукт набуває м'якішої, мажучої консистенції. Навпаки, сири з низьким вмістом жиру або вологи мають щільну, тверду консистенцію [2]. Швидкість протікання початкових стадій утворення структури та подальші етапи визрівання сирного продукту більшою мірою залежать від консистенції, в'язкості та пластичності жирової фази вихідної сировини [3]. Введення немолочних жирів, у яких співвідношення між вмістом насичених та ненасичених тригліцеридів відмінне від молочного жиру, може істотно впливати на консистенцію сирного продукту. Окрім того, емульгування та гомогенізація, необхідні для вироблення комбінованого продукту, призводять до підвищеної дисперсності жирових та білкових компонентів вихідної сировини. Згусток з гомогенізованого молока має більш

слабку структуру та меншу щільність, а відділення сироватки відбувається повільніше [4].

Метою роботи було дослідження особливостей вироблення та ферментування лактобактеріями модельних сирних продуктів з 30% заміною молочного жиру на ЗМЖ.

Матеріали і методи. У роботі досліджували вплив ЗМЖ "Делікон" марки ЗЛТ № 1 (вир. ЗАТ "Завод модифікованих жирів", м. Кіровоград), ЗМЖ "Сонола" марки ЗЛТ-ТС № 3 (вир. ЗАТ "Завод модифікованих жирів", м. Кіровоград), ЗМЖ "Біфілінг 54" (вир. ВАТ "БМБ Маргарин", м. Черкаси) та ЗМЖ "Феттимілк-Сир 01 АК" (вир. ЗАТ "Запорізький оліяжиркомбінат", м. Запоріжжя), що досить широко використовують для промислового виробництва сирних продуктів. Коров'яче незбиране молоко пастеризували 10хв за температури (75±3) °С. Частину молока сепарували для видалення вершків. Вершки та ЗМЖ використовували для нормалізації за жиром (до 3%) вихідної молочної суміші, при цьому ЗМЖ додавали у кількості 30% від загального вмісту жиру у молочці. Одержану молочну суміш піддавали гомогенізації під тиском (12,5 ± 2,5) МПа за температури (60±3) °С. Після охолодження з комбінованої молочної суміші виробляли модельні сирні продукти за технологією твердого сиру з низькою температурою другого нагрівання "Костромський". Контрольним варіантом були сири, вироблені з незбираного коров'ячого молока. Визрівання сирних продуктів та контрольних

сирів відбувалось протягом 45 діб за температури 10-12°C. Заквашувальний бактеріальний концентрат БК-Углич-№ 4 (вир. ОНО "Експериментальна біофабрика", Углич) містив культури лактобактерій видів *Lactococcus lactis ssp. lactis*, *Lactococcus lactis ssp. cremoris*, що забезпечували необхідний рівень кислотоутворення, а також ароматоутворювальні види *L. lactis ssp. lactis* bv. *diacetilactis* та *Leuconostoc mesenteroides*. Визначення основних фізико-хімічних та біохімічних параметрів сирного тіста проводили за загальноприйнятими методиками [5]. Повторність дослідів триразова. Достовірність результатів визначали за рівнем значимості $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Вироблення костромського сиру має ряд особливостей технологічного процесу, однією з яких є дещо знижена температура другого нагрівання (до 37°C), що дозволяє інтенсифікувати розвиток заквашувальної мезофільної молочнокислої мікрофлори. У молочному жирі за температур 34-38°C вміст тригліцеридів у твердому стані практично відсутній. Однак, нами було показано, що у комбінова-

ній жировій фазі з 30% ЗМЖ за таких температур вміст твердих тригліцеридів становив від 1% до 4-6% (для ЗМЖ "Делікон" та "Сонола") [6]. За температури 18-20°C, при якій відбуваються формування та пресування сиру, починається кристалізація тригліцеридів жирової фази коров'ячого молока, її вміст складав близько 20,0%. У варіантах з усіма дослідженими заміниками вміст тригліцеридів у твердому кристалічному стані при цьому був вищим і сягав майже чверті у комбінованій жировій фазі із ЗМЖ "Делікон" та "Сонола". Подальше зниження температури за умов визрівання сирів призводить до встановлення певної стійкої рівноваги між твердою та рідкою фазами у комбінованому жирі протягом тривалого часу, що має значення для протікання всіх біохімічних процесів у сирному тісті і відбивається на якості готового продукту. Протікання початкових стадій вироблення сирних продуктів з комбінованої сировини відрізнялось від вироблення класичного костромського сиру з коров'ячого молока. Основні технологічні параметри цього процесу наведено у табл. 1.

Таблиця 1. Технологічні показники початкових стадій при виробленні сирних продуктів

Показник	Контроль	ЗМЖ "Делікон"	ЗМЖ "Сонола"	ЗМЖ "Біфілінг 54"	ЗМЖ "Феттимілк-сир"
Час утворення згустку, хв.	25 ± 2	40 ± 2*	45 ± 2*	37 ± 2*	40 ± 2*
Розміри сирного зерна, мм	56 ± 3	48 ± 2*	33 ± 2*	53 ± 3	51 ± 2

Примітка: * – різниця з контролем достовірна при $P \leq 0,05$

Зсідання молочної сировини та утворення згустку у дослідних варіантах із ЗМЖ відбувалось повільніше майже у 1,5 рази, а для варіанту із ЗМЖ "Сонола" – у 1,8 рази, ніж у контролі. Сирне зерно у дослідних варіантах було дрібнішим та більш м'яким, особливо, у варіанті із ЗМЖ "Сонола". Відхід у підсирну сироватку сухих речовин у

дослідних варіантах був менший, ніж у контролі на 0,2-0,4%, але білкових речовин у підсирній сироватці варіантів із ЗМЖ "Делікон" та "Сонола" було менше майже у 2 рази (табл. 2). Це можна пояснити впливом різних фізико-хімічних властивостей ЗМЖ та гомогенізацією молочної сировини перед виробленням дослідних сирів.

Таблиця 2. Вміст сухих речовин та білка у підсирній сироватці

Показник	Контроль	ЗМЖ "Делікон"	ЗМЖ "Сонола"	ЗМЖ "Біфілінг 54"	ЗМЖ "Феттимілк-сир"
Вміст сухих речовин у підсирній сироватці, %	6,86 ± 0,13	6,42 ± 0,08	6,55 ± 0,10	6,45 ± 0,12	6,70 ± 0,10
Вміст загального білка у підсирній сироватці, %	0,89 ± 0,02	0,37 ± 0,01*	0,55 ± 0,01*	0,88 ± 0,02	0,85 ± 0,01

Примітка: * – різниця з контролем достовірна при $P \leq 0,05$

Титрована кислотність сироватки на всіх стадіях виготовлення сирів: утворення згустку, становлення сирного зерна та перед формуванням сирного тіста, – була вищою на 1-2°T від контрольного варіанту. Після вида-

лення сироватки сирне зерно формують та піддають пресуванню. Сирні продукти та контрольний сир після пресування було проаналізовано за основними фізико-хімічними показниками (табл. 3).

Таблиця 3. Фізико-хімічні показники сирних продуктів після пресування

Показник	Контроль	Сирні продукти із:			
		ЗМЖ "Делікон"	ЗМЖ "Сонола"	ЗМЖ "Біфілінг 54"	ЗМЖ "Фетти-мілк-сир"
Активна кислотність, pH	5,41 ± 0,01	5,16 ± 0,04*	5,26 ± 0,01	5,17 ± 0,01*	5,26 ± 0,02
Масова частка сухих речовин, %	55,61 ± 0,12	51,85 ± 0,67	44,91 ± 1,06*	53,99 ± 0,75	54,87 ± 0,17
Масова частка жиру, %	28,05 ± 0,05	24,90 ± 0,03*	22,7 ± 0,03*	27,03 ± 0,04	27,88 ± 0,05
Масова частка загально-го білка, %	23,28 ± 0,11	22,67 ± 0,10	17,93 ± 0,07*	22,68 ± 0,07	22,71 ± 0,08
Масова частка загально-го розчинного азоту, мг%	203,00 ± 0,30	196,10 ± 0,14	196,27 ± 0,21	168,40 ± 0,37*	210,08 ± 0,28
Відносний вміст розчин-ного азоту, відн. %	5,56 ± 0,18	5,52 ± 0,09	6,98 ± 0,15*	4,72 ± 0,07*	5,90 ± 0,13

Примітка: * – різниця з контролем достовірна при $P \leq 0,05$

За основними показниками сирні продукти після пресування, вироблені із ЗМЖ, мали нижчі, ніж у контролі, показники активної кислотності. Для них були характерними більш низькі показники масової частки сухих речовин: із ЗМЖ "Феттимілк-сир" – на 1,3%, із ЗМЖ "Біфілінг 54" – на 2,9%, із ЗМЖ "Делікон" – на 6,8%, а із ЗМЖ "Сонола" – на 19,2%. Порівняно із контрольними сирами у дослідних варіантах також були більш низь-

кими масові частки жиру та загального білка, що, за літературними даними, є характерним для сирів із ЗМЖ [4]. У разі перерахування на сухі речовини, вміст загального розчинного азоту, що є показником протеолітичної активності лактобактерій при виробленні сиру, був вищим порівняно з контролем у варіанті із ЗМЖ "Феттимілк-сир" на 4,9%, із ЗМЖ "Делікон" – на 3,6%, а із ЗМЖ "Сонола" – на 19,5%, тоді як із ЗМЖ "Біфілінг 54"

він був нижчим на 14,8%. Треба відмітити, що у сирних продуктах відносний вміст розчинного азоту до загального був більш високий у варіанті з ЗМЖ "Сонола", що узгоджується з більш високою чисельністю лактобактерій у цьому варіанті на етапі після пресування.

Визрівання сирних продуктів тривало 45 діб, після чого їх було проаналізовано за всіма основними показниками (табл. 4).

Таблиця 4. Фізико-хімічні показники зрілих сирних продуктів

Показник	Контроль	Сирні продукти із:			
		ЗМЖ "Делікон"	ЗМЖ "Сонола"	ЗМЖ "Біфілінг 54"	ЗМЖ "Феттимілк-сир"
Активна кислотність, pH	5,28 ± 0,01	5,10 ± 0,04*	5,03 ± 0,01*	5,18 ± 0,02	5,17 ± 0,01
Масова частка сухих речовин, %	61,79 ± 0,62	58,19 ± 0,75	52,17 ± 0,17*	58,10 ± 0,34	60,14 ± 0,25
Масова частка жиру, %	30,03 ± 0,08	28,15 ± 0,05	24,88 ± 0,06*	26,6 ± 0,06	29,6 ± 0,07
Масова частка загального білка, %	26,48 ± 0,13	24,17 ± 0,11	20,83 ± 0,09*	26,01 ± 0,10	24,38 ± 0,07
Масова частка загального розчинного азоту, мг%	630,09 ± 1,04	503,97 ± 0,87	476,33 ± 0,62*	461,62 ± 1,14*	476,25 ± 1,26*
Відносний вміст розчинного азоту, відн. %	15,18 ± 0,83	16,63 ± 0,97	15,47 ± 0,65	11,33 ± 0,44*	12,45 ± 0,38*

Примітка: * – різниця з контролем достовірна при $P \leq 0,05$

Дослідні варіанти зрілих сирних продуктів порівняно з контролем мали більш низькі показники активної кислотності, особливо із ЗМЖ "Сонола". Масова частка сухих речовин в них була нижчою, ніж контрольних: із ЗМЖ "Сонола" – на 15,6%, із ЗМЖ "Делікон" – на 5,8%, із ЗМЖ "Біфілінг 54" – на 6,0% та із ЗМЖ "Феттимілк-сир" – на 2,7%. Відповідно, вміст жиру та загального білка були зниженими порівняно із контрольними варіантами. Однак, при перерахуванні масової частки жиру та білка на 100г сухих речовин, значення цих показників ставали майже однаковими для всіх варіантів. З огляду на це можна зробити висновок, що додавання ЗМЖ та етап гомогенізації вихідної сировини більш за все впливали на вологостримуючу здатність сирного тіста.

У разі перерахування на сухі речовини, накопичення розчинних азотовмісних сполук відбувалось більш активно у контрольному варіанті, хоча відносний вміст розчинного азоту до загального був більш високий у варіанті з ЗМЖ "Сонола". Це може пояснюватись більш високим ступенем лізису бактеріальних клітин у цьому варіанті, і, завдяки вивільненню ендогенних ферментів, більш високим ступенем протеолізу.

Висновки. Введення ЗМЖ, що мають відмінні від молочного жиру фізико-хімічні властивості, до жирової фази вихідної сировини негативно вплинуло на перебіг первинних етапів вироблення сирних продуктів. Сирні продукти мали підвищену вологість та кислотність. Більш низький вміст розчинних азотовмісних сполук у дослідних варіантах свідчив про меншу інтенсивність ферментативних процесів, тільки варіант із ЗМЖ "Сонола" відрізнявся більшою інтенсивністю протеолітичних процесів.

Список використаної літератури. 1. Белокоп Е. Перспективы использования заменителей молочного жира в производстве пищевых продуктов // Молочная промышленность – 2005 – № 8 (23), – с. 14-15. 2. Lawrence R.C., Gilles J., Creamer L.K. The relationship between cheese texture and flavour // New Zealand J. Dairy Science and Technology. – 1983. – v.18. – P. 175-190. 3. Лепилкина О.В. Реологические свойства жиров и их влияние на технологию сыра // Сыроделие и маслоделие. – 2008. – № 5. – С. 32-33. 4. Лепилкина О.В., Губенко А.В., Шергина И.А. Особенности технологии сыров с растительными жирами // Молочное Дело. – 2007. – № 2. – С. 48-49. 5. Инихов Г.С. Методы анализа молока и молочных продуктов / Г.С. Инихов, Н.П. Брио. – М.: Пищевая пром., 1971. – С. 78-86. 6. Пашук К.В., Насирова Г.Ф. Влияние биохимических свойств растительных масел на качество сирных продуктов // Научные записки Тернопільського національного педагогічного університету ім. В. Гнатюка. Сер. Біологія. – 2012. – № 1 (50). – с. 35-41.

Надійшла до редколегії 07.12.12

УДК 612.821:612.82/83

М. Рассомагіна, студ., В. Кравченко, канд. біол. наук

ЕЛЕКТРИЧНА АКТИВНІСТЬ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ПІД ЧАС МОНОКУЛЯРНОЇ ПРЕЗЕНТАЦІЇ ВЕРБАЛЬНИХ СТИМУЛІВ В ЕМОЦІЙНОМУ СТРУП-ТЕСТІ

Досліджено особливості монокулярного сприйняття емоційних та беззмістовних вербальних стимулів. Виявлено зростанням спектральної потужності тета-діапазону в завданні з використанням емоційної лексики, за умови презентації слів у ліве око. Показано збільшення спектральної потужності бета-діапазону за умов активного правого ока в аналогічному завданні. Виявлено значно меншу мозкову активність при перегляді псевдослів по відношенню до справжніх слів при монокулярному (ліве око активне) та бінокулярному сприйнятті. Виявлено, що при правоокулярній презентації вербальних стимулів механізми селективності уваги більш ефективні.

Ключові слова: монокулярне сприйняття, бінокулярне сприйняття, вербальні стимули, тета-діапазон.

Исследованы особенности монокулярного восприятия эмоциональных и бессодержательных вербальных стимулов. Установлено, увеличение спектральной мощности тета-диапазона в задании с использованием эмоциональной лексики, при презентации слов в левый глаз. Показано увеличение спектральной мощности бета-диапазона в условиях активного правого глаза в аналогичном задании. Выявлено значительное уменьшение мозговой активности при просмотре псевдослов по отношению к настоящим словам при монокулярном (левый глаз активен) и бинокулярном восприятии. Установлено, что при правоокулярной презентации вербальных стимулов механизмы селективности внимания более эффективны.

Ключевые слова: монокулярное восприятие, бинокулярное восприятие, вербальные стимулы.

Peculiarities of monocular analyses of emotional and meaningless words was investigated. Revealed, increase of theta – and beta – activation in task which contains emotional connotation in left – and right monocular participants, respectively. It was showed low activation in task with meaningless words versus real word in conditions of monocular (left eye is active) and binocular vision. Revealed, that selectivity of attention were more efficient when verbal stimuli were presented in right eye.

Keywords: monocular analyses, binocular analyses, verbal stimuli.

Вступ. Для дослідження ролі півкуль головного мозку в обробці емоційних стимулів використовують різно-

манітні парадигми, найбільш поширеними з яких є презентація зорових стимулів в правому чи лівому полі

зору при фіксації погляду в певній точці [1]. За таких штучних умов можна спроектувати падіння променів світла від об'єкту на ліві чи праві ділянки сітківки, інформація від яких надходить до контралатеральної півкулі. В природних умовах при розгляданні певного об'єкту, на який звертається увага, зображення потрапляє на центральну ямку сітківки, де найбільша щільність колбочок. Традиційно вважають, що нервові волокна від цієї ділянки проєктуються в зорову кору обох півкуль за рахунок перекриття проєкцій від ретинальних зображень – це так звана білатеральна проєкційна теорія [2], в такому разі для читання слова, що презентується в центральну ямку, не потрібно міжпівкульного переносу. Проте дослідження останнього десятиріччя, що фокусується на особливості мозкової обробки слів, облич та інших складних об'єктів вказують на те, що питання репрезентації об'єктів, що потрапляють на центральну ямку є досі недостатньо вивченим. На основі цілого ряду робіт сформульована теорія "розщеплення центральної ямки" у двох півкулях [2]. Згідно цієї теорії, частини зображення, що потрапляють по різні боки вертикального меридіану, проведеного через центральну ямку, потрапляють у різні півкулі, а цілісне сприйняття формується на більш пізніх стадіях обробки. Незважаючи на велику кількість робіт з дослідження мозкової обробки емоційних слів, в тому числі вкладу різних півкуль [3], нами не знайдено робіт, де досліджували мозкову активність і часові параметри реакцій при монокулярному сприйнятті центральноорозташованих вербальних стимулів, без спеціальної фіксації погляду.

Метою роботи було проаналізувати, чи відрізняється мозкова обробка вербальних стимулів за умови їх монокулярного сприйняття порівняно із бінокулярним, і зокрема порівняти паттерни електричної активності мозку при перегляді слів різного змісту правим і лівим оком. Ми використовували завдання, розроблені на основі емоційного Струн-тесту, в якому обстежуваним потрібно розпізнавати колір написання слів, не читаючи їх. Даний феномен активно вивчався впродовж попереднього десятиріччя [4], і незважаючи на деякі протиріччя, отримані різними авторами, в цілому показано, що емоційні слова викликають "захоплення" уваги людини, незважаючи на свідому установку людини ігнорувати семантичне значення слів. Це виявляється в подовженні часу реагування на такі слова порівняно з нейтральними, подовженні часу реакції на нейтральні слова, що презентуються одразу після "заборонених" слів, кращому пригадуванню емоційних слів при несподіваному проханні їх відтворити, більшій кількості помилок в тестах, що містять емоційні слова тощо [5]. Описані ефекти використовують для мимовільного захоплення уваги людини у рекламних роликах, агітаційних програмах, психотерапії. Зокрема, по подовженню реакції на слова певного значення можна знаходити проблемні для даної людини теми, які вона свідомо чи несвідомо не озвучує.

Матеріали та методи дослідження. В обстеженні брали участь 40 студентів обох статей, віком 18-22 років. Згідно профілю міжпівкульної асиметрії, що визначали за методикою [6] всі обстежувані мали ведучу праву руку та праве око. З метою оцінки особливостей обробки нерелевантних вербальних стимулів правою та лівою півкулями, обстежуваних було поділено на 3 групи – в двох стимули експонувались монокулярно, і в контрольній групі – бінокулярно ($n = 10$). Група "лівооки" ($n = 15$) виконувала завдання, дивлячись лише лівим оком (праве око було закрито спеціальною пов'язкою), група "правооки" ($n = 15$) – дивилась правим оком (ліве око було закрито). Обстежувані у трьох групах виконували спочатку перший тест, що складався із суміші

емоційно забарвлених та нейтральних слів (ТЕ), другий тест був аналогічний, лише складався із "псевдослів" – набору літер, що нагадували слова, проте були позбавлені сенсу (ТПсл). Через 10 хв після закінчення виконання першого тесту обстежуваних просили відтворити по пам'яті слова, що вони бачили на екрані. В обох тестах обстежуваним слід було визначити яким кольором написано слово, не читаючи його. Відповідною реакцією мало бути натискання певних клавіш правою (якщо слово написано червоними літерами) або лівою рукою (якщо слово написано зеленими літерами). Реєстрували латентні періоди (ЛП) (середній для правої та лівої рук, окремо для різних типів стимулів – нейтральних та емоційних) та кількість помилкових реакцій в кожному тесті.

В ході експерименту відбувалась реєстрація ЕЕГ за наступною схемою: в стані спокою (закриті очі) – 5 хв., стан спокою (відкриті очі) – 2 хв., під час виконання ТЕ – 2хв., перерва між тестами (відкриті очі) – 2 хв., під час виконання ТПсл – 2хв., стан спокою (закриті очі) – 2 хв. Для роботи використовувався діагностичний комплект "Нейрон-Спектр" (ООО "Нейрософт", Росія), ЕЕГ реєстрували монополярно, як референтний використовувалася іпсилатеральний вушний електрод. Електроди розміщувались за міжнародною системою 10-20% у 16 симетричних точках поверхні голови: префронтальних (Fp1/Fp2), середньофронтальних (F3/F4), латеральнофронтальних (F7/F8), центральних (C3/C4), передніх (T3/T4) та задніх скроневих (T5/T6), тім'яних (P3/P4) та потиличних (O1/O2). Для аналізу ЕЕГ-показників використовувались лише безартефактні фрагменти запису. З допомогою програмного забезпечення "Нейрон Спектр" на основі алгоритму швидкого перетворення Фур'є обчислювали спектральну потужність (СП) для наступних частотних діапазонів: тета (4,0 – 7,9 Гц), альфа (8,0 – 12,9 Гц), бета низькочастотний (13,0 – 19,9 Гц), бета високочастотний (20,0 – 35,0 Гц). Епоха аналізу становила 2,56 сек, епоха перекриття 1,28 сек, смуга пропускання від 1 до 35 Гц. Статистичний аналіз даних проводився за допомогою пакету STATISTICA 7.0 (Statsoft, USA, 2004). Оскільки розподіли більшості показників, отриманих в цих дослідженнях, був відмінним від нормального (за критерієм Лілліфора), при порівнянні залежних вибірок застосовували непараметричний Т-критерій знакових рангів Вілкоксона. Критичний рівень значущості міжгрупових відмінностей при перевірці статистичної гіпотези приймався рівним $p=0,05$. Для опису вибіркового розподілу вказували медіани та міжквартильний розкид (Ме [25%; 75%]).

Результати дослідження та їх обговорення. Перш за все розглянемо часові параметри сенсомоторних реакцій при виконанні двох послідовних завдань у різних групах. Як ми і передбачали, в усіх групах ЛП реакції на псевдослова були коротші за ЛП реакції на "справжні" слова першого тесту. Це може бути ознакою автоматичного аналізу семантичного значення слова, на який витрачається додатково близько 60 мс, а в "лівоокий" групі до 100 мс. Також міг мати місце ефект тренування, що впливало на зменшення часу реакції обстежуваних в другому тесті. Несподіване прохання пригадати слова, що були використані у першому завданні, виявило вірогідно краще відтворення емоційних слів порівняно з нейтральними у всіх трьох групах, що вказує на преференцію мозкових ресурсів в обробці емоційної лексики порівняно з нейтральною (табл. 1). При цьому відмінностей в кількості пригаданих слів між різними групами не спостерігалось. Порівняння патернів мозкової електричної активності під час виконання першого і другого завдання виявило досить істотні відмінності між обстежуваними 3-х груп (див рис. 2А). Зва-

жаючи на те, що в усіх групах час реакції на псевдослова був меншим, ніж на слова, очікуваним було зменшення мозкової активації під час виконання тесту з псевдословами. Дійсно, в контрольній групі ми бачимо зменшення СП тета-ритму в лівих центральні-тім'яних зонах, ймовірно у зв'язку з відсутністю емоційних слів в завданні. При цьому зростає СП тета-ритму в правій префронтальній ділянці, що тут може відображувати використання оперативної пам'яті при виконанні даного завдання, так як вже сформована найбільш ефективна стратегія. За даними електрофізіологічних досліджень

[7,8], специфічна мозкова відповідь на емоційні слова в лівій півкулі реєструється вже через 100 мс після пред'явлення, що є корелятом автоматичного захоплення уваги, а потім вже, на більш пізніх стадіях обробки (600 мс), відбувається контрольований свідомістю аналіз у правій півкулі [3]. На нашу думку, зменшення СП тета-ритму в лівих центральні-тім'яних ділянках в контрольній групі порівняно із "емоційним" завданням відображає різницю в обробці емоційних слів і псевдослів, які не захоплюють увагу обстежуваних.

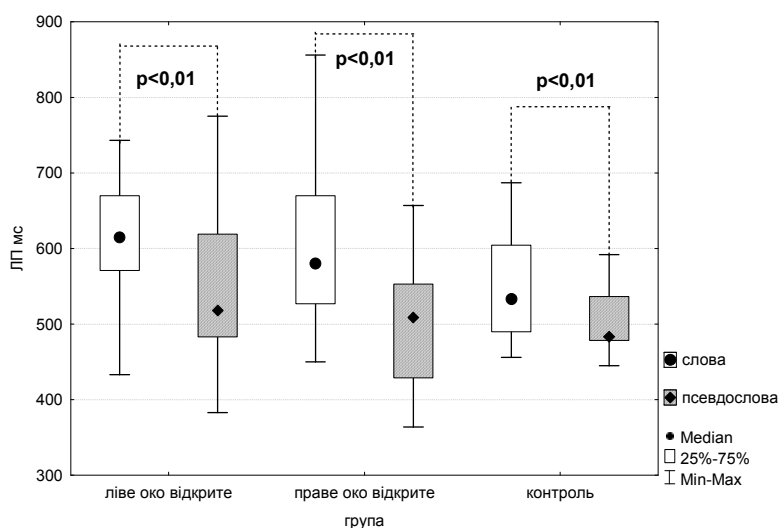


Рис.1. Латентні періоди реакції визначення кольору написання слів та псевдослів обстежуваними різних груп

Таблиця 1. Кількість помилок та пригаданих слів після виконання завдання із використанням справжніх слів, (Медіана; 25%; 75%)

Група	Кількість вірно відтворених слів, шт.			Кількість помилок	
	Емоційні слова	Нейтральні слова	Всього	Тест із словами	Тест із псевдословами
Ліве око відкрите (n=15)	5 [4;6] **	2 [1;2]	6 [5;8]	6 [4;10] #	3 [1;7]
Праве око відкрите (n=15)	4 [4;5] **	1 [1;2]	5 [5;7]	6 [4;7]	4 [1;5]
Контроль (n=30)	5 [2;6] **	1 [0;2]	5 [3;8]	5 [5;6] #	3 [2;5]

** – $p < 0,01$ достовірність різниці в порівнянні з нейтральними словами; # – $p < 0,05$ достовірність різниці в порівнянні з тестом із псевдословами

Дуже цікавими є зареєстровані відмінності між "правоокими" та "лівоокими" групами. Так, в обстежуваних, що виконували тест із відкритим лівим оком відмічали зростання СП альфа-ритму в лівих скронево-потиличних зонах, що відображає зниження рівня активації мозку порівняно з першим завданням, зниження СП тета-ритму в лівій префронтальній зоні та підвищення СП високочастотного бета-ритму в правій префронтальній зоні. Фактично, спостерігаємо локальну кіркову активацію в правій префронтальній зоні. Можна припустити, що обробка інформації в цьому тесті потребує менших зусиль від обстежуваних, що також підтверджується значуще меншою кількістю помилок 3 [1;7] порівняно з тестом із словами 6 [4,10].

В групі, що виконувала тести з відкритим правим оком не знайдено жодних відмінностей в патерні мозкової активності між виконанням першого та другого завдань. Із даних ЕЕГ складається враження, що при подачі інформації через праве око автоматичний семантичний аналіз слів не відбувається, так як виконання аналогічного завдання із псевдословами у цій групі не супроводжується зменшенням активації мозку, немає "полегшення" через відсутність емоційної лексики, тому можна припустити, що при сприйнятті слів через праве око працюють лише зони, залучені у визначення кольору літер. На користь цього припущення свідчить також і

відсутність значущої різниці в кількості помилок між двома тестами у обстежуваних даної групи 6 [4;7] та 4 [1;5]. Проте різниця в ЛП реакції між словами та псевдословами говорить (рис.1), про мінімальний аналіз значень слів у першому тесті.

Аналіз змін електричної активності мозку під час проходження тесту із словами відносно стану спокою в різних групах виявив відмінності в змінах спектральних компонентів ЕЕГ (рис.2Б). Показано, що у обстежуваних, що проходили тест з відкритим лівим оком виявлено генералізоване зростання СП тета-ритму в усіх ЕЕГ-відведеннях, окрім передньолобних, по відношенню до стану спокою (відкриті очі), що може відображувати ріст емоційного напруження обстежуваних під час виконання завдання. В "правоокій" групі, натомість, спостерігалось збільшення СП високочастотного піддіапазону бета-ритму в префронтальних, потиличних та тім'яних зонах обох півкуль, а також задній скроневої ділянки лівої півкулі, та латерально-фронтальній і передній скроневої ділянках правої півкулі. У контрольній групі спостерігали "змішаний" патерн мозкової активації: збільшення потужності тета-ритму в обох лобних та тім'яно-скроневи́х зонах правої півкулі (як в "лівоокій" групі) на фоні зростання потужності бета-ритму в префронтальних, потиличних та лівій лобній зонах (як в "правоокій" групі).

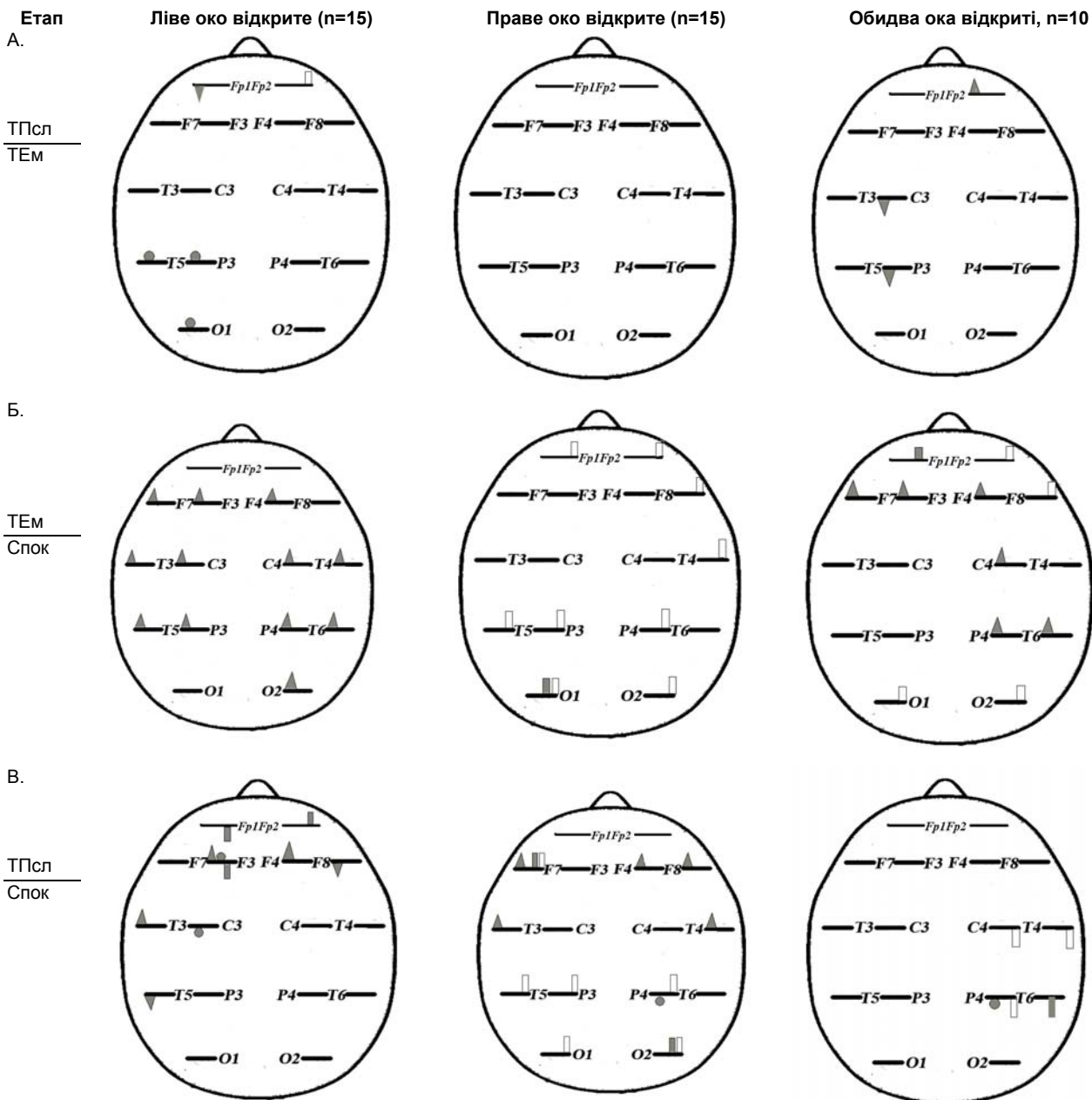


Рис. 2. Топокарти значущих відмінностей спектральної потужності (СП) основних ритмів ЕЕГ обстежуваних на різних етапах експерименту: А. під час виконання тесту з використанням псевдослів відносно тесту з емоційними і нейтральними словами (ТПсл/ТЕ); Б. під час виконання тесту з використанням слів відносно стану спокою (ТЕм/Спок); В. під час виконання тесту з використанням псевдослів відносно стану спокою (ТПсл/Спок)

Примітки: горизонтальною лінією вказана відсутність вірогідної різниці між значеннями СП у відповідних відведеннях. Знак над рисочкою – зростання показника, знак під рисочкою – зниження показника.

▲ зміни СП тета-діапазону; ● зміни СП альфа-діапазону; ▮ ▮ зміни СП низькочастотного та високочастотного під діапазонів бета-ритму.

Розглянемо зміни ЕЕГ при виконанні другого завдання із псевдословами відносно фонові електричної активності в стані спокою з відкритими очима (рис. 2В). В даному завданні їм потрібно було виконувати вже знайоме завдання, відмінними були лише стимули, які слід було диференціювати за кольором – тут презентувались псевдослова на кшталт "роукса", "шнамек" і т.п. Нагадаємо, що у всіх трьох групах ЛП реакції на псевдослова був коротший, ніж ЛП реакції на нейтральні та емоційні слова (див. рис. 1).

В обстежуваних, що дивились лівим оком, відзначали ріст СП тета-ритму у середньо фронтальних та лівій скроневій зонах, а також зниження СП бета1-піддіапазону в лівих лобних зонах, та падіння СП тета-ритму в правому латеральнофронтальному та лівому задньоскроневою відведеннях відносно попереднього стану перепочинку. групі з відкритим правим оком спостерігали збільшення СП тета-ритму в лобних та скроневих зонах обох півкуль; збільшення СП низькочастотного діапазону бета-ритму в зонах F7, O2; та високочастотного бета-піддіапазону в зонах F7, T5, P3, P4, O1, O2 під

час виконання тесту з використанням псевдослів (ТПс) по відношенню до стану спокою, що передував завданню. Тобто порівняно з станом спокою завдання із псевдословами досить істотно активувало мозок обстежуваних обох експериментальних груп. А от у контрольній групі (рис. 2В) спостерігали тенденцію ($p=0,06$) до зниження потужності низькочастотного бета-діапазону в центральних та скроневих ділянках правої півкулі порівняно із попереднім станом спокою із відкритими очима.

Отже, сприйняття слів лівим оком супроводжується генералізованим ростом СП тета-коливань, що відображає емоційну активацію внаслідок неможливості ігнорувати значення емоційних слів. В роботі [9] було показано посилення СП тета-ритму в межах 7-8 Гц при демонстрації слів з негативним емоційним значенням в симетричних лобних, правих тім'яних, скроневих та потиличних ділянках. Ріст тета-коливань сьогодні також інтерпретують як прояв інтеграції нейронів при оперуванні інформації при її запам'ятовуванні, корелять робочої пам'яті [10], але для цих процесів характерні зміни тета-ритму в лобних зонах, що відбувається при роботі з "псевдословами" (рис. 2В). При сприйнятті слів правим оком спостерігаємо ніби "відфільтровану" від контрольної картину високочастотних коливань, що зазвичай супроводжує когнітивні процеси, зосереджені в лобних і потиличних зонах. Як показано дослідженнями [11], під час вирішення конфліктних завдань типу Струп-тесту (однією з модифікацій якого є застосовані нами завдання) спостерігається зростання мозкового кровотоку в двох мозкових регіонах: 1) в поясній звивині та передньолобних зонах – ця активність пов'язана з виконанням завдання, що потребує найбільше уваги – називання кольору написання слова; 2) вентральний шлях обробки зорової інформації (потилично-скроневі ділянки), пов'язаний з нерелевантним до завдання читанням слів. Збільшення СП бета-ритму розглядають як корелять ендогенних низхідних процесів уваги [12], коли вона цілеспрямовано фокусується на певній ознаці стимулу. Подібні процеси ми спостерігаємо "в чистому вигляді" в групі, що дивилася правим оком. Обстежуваним з активним правим оком вдалось краще, ніж "лівооком" ігнорувати семантичне значення стимулів, що підтверджується відсутністю різниці в кількості помилок між двома тестами в цій групі (табл.1).кладається враження, що при монокулярній стимуляції нам вдалось розділити емоційні та когнітивні компоненти аналізу стимулів. Ріст СП тета-ритму по всіх зонах відбувався при презентації в ліве око, а ріст високочастотних компонентів ЕЕГ – при презентації у праве око. При цьому зміни на ЕЕГ при виконанні завдань відбувались в обох півкулях у всіх групах. За даними ряду авторів [див. огляд 3] обидві півкулі вносять вклад у обробку емоційних слів, проте час їх залучення різний (ліва півкуля швидше, права – пізніше). Оскільки наші дані представ-

ляють усереднені результати за весь період тестування, ми бачимо кореляти емоційної активації обох півкуль за умови потрапляння стимулів через ліве око. Важливим є питання, чи такий ріст СП тета-ритму при лівоокому баченні пов'язаний із специфікою зв'язків центральної ямки сітківки лівого ока асоціативними кірковими зонами, чи це пов'язано із незвичної стимуляції недомінантного ока (адже в нас були обстежувані із ведучим правим оком). Для відповіді на це питання доцільним буде дослідити групи обстежуваних із ведучим лівим оком.

Висновки. Монокулярна презентація вербальних стимулів різного типу супроводжувалась відмінним від бінокулярного патерном мозкової активності. Виконання завдання за наявності емоційних слів в тесті супроводжувалося зростанням СП тета-діапазону, що відображає емоційне напруження, при їх презентації у ліве око. Виконання аналогічного завдання при презентації в праве око супроводжувалося ростом високочастотних компонентів спектру ЕЕГ, що відображає когнітивні процеси, контрольовані низхідною системою уваги. Завдання з псевдословами виконувались при меншій мозковій активації та з меншою кількістю помилок, ніж із справжніми словами, у бінокулярній та лівоокулярній групах. Можна припустити, що при правоокулярному сприйнятті вербальних стимулів механізми селективності уваги більш ефективні, оскільки тільки за таких умов патерни ЕЕГ при виконанні завдань із псевдословами та справжніми словами не відрізняються,

Список використаної літератури. 1. Bourne V.J. The divided visual field paradigm: methodological considerations // *Laterality*. 2006 Vol.11(4). – P.373-93. 2. Ellis A.W., Brysbaert M. Split fovea theory and the role of the two cerebral hemispheres in reading: a review of the evidence. *Neuropsychologia*. 2010 Vol. 48(2). – P.353-365. 3. Abbassi E., Kahlaoui K., Wilson M.A., Joannette Y. Processing the emotions in words: the complementary contributions of the left and right hemispheres // *Cogn Affect Behav Neurosci*. 2011 Vol. 11(3). – P.372-385. 4. Kissler J., Assadollahi R., Herbert C. Emotional and semantic networks in visual word processing: insights from ERP studies. *Prog Brain Res*. 2006; Vol. 156. – P.147-183. 5. MacKay D.G., Shafit M., Taylor J.K., Marian D.E., Abrams L., Dyer J.R. Relations between emotion, memory, and attention: evidence from taboo strop, lexical decision, and immediate memory tasks // *Mem Cognit*. 2004 Vol.32(3), P.474-488. 6. Брагина Н. Н., Доброхотова Т. А. Функциональные асимметрии человека. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 1988. – 240 с. 7. Landis T. Emotional words: what's so different from just words? // *Cortex*. 2006 Vol. 42(6). – P.823-30. 8. van Hooff J.C., Dietz K.C., Sharma D., Bowman H. Neural correlates of intrusion of emotion words in a modified Stroop task // *Int J Psychophysiol*. 2008 Vol.67(1) – P.23-34. 9. Ilfuchenok I.R. Differences in the EEG frequency characteristics during the perception of positive-emotional, negative-emotional and neutral words // *Zh Vyssh Nerv Dejati Im I P Pavlova*. 1996, Vol. 46(3), P.457-468. 10. Klimesch W., Freunberger R., Sauseng P., Gruber W. A short review of slow phase synchronization and memory: evidence for control processes in different memory systems? // *Brain Res*. 2008 Vol.1235. – P.31-44. 11. Harrison B.J., Shaw M., Yucel M. та ін. Functional connectivity during Stroop task performance // *Neuroimage*. 2005 Jan 1;24(1):181-191. 12. Engel A. K. and Fries P. Beta-band oscillations—signalling the status quo? // *Curr Opin Neurobiol*. 2010 Vol. 20(2). – P.156-165.

Надійшла до редколегії 15.11.12

УДК 579:579.66 [57.017: 57.017.3. 57.014]

І. Домбровська, канд. біол. наук, Т. Лиманська, студ.,
І. Малиновська, д-р с.-г. наук, В. Кокозей, д-р хім. наук**ВПЛИВ ГЕТЕРОБІМЕТАЛІЧНИХ КОМПЛЕКСІВ НА МІКРОСКОПІЧНІ ГРИБИ**

Досліджували вплив гетеробіметалічних комплексів міді та кадмію з етилендіаміном, кобальту та заліза з саліциловим альдегідом та аміно-бензиловим спиртом на мікроскопічні гриби. Встановлено, що серед досліджуваних речовин найвищий рівень фунгіцидної активності мала сполука $[\text{Cu}(\text{En})_2][\text{Cd}_2(\text{CH}_3\text{COO})_6]$ (En – етилендіамін) (444-667 мкг/мл). Гальмування радіального росту грибів під її впливом складало 75,92 – 87,77% за концентрацій 250-500 мкг/мл. Фунгіцидні концентрації 250-1000 мкг/мл та стримування росту колоній грибів на 57,06 – 79,76% за концентрацій 125-500 мкг/мл були характерні для сполуки $[\text{Co}_4\text{Fe}_2\text{O}(\text{L})_8 \cdot 4\text{DMFA} \cdot \text{H}_2\text{O}]$ (L – залишок від H_2L = продукт конденсації саліцилового альдегіду та моноетаноламіну; ДМФА = диметилформамід). Показники антигрибного впливу сполуки $[\text{Co}_2\text{Fe}_2\text{L}_6]$ (L – 5-бромо-саліциловий альдегід з 2-аміно-бензиловим спиртом) становили 500-2000 мкг/мл як діапазон МІК та гальмування радіального росту грибів на 16,32 – 47,71% за концентрацій 250-500 мкг/мл.

Ключові слова: гетеробіметалічні комплекси, мікроскопічні гриби.

Исследовали влияние гетеробиметаллических комплексов меди и кадмия с этилендиамином, кобальтом и железом с салicyловым альдегидом и амина-бензиловым спиртом на микроскопические грибы. Установлено, что среди исследованных веществ наибольший уровень фунгицидной активности имело соединение $[\text{Cu}(\text{En})_2][\text{Cd}_2(\text{CH}_3\text{COO})_6]$ (En – этилендиамин), (444-667 мкг/мл). Торможение радиального роста грибов под ее влиянием составляло 75,92-87,77% с концентрацией 250-500 мкг/мл. Фунгицидные концентрации 250-1000 мкг/мл и сдерживание роста колоний грибов на 57,06-79,76% с концентрацией 125-500 мкг/мл были характерны для соединения $[\text{Co}_4\text{Fe}_2\text{O}(\text{L})_8 \cdot 4\text{DMFA} \cdot \text{H}_2\text{O}]$ (L – остаток от H_2L = продукт конденсации салicyлового альдегида и моноэтаноламина; ДМФА = диметилформамид). Показатели антигрибного влияния соединения $[\text{Co}_2\text{Fe}_2\text{L}_6]$ (L – 5-бромо-салicyловый альдегидно-бензиловым спиртом) составляет 500-2000 мкг/мл как диапазон МИК и торможение радиального роста грибов на 16,32-47,71% с концентрацией 250-500 мкг/мл.

Ключевые слова: гетеробиметаллические комплексы, микроскопические грибы.

Studied the effect on the microscopic fungi destructors concrete pavement and fungi pathogens heterobimetallic complexes with ethylenediamine, salicylic aldehyde and amino-benzyl alcohol based on copper and cadmium, cobalt and iron. Found that among the studied substances highest fungicidal activity was compound $[\text{Cu}(\text{En})_2][\text{Cd}_2(\text{CH}_3\text{COO})_6]$ (En – ethylenediamine) (444-667 µg/ml). Inhibition of radial growth of fungi under the influence constituted 75,92 – 87,77% at concentrations of 250-500 µg/ml. Fungicidal concentrations of 250-1000 µg/ml and curb the growth of colonies of fungi on 57,06 – 79,76% at concentrations of 125-500 µg/ml characterized the compound $[\text{Co}_4\text{Fe}_2\text{O}(\text{L})_8 \cdot 4\text{DMFA} \cdot \text{H}_2\text{O}]$ (L – remainder of H_2L = salicyl aldehyde condensation product and monoethanolamine, DMFA = dimethylformamide). Indicators antifungal impact compound $[\text{Co}_2\text{Fe}_2\text{L}_6]$ (L – 5-bromo-salicylic aldehyde with 2-amino-benzyl alcohol) made 500-2000 µg/ml range as the MIC and inhibition of radial growth of fungi at 16,32 – 47,71% at concentrations of 250-500 µg/ml.

Keywords: heterobimetallic complexes, microscopic fungi.

Вступ. Проблема боротьби з мікроскопічними грибами, що викликають захворювання людей, тварин і рослин, біодеструкцію матеріалів, будівельних конструкцій, не втрачає актуальності. За умов антропогенного навантаження, нерационального застосування протигрибних препаратів зростають темпи розповсюдження грибів, їх адаптації до нових еконіш, посилюється агресивність грибів [1-3].

Як біоциди відомі препарати на основі саліциланіліду, 8-оксихіноляту міді, 2-оксидифенілу, тіурама [4], солей N-метил-, N,N-диметилдитіокарбамінової і етилен-N,N-біс(дитіокарбамінової) кислот (цинеб, манеб, полікарбацин, манкоцеб, ТМТД) [5], полігексаметилenguанідинів, октоати міді та цинку [6]. Серед сучасних фунгіцидів як медичних, так і технічних найбільше поширені азолі, а саме похідні триазолу та імідазолу [7,8]. Водночас, серед антимікотиків медичного застосування "золотим стандартом" антифунгальної активності тривалий час залишався полієновий антибіотик амфотерицин-В [9]. Проте з причини токсичності застосування полієнових антибіотиків значно зменшилось. Посилення вимог до рівня токсичності, екологічної безпеки препаратів вносить обмеження на застосування й інших препаратів. Тому одним зі шляхів скринінгу нових фунгіцидів є перевірка впливу на мікроскопічні гриби речовин з досвідом безпечного застосування [10].

Головною причиною, що змушує відмовлятися від старих засобів і стимулює пошук нових препаратів, є формування резистентності грибів до відомих фунгіцидних сполук. Розробка і створення нових антимікотиків, технічних біоцидів та пестицидів базується як на модифікації попередніх препаратів, так і на спрямованому синтезі нових речовин. Перспективним напрямком є створення комплексних препаратів та сполук [11].

Шляхом прямого синтезу у міжфакультетській НДЛ "Біологічно активні речовини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка були одержані ге-

теробіметалічні комплекси. В попередніх дослідженнях було показано, що комплекси, які містять два або більше різних за природою металів в одній сполуці, є помірно небезпечними [12], мають антибактеріальні [13] та протипухлинні властивості [14]. Встановлення інгібуючої дії на клітини прокариот та еукариот спонукало перевірити синтезовані речовини цієї групи на фунгіцидну активність. Завданням експерименту стало вивчити активність наданих сполук як основи потенційних медичних препаратів антимікотиків та як основи технічних біоцидів та пестицидів.

Об'єкт та методи досліджень. Досліджували наступні сполуки. Сполука 1 є комплексом міді та кадмію з етилендіаміном – $[\text{Cu}(\text{En})_2][\text{Cd}_2(\text{CH}_3\text{COO})_6]$ (En – етилендіамін), водорозчинна. Сполука 2 є комплексом кобальту та заліза з саліциловим альдегідом та етаноламіном $[\text{Co}_4\text{Fe}_2\text{O}(\text{L})_8 \cdot 4\text{DMFA} \cdot \text{H}_2\text{O}]$ (L – залишок від H_2L = продукт конденсації саліцилового альдегіду та моноетаноламіну; ДМФА = диметилформамід), розчинна у диметилсульфоксиді (ДМСО). Сполука 3 є комплексом кобальту та заліза з бромо-саліциловим альдегідом та аміно-бензиловим спиртом $[\text{Co}_2\text{Fe}_2\text{L}_6]$ (L – 5-бромо-саліциловий альдегід з 2-аміно-бензиловим спиртом) розчинна у диметилсульфоксиді (ДМСО).

Для порівняння з досліджуваними були використані етилен-1,2-біс(дітіокарбамат)-цинку ($\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2\text{S}_4\text{Zn}$) – цинеб 80% за препаратом, 3-хлорсаліциловий альдегід, 3,5-дібромсаліциловий альдегід та біозахисний засіб на основі азолу TRIORATM.

Для визначення чутливості до новосинтезованих сполук за протоколом CLSI використовували клінічні ізоляти грибів родів *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, роботу з якими проводили у відділі фармакології протимікробних засобів Інституту фармакології та токсикології АМН України. Гриби культивували на картопляно-глюкозному агарі протягом 3-5 діб за температури 30-35°C для отримання суспензій спор. Кількість грибних

спор визначали за оптичною густиною за довжини хвилі 530 нм. Для *Aspergillus* spp. оптична густина суспензій становила 0,09-0,11, що відповідає $1\text{--}5 \times 10^6$ спор/мл; для *Fusarium* spp., *Mucor* spp. оптична густина суспензій становила – 0,15-0,17, що відповідає $4\text{--}9 \times 10^5$ спор/мл. Розчинені у диметилсульфоксиді (ДМСО) гетеробіметалічні сполуки 2, 3 та розчинену у дистильованій воді сполуку 1 вносили у середовище RPMI, створюючи двократне розведення від концентрації 16 мкг/мл до 0,03125 мкг/мл. Суспензії спор вносили в кількості 1:10 від стартової суспензії. Культивування грибів в присутності досліджуваних сполук здійснювали протягом 5-10 діб за температури 30-35°C з наступною оцінкою чутливості чи стійкості грибів до сполук [15]. Дослідження кожної сполуки здійснювали у трьох повторностях.

Тест-культурами для вивчення фунгіцидного впливу досліджуваних сполук як потенційних технічних біоцидів та пестицидів слугували мікроскопічні гриби. Авторами статті у попередніх дослідженнях ці гриби були виділені з ділянок пошкодження стінового покриття бетонних конструкцій та ідентифіковані як *Aspergillus niger* van Tieghem, *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries, *Paecilomyces variotii* Bainier, *Mucor hiemalis* Wehmer, із також ізольовані у польових дослідках культури фітопатогенів – *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., *Alternaria alternata* (Fries) Keissler, *Rhizopus stolonifer* var. *stolonifer* (Ehrenb.). Тест-культури готували за вимогами стандартів випробувань виробів та матеріалів на стійкість до пліснявих грибів [16,17]. Гриби культивували на картопляно-глюкозному агарі протягом 7-14 діб за температури 28°C для отримання суспензій спор щільністю $1\text{--}2 \times 10^7$ спор/мл, яку встановлювали за допомогою гемоцитометра. Для визначення мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) готували у картопляно-глюкозному середовищі двократні розведення досліджуваних та контрольних сполук від концентрації 4000 мкг/мл до 32 мкг/мл, в які вносили суспензії спор для створення фінальної концентрації $1\text{--}2 \times 10^6$ спор/мл. Культивування грибів в присутності сполук здійснювали протягом 14 діб за температури 28°C у трьох повторностях. Контролем росту грибів було культивування за відсутності сполук у середовищі.

Найменша концентрація сполук і препаратів, що повністю затримувала ріст гриба вважалася мінімальною інгібуючою концентрацією (МІК). З метою уточнення МІК готували півторакратні розведення сполук і повторювали експеримент. За шкалою, розробленою для оцінки антифунгальної активності [15], визначали інтенсивність росту: 0 – відсутність росту, 1 – слабкий ріст (25% від контролю росту), 2 – ріст середньої інтенсивності (50% від контролю росту), 3 – інтенсивний ріст (75% від контролю росту), 4 – інтенсивність росту ідентична контролю росту.

Дію на радіальний ріст колоній грибів оцінювали за відсотком інгібування росту під впливом сполук у порівнянні з ростом грибів на контрольному середовищі, яке таких сполук не містить. Готували картопляно-глюкозний агар зі сполуками 1, 2 та 3 в найбільших концентраціях, які затримували ріст тест-культур, але не були фунгіцидними (МІК). Агар розливали по 20 мл в чашки Петрі діаметром 9 см. Тест-культури, засіяні уколом в центрі чашки, культивували 10-14 діб, вимірюючи діаметр утворених колоній на 6-10 добу спостережень і можливі зміни росту до 14 доби культивування. Гальмування росту вираховували за формулою Abbot:

$I, \% = \frac{D_k - D_o}{D_k} \cdot 100\%$, де $I, \%$ – інгібування (гальмування) росту у порівнянні з контролем, D_k – діаметр колонії (мм) на контрольному середовищі, D_o – діаметр колонії (мм) на середовищі з досліджуваною сполукою [18]. Дослід виконували у трьох повторностях.

Статистичну обробку результатів здійснювали з використанням пакету програм "Statistica 6.0".

Результати та їх обговорення. Дослідження гетеробіметалічних комплексів в концентраціях від 16 мкг/мл до 0,03125 мкг/мл в стандартному середовищі для вивчення чутливості до антимікотиків показало відсутність впливу сполук на клінічні ізоляти родів *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*. Саме такі концентрації рекомендовані CLSI для оцінки сучасних препаратів, що впливають на гіфальні мікроскопічні гриби [15]. Діапазон МІК амфотерицину В становить 0,5-2 мкг/мл для чутливих до нього мікроміцетів, за умови МІК > 2 мкг/мл гриби оцінюють як стійкі. Межа чутливості гіфальних грибів до ітраконазолу, кетоконазолу – 16 мкг/мл, вориконазолу, позаконазолу – 8 мкг/мл [19]. Таким чином, результати першого етапу дослідження не дозволяють розглядати запропоновані гетеробіметалічні комплекси як основу медичних препаратів.

Відсутність активності сполук в концентраціях, що відповідають МІК сучасних антимікотиків, змусило продовжити дослідження з метою встановлення фунгіцидної активності проти грибів-пошкоджувачів та фітопатогенів. Як відомо, технічні фунгіциди та пестициди використовують в концентраціях 0,1-7%, які відповідають рівню від 1000 мкг/мл.

Результати другого етапу дослідження засвідчили, що для більшості тест-культур грибів інгібуючими були концентрації більше, ніж 250 мкг/мл (табл.1, 2). На рівні 250 мкг/мл була визначена МІК стосовно *F.solani*, *P.variotii*, *C. cladosporioides* тільки для сполуки 2, проте для інгібування інших тест-культур сполукою 2 необхідні були концентрації від 500 до 1000 мкг/мл (табл.2). Сполука 3 у 2 рази поступалася за рівнем фунгіцидної активності сполуці 2. Діапазон МІК сполуки 2 складав 250 – 1000 мкг/мл, для сполуки 3 – 500 – 2000 мкг/мл.

У найактивнішої з усіх досліджуваних сполук – сполуки 1 – показник мінімальної інгібуючої концентрації склав 444 мкг/мл, водночас МІК цієї сполуки стосовно *A.niger* та *A.alternata* була 667 мкг/мл (табл.1).

Активність досліджуваних сполук порівнювали з активністю препаратів, які близькі за структурою та використовуються як пестициди та біоциди. Цинеб 80% с.п. (етилеи-1,2-біс-(дітіокарбамат)-цинку $C_4H_6N_2S_4Zn$), синтетизований з використанням етилендіаміну, тривалий час застосовувався як самостійний пестицид та у складі комбінованих препаратів для протравлювання насіння та обприскування рослин в період вегетації [5]. У нашому дослідженні антифунгальна активність цинебу визначалася концентраціями 250 – 1000 мкг/мл, подібними до сполуки 2. Проте активність сполуки 1, яка найбільше наближена за структурою до цинебу, перевищувала активність цього препарату (табл.1). Зважаючи на те, що найчисельнішими серед біоцидів та пестицидів є азольні препарати, у дослідженні використали технічний фунгіцид для обробки відштукатурених, кам'яних та бетонних поверхонь – біозахисний засіб TRIORATM, на основі матеріалів та технології компанії "Bayer". Діапазон фунгіцидних концентрацій цього препарату складав від 125 до 500 мкг/мл (табл.1).

В експерименті для порівняння зі сполуками 2 та 3 використані також 3-хлорсаліциловий альдегід та 3,5-дібромсаліциловий альдегід. Як свідчать літературні джерела, хлоровані і бромовані похідні саліцилового альдегіду раніше були перевірені на фунгіцидну активність [10,20]. Результати нашого дослідження виявили нижню межу їх фунгіцидних концентрацій на рівні 500 – 667 мкг/мл та верхній рівень – 2000 – 4000 мкг/мл (табл.2).

Інтенсивність росту тест-культур за різних інгібуючих концентрацій досліджуваних сполук представлено на

рисунках 1-3. Комплекс міді та кадмію з етилендіаміном (сполука 1) забезпечує пригнічення, дуже слабкий ріст майже половини культур грибів концентраціями нижчими за МК (198-296 мкг/мл), проте для більшості культур, окрім *A.niger* та *A.alternata*, фунгіцидною є саме концентрація 444 мкг/мл. Найбільшу стійкість культури *A.niger* та *A.alternata* виявляли і до комплексу кобальту та заліза з саліциловим альдегідом та моноетаноламіном (сполука 2). Але, водночас, представники мікроміцетів, такі як *F.solani*, *P.variotii*, *C. cladosporioides* гинули за концентрації 250 мкг/мл, хоч їх ріст за менших концентрацій був середньої інтенсивності. Інтенсивний і дуже інтенсивний ріст грибів на рівні контролю спостерігали за наявності в середовищі культивування сполуки 3 – комплексу кобальту та заліза з бром-саліциловим альдегідом та аміно-бензиловим спиртом, що свідчить про низьку ефективність цієї сполуки.

Для вирішення проблеми біопозшкоджень та боротьби з фітопатогенами багато важить не тільки знищення грибів, а й затримка їх розвитку, обмеження їх поширення. Тому для прогнозу фунгістатичної дії культури грибів був використаний показник гальмування лінійного радіального росту колоній в присутності досліджуваних сполук 1, 2, 3 в агарі. За результатом попереднього дослідження були визначені по 2 концентрації, які найбільше гальмували ріст певних тест-культур, але не були МК. Сполуки 1 та 3 містилися в агарі в концентраціях 250 мкг/мл та 500 мкг/мл, концентрація в агарі сполуки 2 була 125 мкг/мл та 500 мкг/мл. Одержані результати свідчать про порівняний фунгістатичний ефект сполук 1 та 2, водночас гальмування росту колоній сполукою 1 було більшим на 8 -18%. Так, гальмування росту сполукою 1 складало 75,92 – 87,77%, сполука 2 гальмувала ріст від 57,06% до 79,76% (табл.3). Щонайменше затримувала ріст колоній тест-культур сполука 3 лише на 16,32 – 47,71%. Фунгістатична дія виявлялась не тільки в затримці росту та зменшених розмірах колонії, але й у зміні забарвлення та структури колонії. Такі зміни можуть свідчити порушення фізіологічних процесів і утворення репродуктивних структур [6].

Вплив досліджуваних сполук на гриби не можна безпосередньо пов'язати з такими складовими як етилендіамін або похідні саліцилового альдегіду через відсутність

даних про антифунгальну активність етилендіаміну та недостатньо вивчений вплив саліцилового альдегіду [20]. На нашу думку, ефект гетеробіметалічних комплексів залежить перед усім від впливу металів. Численні данні літератури свідчать про здатність металів зв'язуватися з клітинною стінкою та ЦПМ, порушуючи проникність клітин, транспорт цукрів і катіонів. Метали можуть зв'язуватися з SH-групами білків, інактивуючи ферменти, або замінювати метали в їх активному центрі, змінювати конформацію молекули ферменту. Також метали взаємодіють з фосфатними групами, порушуючи процеси окисного фосфорилування, утворюють хелати з важливими метаболітами або каталізують розпад метаболітів. Найчутливішими до дії важких металів є процеси клітинного поділу [21]. Відомо, що мікроскопічні гриби більш стійкі до впливу важких металів, ніж бактерії, проте наявність у середовищі не одного, а кількох металів посилює стресовий ефект. Цим можна пояснити і дію гетеробіметалічних комплексів у високих концентраціях.

Останніми роками активізуються дослідження комплексних сполук, що містять метали [22], проте їх практичне використання потребує подальших досліджень на рівні вимог до сучасних медичних препаратів та біоцидів.

Висновки: 1.Мінімальні фунгіцидні концентрації комплексу міді та кадмію з етилендіаміном – $[\text{Cu}(\text{En})_2][\text{Cd}_2(\text{CH}_3\text{COO})_6]$ (En – етилендіамін) становлять 444 – 667 мкг/мл. Гальмування радіального росту грибів за концентрацій 250-500 мкг/мл складає 75,92 – 87,77%. 2. Діапазон мінімальних інгібуючих концентрацій комплексу кобальту та заліза $[\text{Co}_4\text{Fe}_2\text{O}(\text{L})_8 \cdot 4\text{DMFA} \cdot \text{H}_2\text{O}]$ (L – залишок від H_2L = продукт конденсації саліцилового альдегіду та моноетаноламіну; ДМФА = диметилформамід) стосовно тест-культур гіфальних грибів становить 250 – 1000 мкг/мл. Радіальний ріст грибів на 57,06% – 79,76% гальмується концентраціями 125 – 500 мкг/мл. 3. Комплекс кобальту та заліза з бром-саліциловим альдегідом та аміно-бензиловим спиртом $[\text{Co}_2\text{Fe}_2\text{L}_6]$ (L – 5-бром-саліциловий альдегід з 2-аміно-бензиловим спиртом) виявляє фунгіцидні властивості за концентрацій 500 – 2000 мкг/мл та зменшує радіальний ріст грибів на 16,32 – 47,71% при 250-500 мкг/мл.

Таблиця 1. Мінімальні інгібуючі концентрації комплексу міді та кадмію з етилендіаміном (сполука 1), промислового пестициду та біоциду

Тест-культури	Концентрації (мкг/мл)		
	$[\text{Cu}(\text{En})_2][\text{Cd}_2(\text{CH}_3\text{COO})_6]$ (сполука 1)	$\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2\text{S}_4\text{Zn}$ (цинеб 80% с.п.)	Біозахист TRIORA™
<i>A. niger</i>	667	1000	500
<i>F. solani</i>	444	250	125
<i>A. alternata</i>	667	1000	500
<i>P. variotii</i>	444	250	125
<i>C. cladosporioides</i>	444	250	250
<i>M. hiemalis</i>	444	1000	250
<i>R. stolonifer</i>	444	1000	250

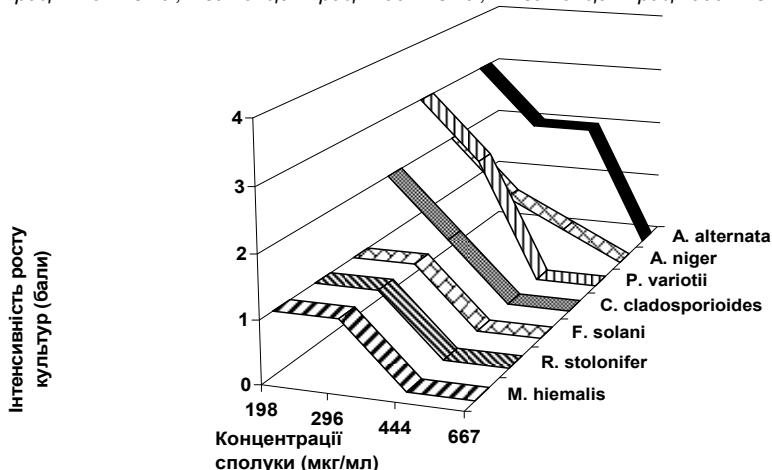
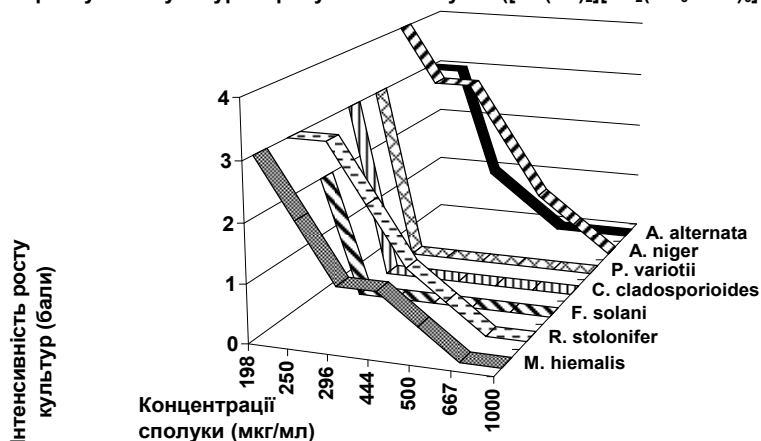
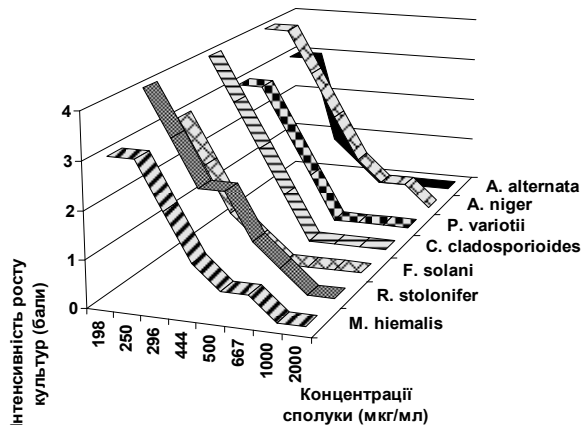
Таблиця 2. Мінімальні інгібуючі концентрації комплексів кобальту та заліза з продуктом конденсації саліцилового альдегіду та моноетаноламіну (сполука 2) і з бром-саліциловим альдегідом та аміно-бензиловим спиртом (сполука 3) та похідних саліцилового альдегіду

Тест-культури	Концентрації (мкг/мл)			
	$[\text{Co}_4\text{Fe}_2\text{O}(\text{L})_8 \cdot 4\text{DMFA} \cdot \text{H}_2\text{O}]$ (сполука 2)	$[\text{Co}_2\text{Fe}_2\text{L}_6]$ (сполука 3)	3-хлор-саліциловий альдегід	3,5-дібром-саліциловий альдегід
<i>A. niger</i>	1000	2000	4000	2000
<i>F. solani</i>	250	500	667	500
<i>A. alternata</i>	500	500	1000	1000
<i>P. variotii</i>	250	500	667	500
<i>C. cladosporioides</i>	250	500	1000	500
<i>M. hiemalis</i>	667	1000	1000	1000
<i>R. stolonifer</i>	667	1000	1000	1000

Таблиця 3. Вплив гетеробіметалічних сполук на радіальний ріст мікроміцетів

Тест-культури	Гальмування радіального росту колоній (% від контролю) під впливом досліджуваних сполук, $p < 0,05$		
	$[\text{Cu}(\text{En})_2][\text{Cd}_2(\text{CH}_3\text{COO})_6]$ (сполука 1)	$[\text{Co}_4\text{Fe}_2\text{O}(\text{L})_8 \cdot 4\text{ДМФА} \cdot \text{H}_2\text{O}]$ (сполука 2)	$[\text{Co}_2\text{Fe}_2\text{L}_6]$ (сполука 3)
<i>A. niger</i>	78,22±3,48***	67,27±2,64***	16,32±3,95***
<i>F. solani</i>	87,77±5,37**	79,76±4,22*	47,71±4,73**
<i>A. alternata</i>	75,92±4,61***	57,06±2,42**	31,97±3,08**
<i>P. variotii</i>	83,30±3,90**	69,76±4,11*	31,33±2,40**
<i>C. cladosporioides</i>	79,13±5,74**	62,17±5,13*	41,00±4,77**
<i>M. hiemalis</i>	87,17±3,70**	62,80±4,28***	23,30±2,55***
<i>R. stolonifer</i>	86,77±7,93**	64,40±7,62***	25,4±4,65***

Примітка: *за концентрації 125 мкг/мл, **за концентрації 250 мкг/мл, *** за концентрації 500 мкг/мл

Рис.1. Інтенсивність росту тест-культур в присутності сполуки 1 ($[\text{Cu}(\text{En})_2][\text{Cd}_2(\text{CH}_3\text{COO})_6]$ (En – етилендіамін))Рис. 2. Інтенсивність росту тест-культур в присутності сполуки 2 ($[\text{Co}_4\text{Fe}_2\text{O}(\text{L})_8 \cdot 4\text{ДМФА} \cdot \text{H}_2\text{O}]$ (L – залишок від H_2L = продукт конденсації саліцилового альдегіду та моноетаноламіну; ДМФА = диметилформамід))Рис.3. Інтенсивність росту тест-культур в присутності сполуки 3 ($[\text{Co}_2\text{Fe}_2\text{L}_6]$ (L – 5-бромо-саліциловий альдегід з 2-аміно-бензиловим спиртом))

микробиоты в процессы старения больничных зданий и ее потенциальная опасность для здоровья больных // Проблемы медицинской микологии. – 2005. – Т.7, №4 – С.3-12. 3. Шумилова Л.П., Куимова Н.Г. Микроскопические грибы как показатель экологического состояния городской среды // Иммунопатология, Аллергология, Инфектология: Экология грибов и человека. – 2010. – №1. – С.79 – 80. 4. Биоповреждения: Учеб. пособие для биолог. спец. вузов / Под ред. В. Ф. Ильичева. – М.: Высш. шк., 1987. – 352с. 5. Реагентна переробка та раціональне використання екологічно небезпечних сірковмісних пестицидних препаратів : монографія / І. І. Безвозюк, В. Г. Петрук, А. П. Ранський. – Вінниця :ВНТУ, 2010. – 180 с. 6. Кондратюк Т.О. Прояви морфологічних та фізіологічних особливостей мікроскопічних грибів-пошкоджувачів виробів та матеріалів в умовах впливу біоцидів // Modern Phytomorphology. – 2012. – № 1. – С. 43–46. 7. Климов Н.Н. Микозы: диагностика и лечение. – М.:Премьер МГ, 2007. – 146 с. 8. Державний реєстр пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні (доповнення з 01.01.11 згідно вимог постанови Кабінету Міністрів України від 21.11.2007 № 1328). 9. Sabatelli F., Patel R., Mann P. A. et al. In Vitro Activities of Posaconazole, Fluconazole, Itraconazole, Voriconazole, and Amphotericin B against a Large Collection of Clinically Important Molds and Yeasts //Antimicrob Agents Chemother. – 2006. – 50, №6. – P. 2009–2015. 10. Smith R. J., Read W. H. Investigations on fungitoxic derivatives of salicylaldehyde //Annals of Applied Biology. – 1961. – 49, № 2. – P.242-245. 11. Гусев А.Н., Шульгин В.Ф., Постникова О.Н., Криворученко Ю.Л. 5-(2'-гидрокси-фенил)-2-(2'-пиридил)-7,8-бензо-6,5-дигидро-1,3,6-триазаиндолизини и координационные соединения цинка на их основе: синтез и фунгицидная активность //Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского, серия "Биология, химия". – 2011. – Том 24 (63), № 2. – С. 352-359. 12. Белінська І., Рибальченко Т., Кокозей В., Нестерова О. Параметри гострої токсичності хлоридного комплексу Cu/Zn з етилендіаміном при одноразовому введенні пер ос// Вісник

Київського національного університету. Біологія. – 2008. – Вип.52_53. – С.67–68. 13. Фурзікова Т.М., Яворська Н.В., Позур В.В. та ін. Формування резистентності грамнегативних та грампозитивних тест-культур до ацетатного комплексу Cu/Cd з етилендіаміном // Буковинський медичний вісник. – 2008. –Том 12, №2. – С.82–83. 14. Застосування ацетатного комплексу міді та кадмію з етилендіаміном як протипухлинного та антиметастатичного засобу. Патент України № 36261, 2008. Бюл. № 20. 15. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A. 2002. Wayne, PA: NCCLS, 2002. 16. ГОСТ 9.048-89. 1989. Изделия технические. Методы лабораторных испытаний на стойкость к воздействию плесневых грибов. 17. ГОСТ 9.049-91. 1991. Материалы полимерные и их компоненты. Методы лабораторных испытаний на стойкость к воздействию плесневых грибов. 18. González L. C., Nicaio M. L., Berta Lina Muño B. L. et al. Effect of six fungicides on *Lecanicillium (Verticillium) lecanii* Zare and Gams. // Journal of Food, Agriculture & Environment. – 2012. – 10, N2. – P.1142-1145. 19. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST.) EUCAST Technical Note on the method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for candida-forming moulds//Clin Microbiol Infect. – 2008. – 14. – P. 982–984. 20. Peltari E., Karhumäki E., Langshaw J. et al. Antimicrobial Properties of Substituted Salicylaldehydes and Related Compounds // Z. Naturforsch. – 2007. – 62. – P.487 – 497. 21. Кушквич І., Гнатуш С., Гудзь С. Вплив важких металів на клітини мікроорганізмів// Вісник Львівського університету. – 2007. – 45. – С.3 – 28. 22. Chavain N, Biot C. Organometallic complexes: new tools for chemotherapy //Curr Med Chem. – 2010. – 17, №25. – P. 2729 – 2745.

Надійшла до редколегії 07.12.12

УДК: 616.34-002

А. Курочка, студ., Т. Довбинчук, асп., А. Путніков, пров. інж., А. Бичко, канд. біол. наук, Г. Толстанова, д-р біол. наук

АКТИВНІСТЬ МІЄЛОПЕРОКСИДАЗИ В СЛИЗОВІЙ ОБОЛОНЦІ ТОВСТОЇ КИШКИ ЩУРІВ ЗА УМОВ ТРИВАЛОЇ АНТИБІОТИКОТЕРАПІЇ ТА ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ВИРАЗКОВОМУ КОЛІТІ

Вперше встановлено зміни активності ферменту мієлопероксидази у слизовій оболонці товстої кишки щурів при одноразовому і повторюваному введенні антибіотику цефтріаксону в порівнянні з різними термінами експериментального виразкового коліту у щурів. Повторна терапія з цефтріаксоном викликає підвищення активності мієлопероксидази в слизовій оболонці товстої кишки щурів, що відповідає початковій фазі запального процесу (фаза альтерації) при експериментальному виразковому коліті.

Ключові слова: мієлопероксидаза, слизова оболонка шлунку, цефтріаксон, виразковий коліт.

Впервые установлены изменения активности фермента миелопероксидазы в слизистой оболочке толстой кишки крыс при однократном и повторяющемся введении антибиотика цефтриаксона по сравнению с различными сроками экспериментального язвенного колита у крыс. Повторная терапия с цефтриаксоном вызывает повышение активности миелопероксидазы в слизистой оболочке толстой кишки крыс, что соответствует начальной фазе воспалительного процесса (фаза альтерации) при экспериментальном язвенном колите.

Ключевые слова: миелопероксидаза, слизистая оболочка желудка, цефтриаксон, язвенный колит.

Found changes in the activity of neutrophil marker myeloperoxidase in the rat colonic mucosa after a single and repeated administration of antibiotic ceftriaxone in comparison with different time points of experimental ulcerative colitis. Repeated therapy with ceftriaxone causes increased activity of myeloperoxidase in rat colonic mucosa, which corresponds to the initial phase of the inflammatory process (phase alteration) during experimental ulcerative colitis.

Keywords: myeloperoxidase, gastric mucosa, ceftriaxone, ulcerative colitis.

Вступ. Антибактеріальна терапія займає надзвичайно важливе місце у нашому житті, але попри це вона має ряд маловивчених побічних ефектів. Останнім часом, увагу лікарів та дослідників привернув той факт, що антибіотики призводять до незворотних змін у складі нормофлори людини. Порушення комплексної взаємодії між симбіотичними аеробними та анаеробними бактеріями кишечника є одним з критичних факторів патогенезу виразкового коліту [1]. В 2011 році двома незалежними групами дослідників були вперше опубліковані результати епідеміологічних досліджень щодо взаємозв'язку між тривалим застосуванням антибіотиків та ризиком розвитку запальних захворювань кишечника у дітей [2] та дорослих (середній вік 43,4 роки) [3]. Механізми, що лежать в основі даного феномену є гіпотетичними та потребують емпіричного доказу.

Розвиток запалення при виразковому коліті супроводжується інфільтрацією нейтрофілів в стінку кишечника. Мієлопероксидаза (МПО) – маркерний фермент азурофільних гранул нейтрофільних лейкоцитів. МПО

приймає участь в утворенні активних форм кисню та окисненні галогенів до гіпогалогідів, які мають потужний пошкоджувальний потенціал по відношенню до багатьох мікроорганізмів, а також власних тканин у джерелі запалення. Після активації нейтрофілів відбувається їхня дегрануляція і вихід МПО в фагосому, або в позаклітинний простір. Хоча основна функція МПО нейтрофілів – захист від зовнішньої інфекції, при деяких умовах вона може викликати пошкодження власних тканин організму [4]. Крім того, МПО зв'язана з мембраною нейтрофілів бере участь в аутокринній модуляції їх активності через взаємодію з CD11b/CD18 [5]. Рівень МПО застосовується в клінічній та експериментальній практиці, як маркер інфільтрації нейтрофілів та, відповідно, запального процесу [6].

Бета-лактамі антибіотики, а саме цефалоспорины, найбільш розповсюджені у використанні в Україні та світі. Цефтріаксон належить до третього покоління цефалоспоринових антибіотиків, який завдяки ширині ба-

ктеричидної дії і вигідним фармакологічним властивостям часто застосовується в клінічній практиці.

Тому метою нашої роботи було дослідити активність ферменту МРО у слизовій оболонці товстої кишки щурів при одноразовому і повторюваному введенні антибіотику цефтріаксону та в різні терміни експериментального виразкового коліту у щурів.

Об'єкт та методи дослідження: Дослідження проведені на щурах самцях лінії Вістар (180-230 г, n=25). Щурів утримували в стандартних умовах виварію, на стандартному раціоні та з вільним доступом до води. Цефтріаксон-КМП (БАТ "Київмедпрепарат", Україна) (50 мг/кг, внутрішньом'язово) вводили щоденно одним

курсом впродовж 14 днів (14+0) чи двома курсами з перервою 4 тижні (14+14). Група контрольних щурів отримувала ін'єкції з дистильованою H_2O . Аутопсію проводили на 57 день після першого курсу дистильованої H_2O або цефтріаксону (рис. 1). Виразковий коліт моделювали ректальним введенням 0,1 мл 6%-го розчину йодацетаміду (ІА) (Sigma, США) в 1%-му розчині метилцелюлози. Контрольна група щурів отримувала по 0,1 мл 1%-го розчину метилцелюлози. Аутопсію проводили через 2 та 6 годин після введення ІА. Щурів умертвляли шляхом цервікальної дислокації, вирізали ділянку товстої кишки від анального отвору до сліпої кишки.

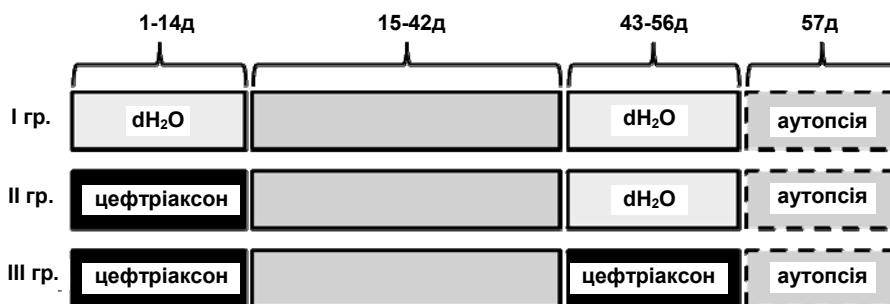


Рис. 1. Схема введення антибіотику цефтріаксону

Активність МРО (U/г) визначали в слизовій оболонці товстої кишки щурів вимірювання H_2O_2 -залежного окиснення о-дианізидин гідрохлориду (Sigma-Aldrich, Німеччина). Видалену слизову оболонку товстої кишки гомогенізували в рідкому азоті з додаванням детергенту гексадецилтриметиламонію бромід (НТАВ). Мікропробірки зі зразками проводили через 3 цикли: 1 хв в рідкому азоті, 10 хв на водяній бані при $T=37^\circ C$. Потім проби сонікували протягом 10 с на ультразвуковому дезінтеграторі (ООО "Ультразвуковая техника", Росія) при вихідній силі струму – 0,5 А. Після сонікації проби центрифугували впродовж 15 хв (14 000 грт, $T=4^\circ C$). В супернатанті визначали активність МРО на спектрофотометрі для мікропланшетів (Bio-Rad, США), $\lambda=450$ нм. Калібрували за допомогою стандартного розчину МРО (Sigma-Aldrich, Німеччина).

Математичну обробку отриманих даних проводили з використанням пакету статистичних програм (Statistica 8.0). Для кожної з вибірок перевіряли чи є нормальним розподіл досліджуваного показника, застосовуючи критерій Шапіро-Вілка. Для оцінки вірогідності різниць абсолютних значень середніх величин вираховували критерій t Стюдента. Отримані дані представлені у вигляді $M \pm SD$, n – кількість тварин у групі. Статистично достовірною вважали різницю при $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення: В попередніх дослідженнях нами показано, що дисбіотичні порушення, зумовлені введенням цефтріаксону, посилюються з часом та не здатні до самовідновлення. Так через 56 днів після 14 денного курсу цефтріаксону зміни мікрофлори відповідали дисбактеріозу III ступеня, при цьому кількісні показники анаеробної цукролітичної мікробіоти знаходились у межах норми. Кількість *E. coli* зі зміненими ферментативними властивостями значно зростала, збільшувалось число патогенних ентеробактерій. Реєстрували появу гемолітичних форм мікроорганізмів. Особливо були помітні зміни у складі пристінкової мікрофлори, що може зумовлювати розвиток запального процесу [7].

В результаті проведених досліджень встановлено, що один курс цефтріаксону (14+0) не викликає вірогідних змін активності МРО ($1,76 \pm 1,1$ U/г) в слизовій оболонці товстої кишки щурів у порівнянні з контрольною

групою тварин ($1,28 \pm 0,61$ U/г). Повторне введення цефтріаксону (14+14) вірогідно підвищує активність МРО, що дорівнює $2,13 \pm 0,17$ U/г ($p=0,013$) (рис. 2А).

В наступній серії досліджень ми провели порівняльний аналіз рівня активності МРО в слизовій оболонці товстої кишки щурів після введення цефтріаксону та на ранніх стадіях розвитку експериментального виразкового коліту. Нами була обрана модель йодацетамід-зумовленого коліту, який характеризується чітко визначеним у часі розвитком запального процесу, а саме: фаза альтерації (1-2 год після введення ІА) і фаза ексудації (6 год). Фаза альтерації характеризується збільшенням проникності кровоносних судин, що викликає масивний набряк слизової оболонки у місці запалення, а під час фази ексудації спостерігається інфільтрація лейкоцитів в стінку кишки, кількість яких поступово збільшується [8].

Рівень активності МРО у щурів, що ректально отримували 1%-вий розчин метилцелюлози ($1,12 \pm 0,56$ U/г) не відрізнявся від такого у щурів контрольної групи, що перорально отримували dH_2O ($1,28 \pm 0,61$ U/г) (рис. 2 А,Б). Ректальне введення йодацетаміду зумовлювало підвищення активності МРО в 2 рази через 2 години ($2,6 \pm 0,25$ U/г; $p=0,049$) та в 3 рази ($4,6 \pm 2,15$ U/г; $p=0,001$) через 6 годин (рис. 2Б).

Порівняльний аналіз показав, що зміни в активності МРО при повторному курсі цефтріаксону відповідають такому через 2 години експериментального коліту.

Загальновідомо, що антибіотикотерапія призводить до покращення симптомів при експериментальному коліті, пригнічуючи ріст патогенних бактерій [9]. Але разом з тим тривала антибіотикотерапія, а саме зумовлені нею зміни у складі мікрофлори, можуть бути одним із факторів розвитку коліту [2, 3]. Наші дані є механістичним доказом взаємозв'язку між антибіотик-зумовленими змінами у складі мікрофлори та розвитком запалення і вказують на те, що навіть монотерапія антибіотиком може підвищувати ризик виникнення коліту. В підтримку цього висновку є дані E.F.Verdu та співавторами (2006) [10], які показали підвищення активності МРО в слизовій оболонці товстої кишки мишей після 10 денного введення комплексу антибіотиків бацитраміцину, неоміцину та крімаріцину.

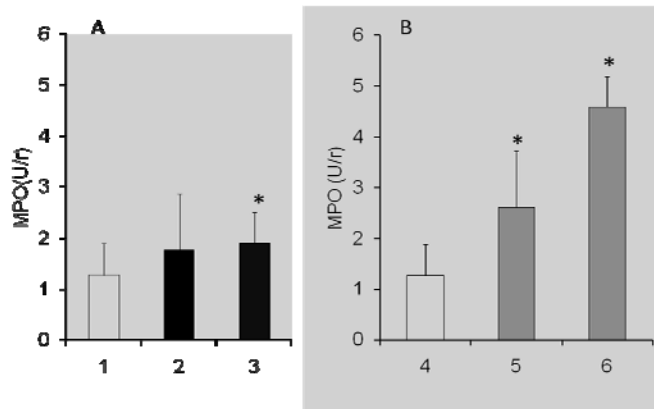


Рис. 2. Активність ферменту мієлопероксидази у слизовій оболонці товстої кишки щурів при одноразовому та повторному 14-денному курсі цефтріаксону (А) і в різні терміни експериментального виразкового коліту (Б), $M \pm SD$, * – $P < 0,05$, відносно показників у контрольній групі (1).

1 – контроль dH₂O; 2 – цефтріаксон + dH₂O(14+0); 3 – цефтріаксон + цефтріаксон (14+14); 4 – контроль 1% метилцелюлоза; 5 – 2 год експериментального коліту; 6 – 6 год експериментального коліту

Висновки: 1. Повторна терапія з цефтріаксоном викликає підвищення активності мієлопероксидази в слизовій оболонці товстої кишки щурів. 2. Цефтріаксон-зумовлене збільшення активності мієлопероксидази відповідає початковій фазі запального процесу (фаза алертації) при експериментальному виразковому коліті.

Список використаної літератури. 1. Gentschew L., Ferguson L.R. Role of nutrition and microbiota in susceptibility to inflammatory bowel diseases // *Mol Nutr Food Res.* – 2012. – Vol. 56, № 4. – P. 524-35. 2. Hviid A., Svanström H., et al. Antibiotic use and inflammatory bowel diseases in childhood // *Gut* – 2011. – Vol. 60, N 1. – P. 49-54. 3. Shaw S.Y., Blanchard J.F., et al. Association between the use of antibiotics and new diagnoses of Crohn's disease and ulcerative colitis // *Am J Gastroenterol.* – 2011. – Vol. 106, №12. – P. 2133-42. 4. Рулева Н.Ю., Звягинцева М.А., и др. Миелопероксидаза: биологические функции и клиническое значение // *Современные наукоемкие технологии.* – 2007. – № 8. – С. 11-14. 5. Lau D., Mollnau H., Eiserich J.P., et al. Myeloperoxidase mediates neutrophil

activation by association with CD11b/CD18 integrin // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2006. – Vol. 102, N 2. – P. 431-6. 6. Gorudko I.V., Cherenkevich S.N. New approaches to the measurement of the concentration and peroxidase activity of myeloperoxidase in human blood plasma // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry.* – 2009. – Т. 35, № 5. – С. 566-575. 7. Путников А. В., Голота Ю.В., Кришук А.Ю., и др. Микробиоценоз биопленки толстой кишки крыс в ранние сроки после введения цефтриаксона // *Медицинский академический журнал. Приложение.* – 2012. – С. 311-313. 8. Satoh H., Sato F., Takami K., Szabo S. New ulcerative colitis model induced by sulfhydryl blockers in rats and the effects of antiinflammatory drugs on the colitis // *Jpn J Pharmacol.* – 1997. – Vol 73, №4. – P. 299-309. 9. Pineton de Chambrun G.P., Torres J., Darfeuille-Michaud A., Colombel J.F. The role of anti(myco)bacterial interventions in the management of IBD: is there evidence at all? // *Dig Dis.* – 2012. – Vol.30, N 4. – P. 358-67. 10. Verdú E.F., Bercik P., Verma-Gandhu M., et al. Specific probiotic therapy attenuates antibiotic induced visceral hypersensitivity in mice // *Gut.* – 2006. – Vol. 55, № 2. – P. 182-90.

Надійшла до редколегії 12.12.12

УДК 578.833.2:616-097.001.11

Л. Беньковська, наук. співроб.

ХИБНОПОЗИТИВНІ РЕЗУЛЬТАТИ СЕРОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ГЕПАТИТУ С

Розглянуто головні напрямки серологічних та біохімічних досліджень при гепатиті С. Показано необхідність обстеження здорових осіб та хворих за різних патологічних станів на антитіла до гепатиту С(ГС) і біохімічні показники для ранньої діагностики ГС та попередження формування хронічних захворювань печінки.

Ключові слова: гепатит С, серологічні дослідження.

Рассмотрены основные направления серологических и биохимических исследований при гепатите С. Показана необходимость обследования здоровых лиц и больных при различных патологических состояниях на антитела к гепатиту С (ГС) и биохимические показатели для ранней диагностики ГС и предупреждения формирования хронических заболеваний печени.

Ключевые слова: гепатит С, серологические исследования.

Main directions of serological and biochemical researches are considered at hepatitis of C. The necessity of inspection of healthy persons and patients at a different pathology on antibodies to hepatitis C(HC) and biochemical indexes for early diagnostics of HC and warning of forming of chronic diseases of liver.

Keywords: hepatitis of C, serological researches.

Вступ. Гепатит С (ГС) є однією з найактуальніших проблем інфекційної патології людини та в цілому охорони здоров'я в усьому світі. Вірусом гепатиту С (HCV) в світі інфіковано близько 3% населення, і фактично мова йде про пандемію, яка за масштабами у 5 разів перевищує глобальну поширеність ВІЛ-інфекції. За підрахунками спеціалістів, в теперішній час у світі ВГС інфіковано від 500 млн. до 1 млрд. осіб [3,11]. За даними досліджень, проведених в Україні, наша країна відноситься до регіонів з відносно невисоким рівнем поширення ГС. [2,4].

Одним з важливіших напрямків боротьби з ГС є своєчасне виявлення інфікування, призначення в разі необхідності специфічної терапії та контроль її ефекти-

вності. Це ж є і однією з важливіших проблем, оскільки діагностика ГС на початкових стадіях гострого інфекційного процесу є скоріш винятком, ніж правилом. Крім того, для перебігу ГС притаманні різноманітні клінічні прояви, не завжди пов'язані з патологією печінки та інших органів гепатобіліарної системи – так звані позапечінкові прояви, спектр яких доволі широкий. Лабораторна діагностика включає специфічні (серологічні, молекулярно-біологічні), біохімічні, морфологічні та інші методи досліджень. Визначальними у етіологічній розшифровці діагнозу є специфічні методи, передусім, імуноферментний аналіз (ІФА) та полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). Незважаючи на те, що біохімічні

методи на сьогодні розглядають як орієнтуючі, накопичені факти свідчать про те, що використання у комплексі з серологічними звичайно прийняті у практиці клінічної лабораторної діагностики тестів (визначення в сироватці крові активності ферментів, кількості білкових фракцій тощо) допомагають у правильній постановці діагнозу, визначенні стадії хвороби, її прогнозу [5,6,7].

Сучасні тест-системи для серологічної та молекулярно-біологічної діагностики ГС володіють високими показниками чутливості та специфічності, проте не можуть гарантувати 100-відсоткову точність отриманих результатів дослідження. Зокрема, при роботі з тест-системами ІФА можуть реєструватися як хибнопозитивні, так і хибнонегативні реакції. Хибнопозитивні результати зумовлені неспецифічним зв'язуванням імуноглобулінів сироватки (плазми) крові з компонентами імуносорбенту тест-систем, що спостерігається при підвищеному рівні гама-глобуліну у сироватці (у хворих на ревматизм, деякі злоякісні захворювання тощо); при аутоімунних захворюваннях, патології сполучної тканини; при деяких інфекційних хворобах (гепатит В, туберкульоз та ін.) та в ряді інших випадків [8]. При одержанні лабораторних даних, які не збігаються з клінічною картиною захворювання, необхідно з'ясувати, як і чому виникають хибні результати при проведенні ІФА, причини та механізми які до цього призводять.

Метою роботи було визначення частоти хибнопозитивних реакцій при виявленні антитіл до HCV (анти-HCV) у пацієнтів за різних патологічних станів.

Матеріали і методи. Проведено дослідження на маркери інфікування HCV 1930 зразків сироваток крові, отриманих від пацієнтів які проходили диспансерне обстеження за клінічними та/або лабораторними показниками. У зразках сироваток визначали анти-HCV (сумарні); Для підтвердження первинно реактивних результатів застосовували виявлення спектру антитіл до окремих білків збудника – *core*, *NS3*, *NS4*, *NS5*. Сумарні антитіла визначали за допомогою тест-систем та реактивів "DIA-HCV" та "ИФА-АНТИ-HCV", антитіла до окремих специфічних білків HCV – діагностикумів "DIA-HCV-different" та "ИФА-АНТИ-HCV-СПЕКТР" виробництва АТЗТ НВК "ДіаПрофМед" (Україна) та НВО "Діагностичні системи" (Російська Федерація), відповідно.

При аналізі результатів серологічних досліджень цифрові дані виражали відносними величинами – $P \pm m_p$ (%); середню похибку та значимість відмінностей між показниками обчислювали за допомогою загально визнаних методів варіаційної статистики [1].

Результати та їх обговорення. Після проведення первинного серологічного обстеження методом ІФА 1930 диспансерних пацієнтів реактивними щодо наявності анти-HCV (сумарних) виявились 143 зразка їх сироваток – $(7,41 \pm 0,60)\%$. Для підтвердження позитивності отриманих результатів ІФА первинно реактивні зразки сироваток досліджували вдруге з визначенням анти-HCV до білків *core*, *NS3*, *NS4*, *NS5*. Критерієм підтвердження була позитивна реакція зразка сироватки принаймні з 2-ма специфічними білками HCV, за хибнопозитивні сироватки (ХПС) приймали зразки з негативним результатом тестування на весь спектр антитіл та сироватки, що не реагували в ІФА з 3-ма специфічними білками вірусу (відповідно до інструкцій виробників тест-систем). Після проведення підтверджувальних досліджень дійсно позитивними виявились 120 зразків сироваток, в той час як 23 з них були кваліфіковані як ХПС. Отже, за результатами первинного та верифікаційного досліджень остаточно частота виявлення анти-HCV у пацієнтів амбулаторно-поліклінічного відділення дорівнювала $(6,24 \pm 0,55)\%$, що в 1,2 разу менше, ніж за результатами первинного ІФА. Відсоток підтвердження первинно позитивних результатів дослідження склав $(83,9 \pm 3,07)\%$, відповідно, у $(16,1 \pm 3,06)\%$ випадків результати тестування виявились хибнопозитивними. Отримані дані співпадають з матеріалами [11,13], відповідно до яких серед імунокомпетентних осіб при рівні поширення HCV-інфекції до 10% (більшість "здорового" населення) пропорція хибнопозитивних результатів первинного серологічного тестування в середньому може складати 35%, коливаючись в межах від 15 до 60%.

Аналіз спектру антитіл в зразках сироваток з підтвердженням вмістом анти-HCV показав, що частота виявлення антитіл до окремих білків HCV була неоднаковою із з усіх можливих варіантів спектру антитіл відмічались лише 3 – *core*+*NS3*+*NS4*+*NS5*; *core*+*NS3*+*NS4*; *core*+*NS3* (табл. 1).

Таблиця 1. Результати виявлення спектру антитіл до різних антигенів HCV у пацієнтів амбулаторно-поліклінічного відділення з підтвердженими результатами наявності анти-HCV (n=120)

Варіанти спектру антитіл	Результати дослідження сироваток крові на наявність анти-HCV				Кількість зразків сироваток з даним спектром антитіл	
	<i>core</i>	<i>NS3</i>	<i>NS4</i>	<i>NS5</i>	Абс.	$P \pm m_p$ (%)
1	+	+	+	+	45	$37,5 \pm 4,42$
2	+	-	+	+	7	$5,83 \pm 2,14$
3	+	+	-	-	120	100

Отже, найчастіше серед серопозитивних осіб визначали антитіла до білків *core* та *NS3*, найбільший відсоток негативних результатів припадав на білок *NS5* – 68 (56,67%) з числа дійсно позитивних зразків сироваток крові не реагували з ним у підтверджувальному тесті. Обговорюючи отримані результати необхідно мати на увазі, що спектр анти-HCV може бути різним, залежно від періоду розвитку інфекційного процесу ГС. Зокрема, високий вміст анти-*NS3*, *NS4*, *NS5* частіше всього спостерігається в латентній фазі хронічного ГС (ХГС) та в фазі його реактивації [10]. Отже, отримані дані щодо серологічного профілю пацієнтів амбулаторно-поліклінічного відділення може свідчити на користь сформованого ХГС більше, ніж у третини обстежених осіб, які не знали про свій інфекційний статус. Треба зазначити, що першим на ранніх етапах сероконверсії

при HCV-інфекції з'являються анти-*core* і анти-*NS3*, в той час як анти-*NS4* та *NS5* – значно пізніше. Виходячи з викладеного, щоб своєчасно виявити інфекційний процес пацієнти, серонегативні щодо анти-*NS4* та анти-*NS5* потребують повторного обстеження на спектр антитіл, бажано за 2-3 тижні з подальшим моніторингом у динаміці. При аналізі результатів тестування на спектр анти-HCV ХПС встановлено, що 4 з них (17,39%) реагували з білком *core*, 1 (4,35%) – з *NS3*, 3 (13,04%) – з білком *NS4*.

В літературі існують данні, що підвищений рівень хибнопозитивних результатів виявлення анти-HCV відмічається при обстеженні хворих на онкологічні та аутоімунні захворювання, у пацієнтів з імунодефіцитними станами, хворих на сифіліс [8]. Аналізуючи результати медичної документації обстежених нами пацієнтів, зразки крові яких дали хибнопозитивні результати, вияви-

лось, вони частіше зустрічались в осіб, які мали гормональні порушення, пов'язані з такими патологічними станами як мастопатія, фіброміома, безпліддя, порушеннями функції щитоподібної залози (гіперплазія, вузловий зоб та аутоімунний тиреоїдит), хронічний панкреатит, холецистит, гастродуоденіт. Знаходячись під диспансерним спостереженням пацієнти поліклінічного відділення, раз на рік проходять обстеження всіх спеці-

алістів, у тому числі аналізуються результати загального та біохімічного аналізів крові. Проведено порівняння біохімічних показників (загальний, зв'язаний та вільний білірубін, активність аланін-амінотрансферази – АЛТ, аспартатамінотрансферази – АСТ та гамма-глутамілтранспептидази – ГГТП) у 50 пацієнтів з серологічними ознаками ГС та 17 осіб з хибнопозитивними результатами тестування на анти-HCV (табл. 2).

Таблиця 2. Біохімічні показники функцій печінки у пацієнтів з серологічними ознаками хронічного гепатиту С та в осіб з хибнопозитивними результатами виявлення анти-HCV

Відхилення у біохімічних показниках		Результати виявлення анти-HCV	
		Позитивні (n = 50)	Хибнопозитивні (n = 17)
Білірубін загальний	Абс.	17	7
	$P \pm m_p$ (%)	34,0 $\pm$ 6,7	41,2 $\pm$ 11,9
Білірубін зв'язаний	Абс.	14	6
	$P \pm m_p$ (%)	26,0 $\pm$ 6,2	35,3 $\pm$ 11,6
Білірубін вільний	Абс.	10	6
	$P \pm m_p$ (%)	20,0 $\pm$ 5,7	35,3 $\pm$ 11,6
АЛТ	Абс.	38	6
	$P \pm m_p$ (%)	76,0 $\pm$ 6,0	35,3 $\pm$ 11,6
АСТ	Абс.	35	7
	$P \pm m_p$ (%)	70,0 $\pm$ 6,5	41,2 $\pm$ 11,9
ГГТП	Абс.	24	7
	$P \pm m_p$ (%)	48,0 $\pm$ 7,0	41,2 $\pm$ 11,9

З наведених результатів видно, що у пацієнтів, хворих на ХГС спостерігається значно більше підвищення активності таких ферментів як АЛТ і АСТ, порівняно з особами з хибнопозитивними результатами тестування на анти-HCV: відповідно у 2,15 ($p < 0,05$) та 1,7 раз. Різниця між активністю ГГТП у вказаних пацієнтів виявлено не було, в той час як показники вмісту білірубину, навпаки, були вищими в осіб з ХПС. Таким чином, хоча зміни в активності печінковим ферментів спостерігаються далеко не у всіх хворих на ГС, одним з показників, які треба визначати є активність в сироватці крові АЛТ. При захворюваннях печінки і при підозрі на ХГС в першу чергу і найбільш суттєво змінюється активність АЛТ у порівнянні з АСТ. При гострій формі ГС, незалежно від його етіології, активність амінотрансфераз підвищується у всіх хворих. Особливо змінюється активність АЛТ, яка знаходиться в цитоплазмі, що сприяє швидкому виходу її з клітини і надходження в кров'яне русло, тому АЛТ являється більш чутливим тестом ранньої діагностики гострого ГС [9,12]. Що стосується пацієнтів із ХПС, то, незважаючи на нижчі, порівняно з хворими на ХГС показники активності печінкових ферментів, вони все ж таки збільшені відносно норми, що може свідчити на користь присутності ззовні безсимптомних активних запальних процесів в печінці і потребує подальшої верифікації діагнозу.

Для оцінки стадії та прогресування хвороби важливо також вираховувати коефіцієнт де Рітиса – співвідношення АСТ/АЛТ. В гострому періоді вірусного гепатиту при всіх формах, окрім тяжкої, співвідношення АСТ/АЛТ коливається від 0,55 до 0,65. Позитивне прогностичне значення має стійке визначення показників нижче 1,0, і, навпаки, тривале підвищення цього коефіцієнту до 1,0 і вище є несприятливою ознакою, котра може вказувати на прогресування процесу і можливість формування цирозу печінки (ЦП) [5,9]. З результатів біохімічних аналізів пацієнтів з ХПС, які мали відхилення у показниках активності АЛТ та АСТ, ми бачимо, що коефіцієнт де Рітиса загалом був значно нижчим за 1,0. І навпаки, у 30% пацієнтів інфікованих HCV цей коефіцієнт був вищим за 1,0, що може свідчити на користь прогресування фіброзу та бути побічною прогностичною ознакою можливості формування ЦП.

При гострих гепатитах активність ГГТП підвищується раніше, ніж активність АСТ і АЛТ. За результатами

наших спостережень, у 30% амбулаторних пацієнтів з хибно позитивними результатами виявлення анти-HCV активність ГГТП була підвищеною в середньому в 2 рази. Отже, біохімічні ознаки запалення печінки навіть на тлі хибних результатів тестування на наявність специфічних антитіл до HCV є показанням для рекомендації цим пацієнтам повторити обстеження через деякий час для уточнення діагнозу, оскільки, як відомо, серологічне вікно від моменту експозиції HCV до сероконверсії при дослідженні методом ІФА може тривати в середньому 82 дні – за різними даними від 54 до 193 днів [8].

Щодо підвищення кількості білірубину, то при вірусних гепатитах ступінь білірубінемії в деякій мірі корелюється з важкістю захворювання. Але треба мати на увазі, що ступінь підвищення білірубину в крові не завжди залежить від важкості патологічного процесу, а може бути обумовлена темпами розвитку хвороби. Варто пам'ятати, що ці біохімічні маркери неспецифічні для ГС, проте є показниками ураження печінки, глибини цього ураження і тривалості відновлюваного процесу [9].

Таким чином можна зробити наступні **висновки**: при визначенні серологічних маркерів HCV-інфекції методом ІФА необхідно проводити підтверджувальні дослідження з метою уникнення хибнопозитивних результатів тестування, особливо для осіб, які не належать до груп високого поведінкового ризику інфікування і обстежуються за клінічними показаннями через наявність будь-якої соматичної патології. Визначення антитіл до окремих білків HCV є необхідною складовою специфічної діагностики ГС. Крім того, оцінка спектру анти-HCV може бути корисною в плані встановлення клінічного діагнозу та прогнозування перебігу хвороби, і виявлення антитіл до окремих білків збудника – варто здійснювати у динаміці. Найбільш інформативними, з позиції підтвердження результатів скринінгу пацієнтів, які знаходились під диспансерним наглядом за різних патологічних станів, є антитіла до поверхневих білків HCV і саме тести, які спроможні визначати, зокрема анти-NS5. З метою ранньої діагностики ГС до алгоритму обстеження пацієнтів, які знаходяться під диспансерним спостереженням, визначення в сироватці крові біохімічних показників (білірубін, АЛТ, АСТ, ГГТП), як мінімум, раз на рік.

Список використаної літератури. 1. Антомонов М.Ю. Математическая обработка и анализ медико-биологических данных / Михаил Юрье-

вич Антомонов. – К., 2006. – 558 с. 2. Ворожбит О.Б. Проблема позапечіно-кових уражень при хронічному гепатиті С // Практична медицина. – 2003. – №3. – С. 97-101. 3. Вовк А.Д., Соляник І.В., Матяш В.І., Ясеновий С.П. Вітчизняний препарат ербісол ультрафарм в лікуванні хворих на хронічний гепатит С. // Журн. Сучасні інфекції, №2, 2005, С. 63-70. 4. Гураль А.Л., Марієвський В.Ф., Сергеева Т.А. і др. Характеристика і тенденції розвитку епідемічного процесу гепатита С в Україні / А// Профілактична медицина. – 2011. – №1(13). – с. 9-18. 5. Громашевська Л.Л., Гураль А.Л., Марієвський В.Ф., Вовк А.Д., Сергеева Т.А., Шагінян В.Р., Матяш В.І. Гепатит С: епідеміологія, діагностика, клініка, лікування (методичні рекомендації, 2 видання) // Київ, 2007. – 34 с. 6. Громашевська Л.Л. Діагностика хронічного гепатита С: біохімічні дослідження // Лаб. Діагностика. 2003. №4. – С. 9-13. 7. Гураль А.Л. Гепатити В і С: проблеми епідеміології / Здоров'я України. – 2007. – №10. – С. 30-31. 8. Михайлов М.І. Лабораторна діагностика гепатита С (се-

рологічні маркери і методи їх виявлення) / Вирусні гепатити: досягнення і перспективи. – 2001. – № 2. – С. 8-18. 9. Назаренко Г.І., Кишкун А.А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований // М.: "Медицина", 2000. – С. 163-168. 10. Круглов И.В., Огиенко О.Л., Знойко О.О. и др. Исследование сероконверсии к различным антигенам вируса гепатита С у больных гепатитом С с различными исходами // Вопр. вирусол. – 2003. – № 2. – С. 36-40. 11. Ansari M.H.K., Omrani M.D. Evaluations of diagnostic value of ELISA method (EIA) & PCR in diagnosis of hepatitis C virus in hemodialysis patients // Hepatitis Monthly. – 2006. – Vol. 6, №1. – P. 19-23. 12. Marcellin P. Hepatitis B and Hepatitis C in 2009 / Patrick Marcellin // Liver Int. – 2009. – V. 29. – № 1. – P. 1-8. 13. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus // MMWR Morbid Mortal Wkly Rep. – 2003. – Vol. 52 (RR03). – P. 1-16.

Надійшла до редколегії 22.11.12

УДК 504.054:574.3

О. Абдулосва, канд. біол. наук, Н. Карпенко, канд. біол. наук

ПОКАЗНИКИ ІНВАЗІЙНОГО ПОТЕНЦІАЛУ ЧУЖИННИХ РОСЛИН ЯК ОСНОВА ПРОЦЕДУРИ ОЦІНКИ РИЗИКУ

На підставі аналізу показників фітобіології та популяційної біології відомих інвазійних рослин в Україні запропоновано 13 загальних критеріїв оцінки інвазійного потенціалу видів чужинних рослин. Наведені характеристики проявів (станів) цих показників, що можуть відображати високий рівень ризику інвазії певного виду чужинних рослин у напівприродній та природній екосистемі.

Ключові слова: інвазійний потенціал, фітоінвазії.

На основании анализа показателей фитобиологии и популяционной биологии известных инвазивных растений в Украине предложено 13 общих критериев оценки инвазивного потенциала видов чужеродных растений. Приведенные характеристики проявлений (состояний) этих показателей, могут отражать высокий уровень риска инвазии определенного вида чужеродных растений в полуприродные и природные экосистемы.

Ключевые слова: инвазийный потенциал, фитоинвазии.

Following the analysis of 13 features of life biology and population ecology of invasive alien plants in Ukraine there were chosen some invasiveness criteria. Invasiveness criteria display an invasion risk level of the given alien plant species in seminatural and natural ecosystems of the second, derivative areal.

Keywords: invasiveness criteria, fитоinvasii.

Вступ. За визначенням Р.І. Бурди, В.Придатка [4], нами дещо видозміненим, інвазійний потенціал, або інвазійна спроможність (англ. "invasiveness", "invasibility") – це здатність чужинних видів розповсюджуватись у нових для них місцевих умовах, створювати стійкі місцеві популяції, пристосовані до абіотичних, біотичних і антропогенних чинників порушених чи природних фітоценозів або, у кінцевому рахунку, – до умов місцезростання в цілому. Адвентивні рослини починають вважати інвазійними з моменту, коли відмічаються факти їх успішної натуралізації, тобто здичавіння і розмноження у напівприродних і природних умовах та розширення вторинного ареалу. Проте, ще до моменту успішної натуралізації популяціям чужинного виду вже притаманні ознаки, які обумовлюють інвазію.

Метою роботи було визначити загальні критерії оцінки інвазійного потенціалу видів чужинних рослин для оцінки ризику їх фітоінвазії.

Матеріал і методи. Основою послужили списки видів особливо небезпечних інвазійних рослин України [2] та видів, що проявляють інвазійну спроможність, відомості про їхню фітобіологію та еколого-ценотичну приуроченість [1, 3, 5].

Вибір ознак, а також оцінка рівня загрози здійснювалися на підставі вивчення ознак та їхніх проявів у будові, біоморфології, біології розмноження, екології популяції небезпечних інвазійних чужинних рослин, поширених в Україні, а також відомостей про екологію інвазійних рослин у літературі [1-5]. Для кожної ознаки-критерію розроблений робочий варіант проявів, які вказують на інвазійну спроможність: якщо максимально можлива кількість балів для ознаки – 5, то за цією ознакою є 5 проявів високої інвазійної спроможності. Показник інвазійності (далі – ПІ) чужинного виду рослин наведено у відсотках від максимально можливого значення суми балів за всіма обраними критеріями.

Результати та обговорення. Показниками інвазійності є певні ознаки онтогенезу та екології чужинних видів, сприятливі для перебігу інвазійного процесу та успішної акліматизації в умовах вторинного ареалу в Україні. До цих показників-критеріїв належать:

1) Первинний географічний та екологічний ареали. Види "чорних списків" Європи походять переважно з Північної Америки, частіше – її східної частини; на другому за чисельністю місці – донорські ареали Східної Азії, зокрема, Японія, Корея, Китай. В окремих випадках рослини занесені з тропічної і субтропічної Америки та Кавказу. За часом занесення, інвазійні рослини "чорних списків" – неофіти, занесені в Україну протягом останніх 200 років. Окрема група загрозливих чужинних видів – гібридогенні, інвазії яких є наслідком гібридизації в Європі видів походженням із вище вказаних ареалів.

2) Ступінь спорідненості із флорою регіону вторинного ареалу. Чим більш екзотичні для місцевої флори роди і родини чужинних рослин, тим вища ймовірність інвазії, порівняно з чужинними таксонами, тісно спорідненими з природною флорою. Проте на особливому становищі у списку тривожних чужинних рослин – родина Asteraceae як найчисленніша група інвазійних видів, серед яких чимало знаходяться у стані експансії.

3) Пластичність морфологічної будови (морфологічна пластичність). Відомо, що адвентивні рослини у нових умовах виявляють більшу амплітуду норми реакції багатьох ознак, порівняно зі стабілізованими популяціями в умовах первинного ареалу. З популяційних досліджень деяких інвазійних рослин (*Xanthium albinum* (Widd.) H. Scholz, *Acer negundo* L.) помітно, що коефіцієнт варіації морфологічних ознак вегетативних і репродуктивних органів в межах популяцій не нижче 30%, а у більшості випадків – більше 60%. Значна фенотипна мінливість може корелювати з вищою генотипною мінливістю у вторинному, інвазійному ареалі у Європі, порівняно з регіоном природного поширення.

4) Пластичність у життєвій формі та та феноритмитах (біоморфологічна). Можуть мати місце прояви значної мінливості у життєвій формі, ритмах проходження фенофаз та життєвого циклу. Крім того, сюди ж ми ще зараховуємо швидкі ростові процеси.

5) Пластичність у розмноженні. Дуже важливим проявом адаптацій є пластичність у схожості насіння: наявність різних форм схожості, різні строки схожості під дією різних температурних градієнтів у різних фракціях насіння та в різних популяціях, тривала життєздатність насіння.

6) Екологічна універсальність, тобто широкий спектр умов, до яких здатен пристосуватись чужинний вид, аби підтримувати належну життєвість особин у різних вікових станах в різних місцезростаннях.

7) Здатність до проявів різних еколого-фітоценотичних стратегій (пристосування, пов'язані зі швидким захопленням порушеної території, її стійким утриманням та переживанням несприятливих умов).

8) Висока щільність та продуктивність біомаси популяцій. Усі небезпечні інвазійні рослини створюють непосильні умови конкуренції завдяки особливостям вегетативного розвитку та ослабленню механізму біотично залежної регуляції щільності власних популяцій: вони здатні дружно проростати і рости, здатні формувати щільні зімкнені куртини чи суцільні зарості, з дуже густою надземною фітомасою та інтенсивною листовою мозаїкою (водні інвазійні рослини, *Impatiens* sp., *Reynoutria* sp., *Partenocissus* sp. та ін.). У дуже щільних популяціях інвазійних рослин зберігається здатність особин до ефективних вегетації, цвітіння і плодоношення (*Helianthus subcanescens* (A. Gray) E.E. Wats., *Helianthus tuberosus* L., *Amorpha fruticosa* L., *Ambrosia artemisiifolia*, *Impatiens parviflora* DC.). В умовах помірного притінення може спостерігатися посилений ріст в довжину; за механічних пошкоджень – посилене відростання пагонів і галузень (*Oenothera* sp., *Partenocissus* sp., *Ambrosia artemisiifolia*).

9) Гіперпродуктивність діаспор вегетативного чи генеративного походження. Одна рослина небезпечного карантинного бур'яну *Ambrosia artemisiifolia* може продукувати до 40 тис. насінин, а окремі екземпляри – навіть до 100 тис. насінин.

10) Наявність самосіву у популяціях як результату генеративного розмноження – одна з найпевніших ознак успішного завершення акліматизації і високої ймовірності дичавіння.

11) Здатність порушувати механізми екологічного гомеостазу, а саме: а) зниження напруженості біотичної конкуренції за рахунок аллопатичної активності [6]; б) відбирання валової частки провідних ресурсів, механічного перешкодження розмноженню інших видів; в) зміна (трансформація) екологічного режиму місцезростання, тобто прояви ознак рослин-трансформерів: зміна режимів затінення [6], азотного живлення, продукції гумусу за рахунок опадів, проточності у водоймах, алювіально-делювіальних процесів у субстраті.

В умовах ботанічних садів високу аллопатичну активність за водорозчинними фракціями проявляють *Rhus typhina* L., *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle, *Aesculus hyppocastanum* L., *Phellodendron amurense* Rupr., *Physocarpus opulifolius* (L.) Maxim., *Robinia pseudoacacia* L., *Acer negundo*, *Elaeagnus angustifolia* L., *Quercus borealis* Michx., *Cotoneaster lucida* Schlecht., *C. horizontalis* Decne., *Amelanchier alnifolia* (Nutt.) Nutt. ex M. Roem., *A. canadensis* (L.) Medik., *Padus pensylvanica* (L. fil.) Sokolov, *P. virginiana* (L.) Roem.; середньоактивний аллопат – *Mahonia aquifolium* Nutt., малоактивний у кореневих виділеннях, але активний у летких виділеннях листків – *Amorpha fruticosa* L. Також встановлено явище збільшення кількості метаболітів, що виділяються рослинами, зі зміною умов до більш несприятливих. Сильний аллопат і *Acroptilon repens* (L.) DC.

12) Відсутність біотичних факторів – шкідників та хвороб, які істотно обмежують популяції виду в умовах вторинного ареалу.

13) Lag-період, тривалість якого звичайно пов'язана з корисними гено- та фенотипними змінами, які призводять до акліматизації в нових умовах [5]. В табл. 1 подано схему підрахунку значення показника інвазійності (далі – ПІ) певного виду за обраними критеріями наведеної у табл. 1.

Таблиця 1. Оцінка інвазійності *Phytolacca americana* L. (родина Phytolaccaceae)

№ ознаки*	Відомості про вид в Україні	Оцінка в балах/максимально можлива кількість балів
1	Північна Америка. Визнаний небезпечним інвазійним у Великобританії, Угорщині, Російській Федерації	2/4
2	Вид екзотичної родини	1/2
3	Не оцінювалося	–/3
4	Багаторічна кореневищна рослина-полікарпик; пізні строки генеративних фенофаз, відносно пізніе дозрівання плодів; швидкоросла рослина	3/5
5	Поліхорна рослина	1/4
6	Колоніфіт; в інших країнах Європи трапляється в антропогенних і напівприродних місцезростаннях, наприклад, на узліссях; на багатих вологих ґрунтах	1/3
7	Проявляє властивості виду-рудерала та конкурента	1/2
8	Потужна надземна вегетативна біомаса, велика площа листової поверхні (такі види частіше стають інвазійними у вологих місцезростаннях)	1/3
9	Рясне плодоношення; добре вегетативне розмноження	2/3
10	Самосів спостерігається (Житомирська, Київська обл.)	1/1
11	Потужний затіювач; утворює рясний щорічний опад з надземної біомаси	2/5
12	Діаспори розносяться багатьма загальнопоширеними агентами (птахи та ін.)	1/2
13	Спрямовані інтродукція у Європі з 19 ст. [7]. Lag-період в Україні 50-100 років	2/2
Показник інвазійності, всього у балах / відсотках від максимально можливої суми балів		18 / 46%

Оцінка модельного виду *Phytolacca americana* показала, що даний вид можна вважати тривожним чужинним видом в Україні (ПІ – в межах 40-60%). Проведена попередня оцінка інвазійного потенціалу деяких нині експан-

сивних інвазійних рослин показала, що ПІ таких видів, як *Acer negundo* L., *Robinia pseudoacacia* L., складає 80-100%, і групу таких рослин обрано за клас видів з доведеним високим рангом інвазійності та загрози.

Висновки. В основу надійних критеріїв інвазійного потенціалу покладені ознаки фітобіології та екології, характерні для видів інвазійних рослин з визначеним високим рангом інвазійності. Оцінку інвазійності як перший етап оцінки ризику фітоінвазій можна проводити за 13 критеріями. Значення показника інвазійності можна поділити на кілька класів, кожен з яких означає певний ранг інвазійності, тобто рівень ризику виду рослин стати інвазійним чи рівень загрози від його інвазій.

Список використаної літератури. 1. Абдулова О.С., Карпенко Н.І. Трапляння чужинних інвазійних рослин в синтаксонах рослинності України // Чорномор. ботан. журн. – 2009. – 5, №2. – С. 189-198. 2. Абдулова О.С., Карпенко Н.І., Сенчило О.О. Обґрунтування "чорного списку" загрозливих для біорізноманіття інвазійних видів рослин України // Вісн. Київськ. нац. ун-ту. Сер. Біологія. – К., 2008. – Вип. 52-53. –

С. 106-107. 3. Бурда Р.І., Придатко В.І. Стан видів: чужорідні й інвазійні види (рослини) // Агробіорізноманіття України: теорія, методологія, індикатори, приклади. – К.: ЗАТ "Нічлава", 2005. – Кн. 1. – С. 271-276. 4. Протопопова В.В., Мосякін С.Л., Шевера М.В. Фітоінвазії в Україні як загроза біорізноманіттю: сучасний стан і завдання на майбутнє. – Київ: Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України, 2002. – 32 с. 5. Kowarik I. Time lags in biological invasions with regard to the success and failure of alien species. // Plant Invasions, General Aspects and Special Problems / Eds. Pyšek P., Prach K., Rejmánek M., Wade M. – SPB Academic Publishers, 1995. – P. 15-38. 6. Radoševich S.R. (2007 onwards). Plant Invasions and Their Management. / Invasive Plant Management: CIPM Online Textbook. Chapter 3. – Bozeman, MT: Center for Invasive Plant Management. <http://www.weedcenter.org/textbook/index.html> (accessed Sept. 8, 2008). 7. Yavorska O. New records of some alien plants in the Kyiv urban area / Vysnyk of Lviv Univ. Biology series. – 2008. – Is. 48. – P. 44-48.

Надійшла до редколегії 05.12.12

УДК 616.33-008.821.14+577.151.042+571.27

С. Пилипенко, канд. біол. наук, О. Короткий, канд. біол. наук, Я. Максимович, канд. біол. наук, Т. Берегова, д-р біол. наук, Л. Остапченко, д-р біол. наук

ВПЛИВ МУЛЬТИПРОБІОТИКА "АПІБАКТ" НА АКТИВНІСТЬ СИНТАЗИ ОКСИДУ АЗОТУ ТА ВМІСТ НІТРИТ-ІОНІВ У ТИМОЦИТАХ І СПЛЕНОЦИТАХ ЩУРІВ ЗА УМОВ ТРИВАЛОЇ ШЛУНКОВОЇ ГІПОАЦИДНОСТІ

Встановлено значне зростання активності синтази оксиду азоту та вмісту нітрит-іонів у тимоцитах і спленоцитах щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю, викликану 28-добовим введенням омепразолу. Введення мультипробіотика "Апібакт" викликає незначне збільшення NO-синтазної активності та вмісту нітрит-іонів у спленоцитах інтактних щурів. Показано, що одночасне введення омепразолу та "Апібакту" зменшує активність синтази оксиду азоту та вміст нітрит-іонів у спленоцитах щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю порівняно з групою тварин, яким вводили лише омепразол.

Ключові слова: мультипробіотик Апібакт, Омепразол, шлункова гіпоацидність, NO-синтазна активність, оксид азоту, вміст нітрит-іонів.

Установлено значительное повышение активности синтазы оксида азота и содержания нитрит-ионов в тимоцитах и спленоцитах крыс с длительной желудочной гипoaцидностью, вызванной 28-суточным введением омепразола. Введение мультипробiotика "Апибакт" вызывает незначительное увеличение NO-синтазной активности и содержания нитрит-ионов в спленоцитах интактных крыс. Показано, что одновременное введение омепразола и "Апибакта" уменьшает активность синтазы оксида азота и содержание нитрит-ионов в спленоцитах крыс с длительной желудочной гипoaцидностью по сравнению с группой животных, которым вводили только омепразол.

Ключевые слова: мультипробіотик Апибакт, Омепразол, желудочная гипoaцидность, NO-синтазная активность, оксид азота, содержание нитрит-ионов.

It was determined significant increase of nitric oxide synthase activity and nitrite ion level in thymocytes and splenocytes of rats with long-term gastric hypoauidity caused by 28-daily injection of omeprazole. The injection of multiprobiotic "Apibact" evokes minor increase of NO-synthase activity and nitrite ion level in splenocytes of intact rats. It was shown that simultaneously injection of omeprazole and "Apibact" caused the decrease of nitric oxide activity and nitrite ion level in splenocytes of rats with long-term gastric hypoauidity compared with the group of animals injected only omeprazole.

Keywords: multiprobiotic Apibact, Omeprazole, gastric hypoauidity, NO-synthase activity, nitric oxide, nitrite ion.

Вступ. Тривале зниження шлункової секреції соляної кислоти призводить до розвитку гіпергастринемії [13] та порушення мікробіоценозу в травному тракті, оскільки кисле середовище є одним з найголовніших неспецифічних факторів захисту проти бактеріальної інфекції [27]. В свою чергу, дисбактеріоз і гіпергастринемія можуть викликати розвиток запальних реакцій в організмі з активним залученням імунної системи. В попередніх наших дослідженнях показано, що тривала шлункова гіпоацидність, викликана введенням блокатора протонної помпи – омепразола, спричиняє не лише порушення мікробіоценозу в шлунку та гіпергастринемію, а й підвищення концентрації в сироватці крові прозапальних цитокинів: ІЛ-1 β , ФНП- α і ІФН- γ [14], які є одними з основних активаторів продукції оксиду азоту (NO) [31].

NO – регуляторна молекула, яка синтезується майже всіма імункомпетентними клітинами та вважається універсальним медіатором імунної системи [3]. Загальновідомо, що NO відіграє одну з основних ролей у механізмах неспецифічного імунного захисту, забезпечуючи фагоцитоз за участі нейтрофілів і макрофагів та прозапальних цитокинів. ІФН- γ , ФНП- α та ІЛ-1 індукують синтез NO не лише в макрофагах, а й в інших імункомпетентних клітинах, в тому числі спленоцитах і тимоцитах [16, 18]. Крім участі у протинфекційному захисті, NO приймає участь у регуляції певних процесів розвит-

ку гуморальної та клітинної імунної відповіді за рахунок впливу на Т-хелпер1/Т-хелпер2 баланс [26], який порушується під час запалення. Залежно від типу та фази запальної реакції NO може відігравати роль як протизапального, так і прозапального фактора [17]. Це пов'язано з тим, що розвиток запалення детермінується генерацією NO, який синтезується індукційною синтазою оксиду азоту (iNOS). В той же час NO-синтаза (NOS) контролює біосинтез інтерлейкінів ІЛ-4, ІЛ-11, ІЛ-13, які відносяться до інгібіторів запальної реакції [6]. Уявлення про подвійну роль NO в розвитку запалення базуються на результатах, отриманих на різних експериментальних моделях, включаючи досліди на тваринах, у яких відсутній кодуючий iNO-синтазу ген [32].

Для корекції та лікування хронічних запальних та інфекційних захворювань шлунково-кишкового тракту зазвичай використовують пробіотики. Пробіотичні мікроорганізми (м/о) не лише нормалізують мікрофлору травного тракту, але й здатні впливати на імунні реакції, виявляти антиканцерогенні й антимутагенні властивості, тощо [13]. Проте, незважаючи на активне дослідження впливу пробіотиків на різні патологічні процеси, механізми їх дії за умов тривалого гіпоацидного стану залишаються нез'ясованими. Серед широкого арсеналу пробіотичних продуктів нашу увагу привернув "Апібакт" (АП), який належить до мультипробіотиків групи "Сим-

бітер". На відміну від інших пробіотиків, мультипробіотики групи "Симбітер" містять біомасу живих клітин багатокомпонентного симбіозу пробіотичних м/о (біфідобактерій, лактобацил, лактококів, пропіоновокислих та оцтовокислих бактерій) та їх біологічно активних метаболітів (вітаміни, коротколанцюгові жирні кислоти, полісахариди та ін.). Мультипробіотик АП крім пробіотичних м/о містить також екстракт прополісу з масовою часткою 2,5 %. Сьогодні доведено, що прополіс є природним антисептиком, який також володіє імуностимулюючими, протизапальними та антиоксидантними властивостями [15, 25, 27]. Незважаючи на значні успіхи у вивченні біохімічних механізмів дії NO, залишаються не з'ясованими рівень його продукції, функції в тимусі та селезінці під час розвитку запалення та порушення мікробіоценозу в травному тракті на фоні тривалої шлункової гіпоацидності, в тому числі й за умов введення мультипробіотика "Апібакт".

Метою роботи було визначити активність синтази оксиду азоту та вміст нітрит-іонів у тимоцитах і спленоцитах щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика АП.

Матеріали та методи. Дослідження проведені на білих нелінійних щурах з початковою вагою 160-180 г, які рандомізовано були розділені на чотири групи по 10 тварин в кожній. Маніпуляції з тваринами та їх утримання в віварії здійснювались згідно міжнародних рекомендацій та національного законодавства про проведення медико-біологічних досліджень [33].

Контрольним щурам (I група) упродовж 28 діб вводили 0,2 мл внутрішньочеревинно (в/о) та 0,5 мл перорально воду для ін'єкцій. Другій групі тварин перорально вводили мультипробіотик АП (виробництва ТОВ "О.Д.Пролісок", Україна) в дозі 0,14 мл/кг, розчинений у 0,5 мл води для ін'єкцій. Гіпоацидний стан у щурів (III група) моделювали щоденним введенням протягом 28 діб омепразолу (ОМ) (виробництва "Sigma-Aldrich", США), який є блокаторм H^+-K^+-ATF ази – ключового ферменту секреції соляної кислоти парієтальними клітинами шлунку. ОМ вводили в/о один раз на добу в дозі 14 мг/кг, який був розчинений у 0,2 мл води для ін'єкцій. Щурам IV групи одночасно з введенням ОМ вводили мультипробіотик АП в дозі 0,14 мл/кг, розчинений у

0,5 мл води для ін'єкцій. За добу до проведення експерименту тварини отримували лише воду.

Експериментальних тварин умертвляли методом дислокації шийних хребців через добу після останнього введення препаратів, вилучали тимус і селезінку. Клітинну суспензію лімфоцитів з тимуса та селезінки отримували шляхом виділення в градієнті щільності Ficoll-Paque ("Sigma-Aldrich", США) за методом [4]. Життєздатність отриманих лімфоїдних клітин оцінювали за методом [35]. Кількість живих клітин більше 80% вважалась задовільною. В отриманих клітинних суспензіях тимоцитів і спленоцитів визначали спектрофотометрично активність синтази оксиду азоту за методом [11], який полягає у визначенні приросту продуктів аеробного окислення NO. Вміст нітрит-іонів вивчали за методом Гріса з модифікаціями, як рекомендовано [10]. Статистичну обробку результатів досліджень з використанням критерію Стюдента для оцінки достовірності проводили за допомогою програми Statistica 7.0. Відмінності вважали достовірними при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Відомо, що в імунних клітинах NO виконує регуляторні та сигналтрансдукуючі функції переважно шляхом ковалентної модифікації сірки, яку вміщує цистеїн білків, з утворенням S-нітрозотіолів. NO активно приймає участь у процесах проліферації, диференціації, апоптозу макрофагів, тимоцитів, лімфоцитів, ендотеліальних клітин і взаємодії між імунними та іншими клітинами [8]. Встановлено також, що NO є важливим фізіологічним регулятором функцій T-клітин [20]. NO і ONOO⁻, які утворюються при активації індукційної ланки синтезу NO, можуть взаємодіяти з багатьма білками та ферментами, що є важливими для передачі сигналів і життєдіяльності клітин. Крім того, показано, що NO і S-нітрозоглутатіон відіграють важливу роль в індукції апоптозу тимоцитів, пов'язаного з їх негативною селекцією [1, 7].

В тимоцитах інтактної групи тварин активність NOS становила $1,31 \pm 0,11$ нмоль $NO_2/xv \times mg$ білка, а вміст одних із основних метаболітів NO – нітрит-іонів складав $0,45 \pm 0,035$ нмоль/мг білка (рис. 1). В спленоцитах щурів даної групи активність NOS становила $4,5 \pm 0,41$ нмоль $NO_2/xv \times mg$ білка, а вміст нітрит-іонів – $2,95 \pm 0,25$ нмоль/мг білка (рис. 2).

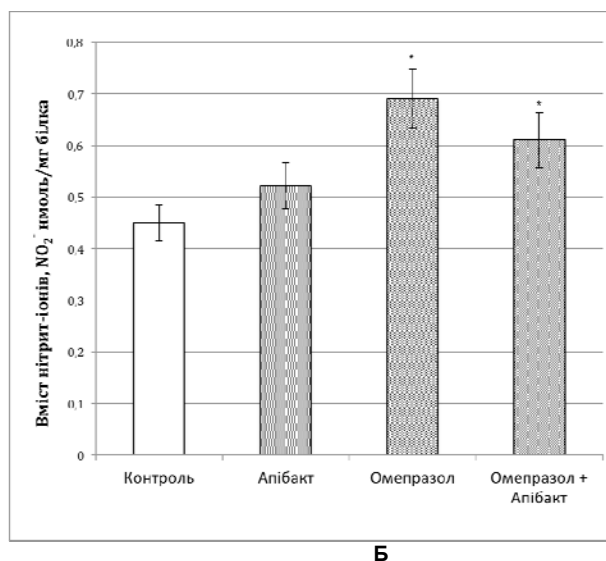
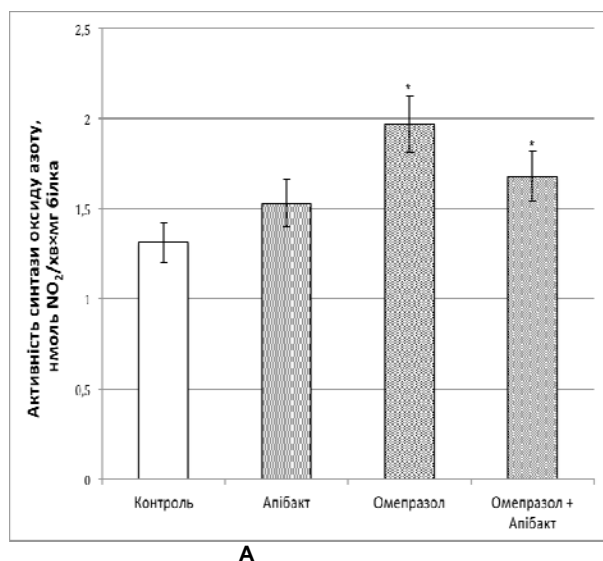


Рис. 1. Активність синтази оксиду азоту (А) та вміст нітрит-іонів (Б) в тимоцитах щурів з тривалою гіпоацидністю шлункового соку та за умов введення мультипробіотика ($M \pm m$, $n=10$)

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем

Введення мультипробіотика АП інтактним щурам викликало в тимocyтах (рис. 1) і спленоцитах (рис. 2) підвищення активності NOS на 17% і 44% ($p < 0,05$) відповідно, порівняно з контролем. Вміст нітрит-іонів у даній групі тварин зростає порівняно з контролем на 16% і 24% ($p < 0,05$) у тимocyтах і спленоцитах відповідно. Збільшення рівня продукції NO в лімфоїдних клітинах тимусу та селезінки корелює з зафіксованим нами в попередніх дослідженнях збільшенням вмісту інтерферону в культуральному середовищі тимocyтів і спленоцитів [28], який є індуктором iNOS [31]. Крім того, вищий рівень активності NOS в спленоцитах, ніж в тимocyтах,

ймовірно, пов'язаний з антигенпрезентацією в селезінці фагоцитованих антигенів пробіотичних мікроорганізмів АП, адже відомо, що фагоцити є продуцентами найбільшої кількості NO [34].

Посилення продукції NO в лімфоїдних клітинах щурів при введенні мультипробіотика АП може свідчити про імуномодуючі властивості цього препарату, які можуть бути пов'язані як із здатністю пробіотичних м/о АП викликати на себе імунну відповідь, так і з дією прополісу. Як відомо, прополіс володіє широким спектром імуномодуючої дії та здатен регулювати ріст і функції імунокомпетентних клітин [19, 24].

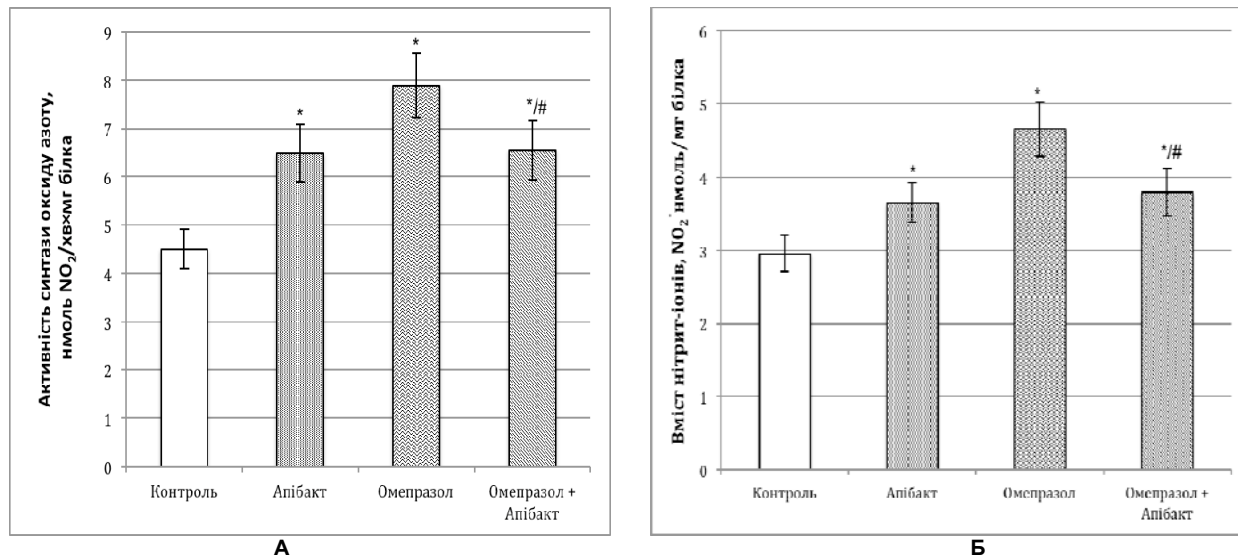


Рис. 2. Активність синтази оксиду азоту (А) та вміст нітрит-іону (Б) в спленоцитах щурів з тривалою гіпоацидністю шлункового соку та за умов введення мультипробіотика (M±m, n=10)

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем; # – $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили омепразол

28-добове пригнічення шлункової секреції соляної кислоти, викликане введенням ОМ, призводило до значного зростання порівняно з контролем в лімфоїдних клітинах тимусу (рис. 1.) і селезінки (рис. 2.) активності NOS на 50% ($p < 0,05$) і 75% ($p < 0,05$) відповідно. Вміст нітрит-іонів за даних умов зростає на 53% ($p < 0,05$) і 58% ($p < 0,05$) відповідно в тимocyтах і спленоцитах експериментальних щурів порівняно з контролем.

Аналіз отриманих результатів по дослідженню активності NOS та вмісту нітрит-іонів дозволив встановити суттєве збільшення вмісту NO в тимусі та селезінці щурів за умов розвитку порушень мікробіоценозу в травному тракті на фоні 28-добової шлункової гіпоацидності. Встановлений ефект може бути обумовлений декількома причинами. По-перше, збільшення рівня NO в тимocyтах і спленоцитах може бути пов'язане з активацією імунної відповіді та запальних процесів з метою елімінації чужорідних антигенів мікроорганізмів, які активно розмножуються в травному тракті за умов зниженої кислотності в шлунку [27]. По-друге, за даних умов, ймовірно, може відбуватися активація клітинної ланки імунітету, адже NO вибірково здатен посилювати проліферацію Т-хелперів1 [21], активацію Т-клітин та регулювати продукцію цитокінів [12, 20]. Додатковим доказом активації клітинно-опосередкованої імунної відповіді за даних умов також може бути зафіксоване нами в попередніх дослідженнях зростання рівня ІФН- γ в сироватці крові [29], продукції ІФН клітинами досліджуваних лімфоїдних органів [28] і відносного вмісту лімфоїдних клітин в тимусі [30]. Внаслідок цього може відбуватися

посилення проліферативних процесів у тимусі для залучення нових Т-лімфоцитів у імунну відповідь, що зазвичай, також супроводжуються збільшенням рівня NO-індукованого апоптозу, за допомогою якого гинуть Т-лімфоцити під час негативної селекції [7]. По-третє, збільшення рівня продукції NO в тимусі та селезінці щурів може бути пов'язане з розвитком імунної дисфункції за умов розвитку запалення [22], в тому числі й внаслідок дії ОМ, який, як відомо, здатен пригнічувати функції імунних клітин [5]. Крім того, збільшення продукції NO в даній групі тварин, може впливати на рівень активності лімфоцитів за допомогою зворотних порушень в Jak3/STAT5 сигнального шляху [2].

Введення мультипробіотика АП щурам разом з ОМ також спричиняло підвищення порівняно з контролем відповідно в тимocyтах (рис. 1.) і спленоцитах (рис. 2.) активності NOS на 28% ($p < 0,05$) і 46% ($p < 0,05$) та вмісту нітрит-іонів на 36% ($p < 0,05$) і 28% ($p < 0,05$). Але в спленоцитах порівняно з групою тварин з гіпоацидним станом ці показники були відповідно нижчими приблизно на 20% ($p < 0,05$) та достовірно не відрізнялись від показників у групі щурів, яким вводили лише АП.

Введення мультипробіотика АП за умов тривалої шлункової гіпоацидності запобігає розвитку дисбіотичних змін в шлунку та товстому кишечнику, а також зменшує запальний процес, і як наслідок – знижує надлишкову продукцію NO в тимусі та селезінці експериментальних тварин.

Висновки. Оксид азоту, який продукується тимocyтами та спленоцитами щурів за умов тривалої шлункової гіпоацидності та введення мультипробіотика АП,

може приймати активну участь у нітрооксидзалежних механізмах протиінфекційної резистентності, регуляції імунних реакцій та реалізації NO-залежних ефектів у клітинах імунної системи організму.

Список використаної літератури. 1. Benhar M. A central role for S-nitrosylation in apoptosis / Benhar M., Stamler J.S. // *Nat Cell Biol.* – 2005. – Vol.7. – P.645-646. 2. Bingisser R.M. Macrophage-Derived Nitric Oxide Regulates T Cell Activation via Reversible Disruption of the Jak3/STAT5 Signaling Pathway / Bingisser R.M., Tilbrook P.A., Holt P.G., Kees U.R. // *The Journal of Immunology.* – 1998. – Vol.160. – P.5729-5734. 3. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response / C. Bogdan // *Nat Immunol.* – 2001. – Vol.2. – P.907-916. 4. Boyum A. Separation of lymphocytes, lymphocyte subgroups and monocytes: a review / Boyum A. // *Lymphology.* – 1977. – Vol.10. – P. 71-76. 5. Capodicasa E. Omeprazole induces apoptosis in normal human polymorphonuclear leucocytes / Capodicasa E., Cornacchione P., Natalini B. Et al. // *Int J Immunopathol Pharmacol.* – 2008. – Vol.21, №1. – P.73-85. 6. Chang R.H. Nitric oxide increased interleukin-4 expression in T lymphocytes / R.H. Chang, M.H. Feng, W.H. Liu, M.Z. Lai // *Immunology.* – 1997. – Vol.90. – P.364-369. 7. DeRyckere D. Characterization of transcriptional regulation during negative selection in vivo / DeRyckere D., Mann DL, DeGregori J. // *J Immunol.* – 2003. – Vol.171. – P.802-811. 8. Duan Sh. S-nitrosylation/Denitrosylation and Apoptosis of Immune Cells / Duan Sh., Chen Ch. // *Cel. Mol. Immunol.* – 2007. – Vol.4, №5. – P.353-358. 9. Gupta V. Probiotics / V. Gupta, R. Garg // *Indian. J. Med. Microbiol.* – 2009. – Vol. 27. – P. 202-209. 10. Green L. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids / Green L. C., David A. W., Glogowski J. [et al.] // *Anal. Biochem.* – 1982. – Vol.126, №1. – P. 131-138. 11. Hevel J.M. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase / Hevel J.M., White K.A., Marletta M.A. // *J. Biol.Chem.* – 1991. – V.266, №34. – P. 22789-22791. 12. Koncz A. Nitric Oxide Mediates T Cell Cytokine Production and Signal Transduction in Histidine Decarboxylase Knockout Mice / Koncz A., Pasztoi M., Mazan M. et al. // *J. Immunol.* – 2007. – Vol.179. – P.6613-6619. 13. Koop H. Serum gastrin levels during long-term omeprazole treatment / Koop H., Klein M., Arnold R. // *Aliment Pharmacol Therap.* – 1990. – Vol.4. – P.131-138. 14. Korotkiy O. Proinflammatory cytokines concentration in blood serum of rats with the long-term gastric secretion suppression of hydrochloric acid / Korotkiy O., Karpovets T., Piliipenko S., Beregova T., Ostapchenko L. // *European Journal of Clinical Investigation.* – 2010. – Vol.40, Supplement 1 (44th Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation, Bari, Italy, 24 – 27 February, 2010). – P.14. 15. Lotfy M. Biological Activity of Bee Propolis in Health and Disease / M. Lotfy // *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* – 2006. – Vol. 7. – P.22-31. 16. Lysle D.T. Endogenous Opioids Regulate the Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase by Splenocytes / D.T. Lysle, T. How // *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* – 1999. – Vol.288, №2. – P.502-508. 17. Moilanen E. Nitric Oxide in Inflammation and Immune Response / E. Moilanen, H. Vapaatalo // *Annals of Medicine.* – 1995. – Vol. 27, Issue 3. – P.359-367. 18. Murayama T. The actions of NO in central nervous system and in thymocytes / T. Murayama, Y. Nomura // *Jpn. J. Pharmacol.* – 1998. – Vol.76. – P.129-139. 19. Najafi M.F., Vahedy F., Seyyedini M., Jomehzadeh H.R., Bozary K. Effect of the water extracts of propolis on stimulation and inhibition of different cells // *Cytotechnology.* – 2007. – Vol. 54. – P. 49-56. 20. Niedbala W. Role of nitric oxide in the regulation of T cell functions. *Ann. Rheum / Niedbala W., Cai B., Liew F.Y.* // *Dis.* – 2006. – Vol.65, Suppl.3. – P.11137-11140. 21. Niedbala W. Nitric oxide preferentially induces type 1 T cell differentiation by selectively up-regulating IL-12 receptor β 2 expression via cGMP / Niedbala W., Wei X. Q., Campbell C. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 2002. – Vol.99. – P.16186-16191. 22. Pascual D.W. Nitric oxide mediates immune dysfunction in the spontaneously hypertensive rat / Pascual D.W., Pascual V.H., Bost K.L., McGhee J.R., Oparil S. // *Hypertension.* – 1993. – Vol.21. – P.185-194. 23. Russo A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin / A. Russo, R. Longo, A. Vanella // *Fitoterapia.* – 2002. – Vol. 73, Suppl. 1. – S21-29. 24. Sá-Nunes A, Faccioli LH, Sforcin JM. Propolis: lymphocyte proliferation and IFN-gamma production // *J. Ethnopharmacology.* – 2003. – Vol. 87. – P. 93-97. 25. Sforcin J.M. Propolis and the immune system: a review / J.M. Sforcin // *J Ethnopharmacol.* – 2007. – Vol. 113, N 1. – P. 1-14. 26. Taylor-Robinson A.W. Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T helper type 1 and T helper type 2 cells / A.W. Taylor-Robinson, F.Y. Liew, A. Severn et al. // *Eur J Immunol.* – 1994. – Vol.24. – P.980-984. 27. Williams C. Proton Pump Inhibitors and bacterial overgrowth / Williams C., McColl K.E.L. // *Alimentary pharmacology and Therapeutic.* – 2006. – Vol. 23. – P. 3-10. 28. Короткий О.Г. Вміст інтерферону в супернатанті клітинних культур тимокитів і спленоцитів щурів за умов тривалої гіпоацидності шлункового соку / Короткий О.Г., Компанець І.Б., Нікольська В.В., Пилипенко С.В., Остапченко Л.І. // *Укр. біохім. журн.* – 2010. – т. 82. – № 4 (додаток 2) – С.110 (X Український біохімічний з'їзд, 13-17 вересня 2010р., м. Одеса, Україна). 29. Короткий О. Вплив мультипробіотиків на вміст інтерферону-гамма в сироватці крові щурів за умов тривалої гіпоацидності / Короткий О., Пилипенко С., Цирюк О., Остапченко Л., Берегова Т. // *Вісник Київського національного університету. Біологія.* – 2009. – вип. 54. – С.47-49. 30. Пилипенко С.В., Короткий О.Г., Берегова Т.В., Остапченко Л.І. Цитоморфологічний стан лімфоїдних органів щурів за умов тривалої шлункової гіпоацидності та при введенні мультипробіотика "Алібакт®" // *Перспективи медицини та біології.* – 2012. – Т.IV, № 1. – С. 90-95. 31. Ройт А. Иммунология. Пер. с англ. / А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл – М.: Мир, 2000. – 592 с. 32. Сомова Л.М. Оксид азота как медиатор воспаления / Сомова Л.М., Плехова Н.Г. // *Вестник ДВО РАН.* – 2006. – №2. – С.77-80. 33. Сторожков Г.И., Малышева Е.А. Оценка методик проведения исследований // *Качественная клиническая практика.* – 2001. – №1. – С.21-30. 34. Тотолян А.А. Клетки иммунной системы / Тотолян А.А., Фрейдлин И.С. – СПб.: Наука, 2000. – 232 с. 35. Хант С., Мейсон Д., Пенхейл Д. и др. Лимфоциты: Методы. Пер. с англ. / Под ред. Дж. Клауса. – М.: Мир, 1990. – 395с.

Надійшла до редколегії 21.12.12

УДК 577.114

Н. Данченко, асп., В. Полякова, канд. біол. наук, В. Бабак, інж., С. Весельський, д-р біол. наук, І. Салата, зав. лаб., Б. Цудзевич, проф.

ВПЛИВ АЛОКСАНУ НА ДЕЯКІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВУГЛЕВОДНОГО ТА ЕНЕРГЕТИЧНОГО ОБМІНУ У ЩУРІВ

Досліджувався вплив алоксану в дозі модулюючій діабет на деякі характеристики вуглеводного та енергетичного обміну у щурів.

Ключові слова: алоксан, діабет, вуглеводний обмін, енергетичний обмін.

Исследовалось влияние аллоксана в дозе модулирующим диабет на некоторые характеристики углеводного и энергетического обмена у крыс.

Ключевые слова: аллоксан, диабет, углеводный обмен, энергетический обмен.

Influence of alloxsan, in dose modulating diabet, on some characteristics of carbohydrate metabolism and energy transformation was studied on rats.

Keywords: alloxsan, diabet, carbohydrate metabolism transformation, energy transformation.

Вступ. Цукровий діабет є однією з медико-біологічних проблем на пізнання та вирішення якої направлені зусилля науковців у всьому світі. В індустріально розвинених країнах більше п'яти відсотків населення страждає на діабет і кількість хворих з даною патологією з кожним роком неухильно зростає. Для цієї хвороби характерною є висока частота розвитку певних ускладнень, які в свою чергу ведуть до ранньої інвалідизації та укорочення віку людей. В основі розвитку захворювання лежать суттєві зміни вуглеводного, ліпідного та білкового обміну, які призводять до порушень функціонування різних органів та систем організму людини [1]. Зокрема, ускладнення в обміні вуглеводів по-

чинаються зі значного зниження засвоєння глюкози тканинами організму, котре супроводжується зростанням її рівня у крові [2]. Останнє створює передумови для інтенсифікації процесів гліколізування білків крові і неодмінно веде при цій патології до перерозподілу різних форм гемоглобінів [3]. Поряд з цим, виявлені ацидофічні явища при цукровому діабеті в цілому обумовлюють зниження ефективності роботи дихальної системи організму людини. Тому природньо можна припустити, що такий стан організму буде спонукати до певних суттєвих зрушень в енергетичному обміні в клітинах, особливо в глікозозалежних тканинах.

Метою даного дослідження було з'ясування характеру впливу алоксану на деякі показники вуглеводного та енергетичного обміну у крові щурів при моделюванні цукрового діабету.

Матеріали і методи. Дослідження проводили на статеві зрілих щурах масою 200-220 г. Тварини утримувалися на повному харчовому раціоні. Всі експерименти виконували у відповідності до вимог комісії з біоетики НФаУ (протокол №12 від 25.12.2009) та "Загальними етичними принципами експериментів на тваринах" (Київ, 2001 р.), що узгоджується з положеннями "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей" (Страсбург, 1986 р.). Модель експериментального цукрового діабету створювали в експериментальних тварин одноразовим підшкірним введенням алоксану моногідрату ("Sigma") у розчині ацетатного буферу із розрахунку 150 міліграмів препарату на один кілограм маси тіла тварин. Контрольним тваринам було введено аналогічним чином лише відповідну кількість розчину ацетатного буферу. На дев'ятий день після введення препарату у сироватці крові щурів визначали наступні біохімічні показники: вміст вільної глюкози, активність α -амілази, концентрацію креатиніну та сечової кислоти, а також вміст вільного фосфору та активність лужної фосфатази за допомогою автоматичного біохімічного аналізатора "Flexor XL" і "Selectra XL" (Голандія). Окрім того здійснювали визначення вмісту креатиніну та сечової кислоти. Статистичну обробку отриманих даних проводили параметричним методом (Statistic-6) із використанням t-критерію Ст'юдента.

Результати та їх обговорення. Певні хімічні речовини, зі специфічною будовою молекули, такі як алоксан, гіалуринова кислота та інші, при введенні в організм людини чи тварин цілеспрямовано надходять до β -клітин панкреатичних островців і майже завжди провокують їх загибель. Однак, ця вибірковість не повна, так як з часом після навантаження організму алоксаном спостерігається ураження не лише тканини печінки а й нирок, котре пов'язують з транзитарним ефектом. Тому, в процесі відтворення моделі цукрового діабету алоксаном відмічається декілька фаз метаболічних реакцій, котрі вже на дев'ятий день після введення препарату переходять в стадію хронічної гіперглікемії. Остання, скоріш за все, обумовлена незворотною загибеллю β -клітин підшлункової залози.

Дійсно, біохімічні характеристики плазми крові щурів, взятої на дев'ятий день після введення алоксану, в значній мірі відповідали стану цукрового діабету. Зокрема, встановлено різке у 5,6 разів ($p < 0,01$) зростання рівня глюкози в плазмі крові піддослідних щурів порівняно з контролем, котрий в досліді досягав $35,78 \pm 2,87$ ммоль/л ($p < 0,01$), тоді як у інтактних тварин ця величина складала лише $6,28 \pm 0,31$ ммоль/л. Зазвичай, таке значне підвищення вмісту глюкози в крові відмічається при цукровому діабеті і є результатом недостатньої продукції в організмі інсуліну. Останній забезпечує не тільки нормальну проникність клітинних мембран по відношенню до глюкози, а й регулює біосинтез та активність ключових ферментів вуглеводного обміну [4]. Зареєстроване нами значне зниження активності α -амілази до $440,83 \pm 23,53$ од/л ($p < 0,01$), в плазмі крові

піддослідних тварин при $669,60 \pm 26,96$ од/л в контролі є, скоріш за все, наслідком порушення гормональної регуляції в організмі і вуглеводного обміну зокрема. Але не виключена і наявність гальмівного ефекту, обумовленого високою концентрацією в крові метаболітів її перетворень. Одночасно в досліджуваній біорідині у піддослідних щурів спостерігалось значне зростання активності лужної фосфатази на $99,7\%$ ($p < 0,05$), яке досягло величини $801,20 \pm 108,73$ од/л при наявній активності цього ферменту в інтактних тварин лише $401,13 \pm 97,47$ од/л. Механізми підвищення активності лужної фосфатази при різних патологічних станах організму недостатньо з'ясовані, так як кісткова тканина є основним джерелом у постачанні цього ферменту до сироватки крові, а печінка виводить його з цієї біорідини з жовчю з наступною транслокацією до шлунково-кишкового тракту. Однак, при ураженні тканини печінки алоксаном не виключена можливість затримки цього ферменту безпосередньо в крові. В цілому, поряд з виявленими змінами вмісту неорганічного фосфору (зниження на $22,85\%$ ($p < 0,05$)) у крові піддослідних щурів, спостерігається інтенсифікація фосфорного обміну, котрий тісно пов'язаний з рядом ланок енергетичного обміну в організмі тварин.

Це припущення в певній мірі опосередковано підтверджується тим, що в крові щурів навантажених алоксаном зареєстровані більш вагомні зміни рівня двох метаболітів, котрі мають безпосереднє відношення до окремих ланок енергетичного обміну в організмі тварин. Зокрема, рівень креатиніну у крові піддослідних щурів зріс на $68,3\%$ ($p < 0,05$) і досяг $97,66 \pm 11,30$ од/л ($p < 0,05$) при його рівні у контрольних тварин $57,80 \pm 1,85$ од/л. Одночасно відмічено у цій біорідині піддослідних щурів значне збільшення вмісту сечової кислоти, котре досягло $100,0 \pm 6,99$ мкмоль/л при $64,15 \pm 7,56$ мкмоль/л у інтактних тварин, тобто її рівень зріс на $55,9\%$ ($p < 0,05$). Відомо, що креатинфосфат відіграє важливу роль в енергозабезпеченні функцій м'язової тканини і зростання його рівня в крові може вказувати на зниження ефективності його фосфорилування під впливом заданої дози алоксану. Однією з причин може бути зниження рівня фосфорильованих пуринових нуклеотидів, котре опосередковано підтверджується значним зростанням рівня сечової кислоти, як одного з основних кінцевих продуктів деградації даного класу сполук.

Висновок: Підсумовуючи, можна зробити узагальнення, що алоксанова модель цукрового діабету в значній мірі відтворює зміни вуглеводного та частково енергетичного обміну, характерні для цього захворювання у людей.

Список використаної літератури. 1. Дж. Теппермен, Х. Теппермен. Физиология обмена веществ и эндокринной системы. – М.: Из-во. Мир, 1989. – 653 с. 2. Копельнюк В., Галенова Т., Кот Л., Богданова О., Остапченко Л. Роль інсуліну у регуляції вуглеводного та ліпідного обміну за умов метаболічного синдрому // Вісник КНУ ім. Т. Шевченка, Сер. Біологія. – 2010, №56. – С. 15-16. 3. Foster G.D., Wyatt H.R., Hill J.O., McGuckin B.G., Brill C., Mohammed B.S., Szapary P.O., Rader D.J., Edman J.S., et. al. A randomized trial of a low-carbohydrate diet for obesity // N. Engl. J. Med. – 2003. – Vol. 348. – P. 2082-2090. 4. Pavelic J., Matijevic T., Knezevic J. Biological and physiological aspects of action of insulin-like growth factor peptide family // J. Med. Res. – 2007. – Vol. 125, №4. – P. 511-522. 5. Mule G., Nardi E., Cottone S., Cusimano P., Incalcaterra F., Palermo A., et. al. Relationship of metabolic syndrome with puls pressure in patients with essential hypertension // Am. J. Hypertens. – 2007. – Vol. 20. – P. 197-203.

Надійшла до редколегії 06.11.12

Наукове видання



ВІСНИК

КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ПРОБЛЕМИ РЕГУЛЯЦІЇ ФІЗІОЛОГІЧНИХ ФУНКЦІЙ

Випуск 16

Друкується за авторською редакцією

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

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



Формат 60x84^{1/8}. Ум. друк. арк. 6,7. Наклад 300. Зам. № 213-6431.
Гарнітура Arial. Папір офсетний. Друк офсетний. Вид. № Б 3.
Підписано до друку 16.03.13

Видавець і виготовлювач
Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет"
01601, Київ, б-р Т. Шевченка, 14, кімн. 43
☎ (38044) 239 3222; (38044) 239 3172; тел./факс (38044) 239 3128
e-mail: vpc@univ.kiev.ua
<http://vpc.univ.kiev.ua>
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 1103 від 31.10.02