

Подано експериментальні дані про особливості будови, розвитку і функціонування рослинних і тваринних організмів, флору і фауну України, одержаних науковцями НДІ фізіології імені академіка Богача та ННЦ "Інститут біології" та інших наукових установ. 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 имени академика Богача и ОНЦ "Институт биологии" и других научных учреждений. Изложены также новые данные о патофизиологических закономерностях и биохимических механизмах регуляции процессов на клеточном и организменном 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 student.

ВІДПОВІДАЛЬНИЙ РЕДАКТОР РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ	Л.І. Остапченко, д-р біол. наук, проф. Є.О. Торгалло, канд. біол. наук, н.с. (відп. секр.); С.Є. Вакал, канд. біол. наук (техн. секр.); О.В. Жолос, д-р біол. наук, проф.; Т.В. Берегова, д-р біол. наук, проф.; С.Ю. Морозов, д-р біол. наук, проф.; М. Шандор, д-р біол. наук, проф.; С. Юозас, д-р біол. наук, проф.; Б. Каленгхем, проф.; В.О. Іваниця, д-р біол. наук, проф.; Д.Н. Говорун, д-р біол. наук, проф.; М.С. Зефіров, д-р біол. наук, проф.; І. Г. Ємельянов, д-р біол. наук, проф.; Е.М. Держинський, д-р біол. наук, проф.; І. Ю. Костіков, д-р біол. наук, проф.; О. Я. Склярів, д-р біол. наук, проф.; В.С. Мартинюк, д-р біол. наук, проф.; М. Ю. Макаруч, д-р біол. наук, проф.; В. П. Поліщук, д-р біол. наук, проф.; В. К. Рибальченко, д-р біол. наук, проф.; Н.Ю. Таран, д-р біол. наук, проф.; А.В. Сиволоб, д-р біол. наук, проф.; А.Г. Мойсеєнок, д-р біол. наук, проф., чл.-кор. НАН Білорусії
Адреса редколегії	03127, Київ-127, просп. акад. Глушкова, 2а, ННЦ "Інститут біології"; ☎ (38044) 521-35-98
Затверджено	Вченою радою ННЦ "Інститут біології" 22.05.14 (протокол № 11)
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

Бурлова-Василєва М., Кух Т., Кравченко Н., Гребіник Д. Рівень тканинного активатора плазміногену та інгібітора активаторів плазміногену 1 типу за умов атеротромботичного ішемічного інсульту та кардіоемболічного ішемічного інсульту на фоні миготливої аритмії	5
Левченко В., Карабанович П. Стан кардіореспіраторної системи в дівчат із гіпотензивним типом нейроциркуляторної дистонії в умовах стрес-теста	7
Карповець Т., Нагірняк А., Конопельнюк В., Савчук О., Остапченко Л. Аналіз біохімічних показників сироватки крові при відтворенні експериментальних моделей ожиріння	11
Пустовалов А., Матвієнко М., Балла І., Безлюдна А. Вплив іммобілізаційного стресу на морфофункціональні зміни клітин преоптичного ядра гіпоталамуса щурів на різних стадіях екстраляльного циклу	14
Савко У., Дворченко К., Верещака В. Послаблення кислотопродукуючої функції шлунка як фактор, що сприяє розвитку патології дванадцятипалої кишки	17
Башта Ю., Герасименко Р., Глушак Н., Мінченко О. Експресія факторів проліферації у підшкірній жировій тканині чоловіків за ожиріння	21
Скочко Н., Торгалю Є., Берник О. Концентрація азоту сечовини в сироватці крові щурів різного віку та за умов періодичного введення мультипробіотика	26
Бєлінська І., Гарманчук Л., Андрющенко О., Калмикова О., Рибальченко В. Морфофункціональна характеристика клітин лінії U-937 за умов впливу активатора протеїн-кінази с форбол-12-мірістат-13-ацетату	28
Слободяник Л., Решетнік Є., Янчук П. Участь монооксиду азоту в регуляції депонування крові печінкою	33
Шупова Т. Утворення міської популяції притупня (<i>Columba Palumbus L.</i>) в Києві	36
Сенюк О., Ковальов В., Паламар Л. Внесок "ефект свідка" в пошкодження клітинної ДНК у опромінених мишей <i>Bald/c</i>	40
Салига Н., Іскра Р. Активність глутатіонзалежних ензимів у щурів за впливу окремих амінокислот та дії стресу	43
Панюта О., Бєлава В., Фомаїді С., Калініченко О., Таран Н. Вплив передпосівної обробки насіння наночастками металів на захисті реакції проростків пшениці, інфікованих збудником церкоспорельозу	48
Данилов М., Островська Г. Вплив цитостатика похідного дигідропіролу на морфофункціональний стан нирок щурів при різних термінах введення та за умов хемоіндукованого колоректального канцерогенезу	52
Мельник М., Мартинюк В., Цимбалюк О., Артеменко О. Вплив електромагнітного поля наднизької частоти на викликане K^+ -деполяризацією збільшення внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію в гладеньком'язових клітинах	56
Маркевич А., Фалалєєва Т., Богун Л., Харченко О., Остапченко Л. Вплив низькомолекулярної органічної сполуки на базальне виділення шлункової секреції у щурів	59
Заєць В., Кітам В., Максимчук О., Росохацька І., Чашин М. Гетерологічна коекспресія функціонально-активних цитохрому P450 2E1 та NADPH-цитохром P450 редуктази в <i>ESCHERICHIA COLI</i>	62
Бова Т., Дмитрук Ю., Пиріг О., Шепелевич В., Авдєєва Л. Вплив мікробних препаратів на шкодочинність вірусної інфекції на посадках картоплі в умовах Полісся України	66
Бойко О., Шевченко Т., Лукашов Д., Орловська Г. Циркуляція фітовірусу серед грибів та рослин пов'язаних з виноградним слимаком <i>HELIX POMATIA L.</i>	69
Гаділія О., Вірченко О., Фалалєєва Т., Остапченко Л., Кудрявцев К. Вміст лейкотрієнів та простагландину E_2 в крові щурів за умов експериментального ульцерогенезу та профілактичного введення 2-(2-гідроксифенокси)ацетил-L-пролінат натрію	71
Костюк С., Бусенко О. Жирнокислотний склад загальних ліпідів найдовшого м'яза спини кролів під впливом гамма-радіації за дії піридоксину	75
Артемчук Г., Ковалюк О., Дзюблик І. Особливості поширення вірусів папіломи людини високого канцерогенного ризику у жінок віком 19-25 років в Україні	78

СОДЕРЖАНИЕ

Бурлова-Васильева М., Кух Т., Кравченко Н., Гребиник Д. Уровень тканевого активатора плазминогена и ингибитора активаторов плазминогена 1 типа при атеротромботическом ишемическом инсульте и кардиоэмболическом ишемическом инсульте на фоне мерцательной аритмии	5
Левченко В., Карабанович П. Состояние кардиореспираторной системы у девушек из гипотензивным типом нейрциркуляторной дистонии в условиях стресс-теста	7
Карповец Т., Нагирняк А., Конопельнюк В., Савчук А., Остапченко Л. Анализ биохимических показателей сыворотки крови при воспроизведении экспериментальных моделей ожирения	11
Пустовалов А., Матвиенко М., Балла І., Безлюдна А. Влияние иммобилизационного стресса на морфофункциональные изменения клеток преоптического ядра гипоталамуса крыс на различных стадиях экстрального цикла	14
Савко У., Дворченко К., Верещак В. Ослабление кислотопродуцирующей функции желудка как фактор, способствующий развитию патологии двенадцатиперстной кишки	17
Башта Ю., Герасименко Р., Глушак Н., Минченко А. Экспрессия факторов пролиферации в подкожной жировой ткани мужчин в условиях ожирения	21
Скочко Н., Торгалю Е., Берник О. Концентрация азота мочевины в сыворотке крови крыс разного возраста и при условии периодического введения мультипробиотика	26
Белинская И., Гарманчук Л., Андрущенко А., Калмыкова А., Рыбальченко В. Морфофункциональные характеристики клеток линии U-937 в условиях влияния активатора протеинкиназы с форбол-12-мириостат-13-ацетата	28
Слободяник Л., Решетник Е., Янчук П. Участие монооксида азота в регуляции депонирования крови печенью	33
Шупова Т. Образование городской популяции припутья (<i>Columba Palumbus L.</i>) в Киеве	36
Сенюк О., Ковальов В., Паламар Л. Вклад "эффект свидетеля" в распространение радиационного повреждения организма	40
Салыга Н., Искра Р. Активность глутатионзависимых энзимов у крыс при воздействии отдельных аминокислот при действии стресса	43
Панюта О., Белава В., Фомаиди С., Калиниченко Е., Таран Н. Влияние передпосевной обработки семян наночастицами на защитные реакции проростков пшеницы, инфицированных возбудителем церкоспорелеза	48
Данилов М., Островская Г. Влияние цитостатика производного дигидропиррола на морфофункциональное состояние почек крыс при различных сроках введения и при хемоиндуцированном колоректальном канцерогенезе	52
Мельник М., Мартинюк В., Цимбалюк А., Артеменко А. Влияние электромагнитного поля сверхнизкой частоты на вызванное влиянием K^+ -деполяризацией увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция в гладкомышечных клетках	56
Маркевич А., Фалалеева Т., Богун Л., Харченко О., Остапченко Л. Влияние низкомолекулярного органического соединения на базальное выделение желудочной секреции у крыс	59
Заец В., Китам В., Максимчук А., Росохацкая И., Чашин М. Гетерологическая коэкспрессия функционально-активных цитохромов <i>P450 2E1</i> и <i>NADPH</i> – цитохром <i>P450</i> редуктазы в <i>ESCHERICHIA COLI</i>	62
Бова Т., Дмитрук Ю., Пирог А., Шепелевич В., Авдеева Л. Влияние микробных препаратов на вредоносность вирусных инфекций в посадках картофеля в условиях Полесья Украины	66
Бойко О., Шевченко Т., Лукашов Д., Орловская Г. Циркуляция фитовирусов среди грибов и растений связанных с виноградной улиткой <i>HELIX POMATIA L.</i>	69
Гадилия Е., Вирченко А., Фалалеева Т., Остапченко Л., Кудрявцев К. Состав лейкотриенов и простагландина E2 в крови крыс в условиях экспериментального улцерогенеза и профилактического введения 2-(2-гидроксифеноксид)ацил-L-пролинат натрия	71
Костюк С., Бусенко О. Жирнокислотный состав общих липидов мышцы спины кролей под влиянием гамма-радиации при действии пиридоксина	75
Артемчук А., Ковалюк Е., Дзюблик И. Особенности распространения вирусов папилломы человека высокого канцерогенного риска у женщин в возрасте 19-25 лет в Украине	78

CONTENTS

Burlova-Vasyleva M., Kuh T., Kravchenko N., Grebinuk D. Tissue type plasminogen activator inhibitor type 1 level in patients with atherothrombotic ischemic stroke and cardioembolic ischemic stroke and cardioembolic ischemic stroke with atrial fibrillation.....	5
Levchenko V., Karabanovych P. State cardiorespiratory system in women with hypotensive type of neurocirculatory dystonia in conditions stress test	7
Karpovetz T., Nagirnyak A., Konopelnuyk V., Savchuk A., Ostapchenko L. Analysis biochemically indicators in serum when playing experimental models obesity.....	11
Pustovalov M., Matvienko I., Balla P., Bezlyudna A. Immobilization stress effect on morphofunctional changes of cells in rat hypothalamic preoptic nucleus at different stages of oestrous cycle	14
Savko. U., Dvorschenko K., Vereschaka V. Attenuation of gastric acid-producing function as a factor contributing to the duodenal pathology development.....	17
Bashta Y., Herasymenko R., Hlushchak N., Minchenko O. Expression of proliferation factors in subcutaneous fat tissue in obese men.....	21
Skochko N., Torgalo E., Bernuk O. Blood urea nitrogen content in rats of different age groups and under condition of periodic multiprobiotic consumption.....	26
Byelinska I., Garmanchuk L., Andruschenko A., Kalmukova A., Rubalchenko V. Morphofunctional characteristics U0937 cell line under the influence activator protein kinase C phorbol-12-miristat-13-acetate	28
Slobodjanyk L., Reshetnik E., Yanchuk P. Nitrogen monoxide participation in the regulation of deposit of blood liver	33
Shupova T. Education city population priputnya (Columba Palumbus L.) in Kiev	36
Seniuk O., Kovalev V., Palamar L. The contribution of the "bystander effect" in the spread of radiation damage of the organism	40
Saluga N., Iskra R. Activity in rat glutathione depended enzymes in to amino acids impact action stress	43
Panyuta O., Belava V., Fomaidi S., Kalinichenko O., Taran N. Influence of processing of wheat seeds by metal nanoparticles on defense reactions in wheat seedlings under eyespot causal agent.....	48
Danilov M., Ostrovska G. Influence derivative dihydropyrrrole cytostatics morphofunctional status of rat kidney at different durations of administrations in colorectal chemo-induced carcinogenesis.....	52
Melnik M., Martunyuk V., Tsymbalyuk A., Artemenko A. The influence of extremely low-frequency electromagnetic field on increase of intracellular calcium concentration in smooth muscle cells evoked by K ⁺ - depolarization	56
Markevych A., Falalyeyeva T., Bogun L., Harchenko O., Ostapchenko L. Effect of molecular weight organic compound on basal gastric acid secretion in rats	59
Zaets V., Kitam V., Maksimchuk O., Rosohatskaya I., Chaschin M. Heterological coexpression of functional – active cytochrome P450 2E1 and NADPH – cytochrome P450 reductase in E. coli	62
Bova T., Dmitruk Yu., Pirog A., Shepelevich V., Avdeeva L. Influence of microbial preparations for malicious virus infections in potato fields in conditions Ukraine Polissya	66
Boyko O., Shevchenko T., Lukashov D., Orlovska G. The circulation of phytovirus among plants and fungi involving the <i>HELIx POMATIA L</i>	69
Gadiliya E., Virchenko A., Falaleeva T., Ostapchenko L., Kudrayvtsev K. Leukotrienes and prostaglandin E2 content in rat blood serum under the conditions of experimental ulcerogenesis and prophylactic administration of 2 – (2-hydroxyphenoxy) acetyl)-L-prolinat sodium.....	71
Kostyuk S., Busenko O. Fatty acid composition of total lipids longer rabbit under influence of gamma radiation in action pyridoxine	75
Artemchuk H., Kovaliuk O., Dziublyk I. Features of distribution of high carcinogenetic risk genotypes of human papillomavirus among women aged 19-25 years in Ukraine.....	78

РІВЕНЬ ТКАНИНОГО АКТИВАТОРА ПЛАЗМІНОГЕНУ ТА ІНГІБІТОРА АКТИВАТОРІВ ПЛАЗМІНОГЕНУ 1 ТИПУ ЗА УМОВ АТЕРОТРОМБОТИЧНОГО ІШЕМІЧНОГО ІНСУЛЬТУ ТА КАРДІОЕМБОЛІЧНОГО ІШЕМІЧНОГО ІНСУЛЬТУ НА ФОНІ МИГОТЛИВОЇ АРИТМІЇ

Визначити рівень тканинного активатора плазміногену та інгібітора активаторів плазміногену 1 типу у плазмах крові хворих на атеротромботичний ішемічний інсульт та кардіоемболічний ішемічний інсульт на фоні миготливої аритмії. У дослідженні взяли участь 42 пацієнти з діагнозом атеротромботичний ішемічний інсульт та кардіоемболічний ішемічний інсульт на фоні миготливої аритмії. Рівень тканинного активатора плазміногену та інгібітора активаторів плазміногену 1 типу визначали методом імуноферментного аналізу. Рівень t-PA за інсульту на фоні миготливої аритмії понижений майже в 2 рази відносно показників групи з атеротромботичним ішемічним інсультом. Встановлена тенденція до зростання рівня PAI-1 відносно тієї ж референтної групи. Розвиток кардіоемболічного ішемічного інсульту на фоні миготливої аритмії супроводжується загостренням протромботичного прогнозу відносно хворих з атеротромботичним ішемічним інсультом.

Ключові слова: атеротромботичний ішемічний інсульт, кардіоемболічний ішемічний інсульт на фоні миготливої аритмії, тканинний активатор плазміногену, інгібітор активаторів плазміногену 1 типу.

Вступ. В останні роки відзначається зростання поширеності судинних захворювань. У більшості країн інсульт посідає друге-третє місце в структурі загальної смертності населення [1]. Атеротромботичний інсульт розвивається внаслідок активації тромбоцитів на поверхні атеросклеротичної бляшки з наступним тромбозом просвіту судини. В основі розвитку кардіоемболічного інсульту лежить окклюзія церебральної судини фрагментом тромбу або іншого емболу, які утворилися у порожнинах серця або на його клапанах [2, 3]. Раннім маркером атеросклерозу є дисфункція ендотелію, яка може бути виявлена до структурних змін в стінці судини [6]. У численних дослідженнях показано, що несприятливий вплив практично всіх відомих факторів ризику атеросклерозу реалізується через порушення функції судинного ендотелію, що вважається предиктором високого ризику серцево-судинних захворювань. Ендотеліальна дисфункція виявляється через такі ознаки як порушення судинного тону, адгезії та коагуляції за рахунок вивільнення клітинами ефektorів гемостатичного каскаду [4, 9]. Ступінь секреції тканинного активатора плазміногена (t-PA) з ендотеліальних клітин судин є одним з ефективних маркерів ендотеліальної функції [7].

Матеріали та методи. Кров відбирали пункцією ліктьової вени, у пробірку з розчином лимоннокислого натрію (38 г/л) у кінцевому співвідношенні 9:1. Суміш обережно перемішували та центрифугували за 1500 g протягом 40 хвилин за 4°C [5]. Супернатант використовували для визначення концентрації тканинного активатора плазміногена та інгібітора активаторів плазміногена 1 типу.

Імуноферментний аналіз проводили у мікропланшетах із сорбційною здатністю за стандартною методикою для розчинних білків [11]. Плазму крові розводили 50 мМ трис-НСІ буфером, рН 7,4 у співвідношенні 1:100 та інкубували у комірках планшетів за 37°C протягом 60 хв.

Для видалення антигенів, що не зв'язалися використовували 50 мМ трис-НСІ буфер, рН 7,4 та аналогічний розчин з вмістом 0,1% твіну-20.

Блокування неспецифічних місць зв'язування проводили 5% розчином знежиреного молока протягом ночі.

Первинні та вторинні антитіла готували відповідно до рекомендацій виробника, інкубацію проводили за 37°C протягом 60 хв.

Візуалізацію реакції проводили субстратом для лужної фосфатази (1 мг/мл пНФФ у 10% диетаноламіні, рН 9,8) за 37°C протягом 60 хв.

Оптичне поглинання вимірювали за довжини хвилі 405-492 нм на мікроридері BioTek Instruments.

Результати та обговорення. Патологічне тромботворення розвивається внаслідок порушення функціонування фібринолітичної системи. Продуктом активації даної системи є плазмін, який відповідає за лізис фібринового відкладення та підтримання постійного току крові. Послаблення фібринолітичної активності спостерігається за цілого ряду патологій – коронарної хвороби серця, діабеті, гіперліпідемії та ожирінні. До процесу утворення плазміну залучені активатор попередника плазміногену – тканинний активатор плазміногену (t-PA) та його основний інгібітор – інгібітор активаторів плазміногену 1 типу (PAI-1). Порушення балансу активаторно-інгібіторної системи синтезу плазміну, такі як підвищення рівня PAI-1 та зниження рівня t-PA асоційовані з високим ризиком коронарної хвороби серця та інфаркту міокарда [8, 10]. У зв'язку з цим нами було досліджено коливання рівнів t-PA та PAI-1 у групах хворих з атеротромботичним ішемічним інсультом та кардіоемболічним ішемічним інсультом на фоні миготливої аритмії з метою встановити можливі відмінності у процесах протікання захворювання.

Було показано, що розвиток кардіоемболічного ішемічного інсульту на фоні миготливої аритмії спричиняє зниження концентрації t-PA у плазмі крові майже в 2 рази відносно показників, характерних для групи хворих з діагнозом атеротромботичний ішемічний інсульт (рис. 1). Концентрація t-PA у останній групі хворих складала $13,35 \pm 1,48$ нг/мл, в той час як за кардіоемболічного ішемічного інсульту на фоні миготливої аритмії – $7,04 \pm 2,28$ нг/мл.

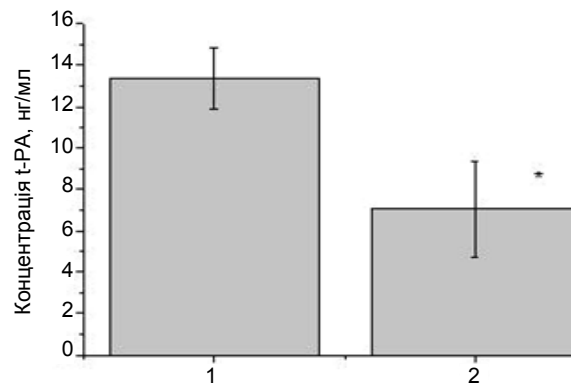


Рис. 1. Концентрація тканинного активатора плазміногена (t-PA) у плазмі крові за

1 – атеротромботичного ішемічного інсульту 2 – кардіоемболічного ішемічного інсульту на фоні миготливої аритмії

* – достовірні зміни відносно контролю, $p \leq 0,05$

У дослідженій популяції хворих з кардіоемболічним ішемічним інсультом на фоні миготливої аритмії простежувалась тенденція до зростання рівня PAI-1 відносно тієї ж референтної групи (рис.2). Концентрація

PAI-1 за розвитку атеротромботичного ішемічного інсульту становила $15,26 \pm 2,84$ нг/мл, в той час як за кардіоемболічного ішемічного інсульту на фоні миготливої аритмії – $18,7 \pm 3,29$ нг/мл.

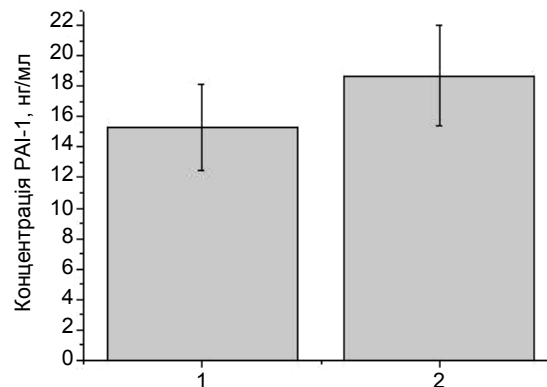


Рис. 2. Концентрація інгібітора активаторів плазміногена 1 типу (PAI-1) у плазмі крові за

1 – атеротромботичного ішемічного інсульту

2 – кардіоемболічного ішемічного інсульту на фоні миготливої аритмії

Слід зауважити, що у 60% дослідженої популяції хворих з кардіоемболічним ішемічним інсультом на фоні миготливої аритмії концентрація PAI-1 зростала

до $21,09 \pm 1,02$ нг/мл, що статистично достовірно перевищує показник атеротромботичного ішемічного інсульту в 1,4 рази.

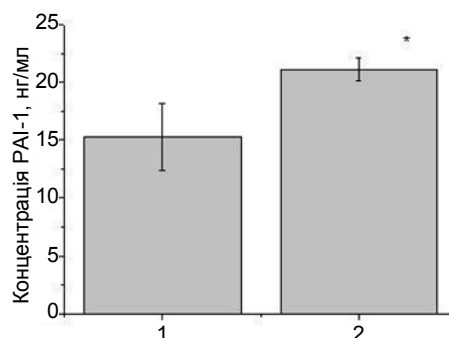


Рис. 3. Концентрація інгібітора активаторів плазміногена 1 типу (PAI-1) у плазмі крові

1 – 100% дослідженої популяції з атеротромботичним ішемічним інсультом

2 – 60% дослідженої популяції з кардіоемболічним ішемічним інсультом на фоні миготливої аритмії

* – достовірні зміни відносно контролю, $p \leq 0,05$

Висновки. Розвиток кардіоемболічного ішемічного інсульту на фоні миготливої аритмії супроводжувався зниженням концентрації t-PA у плазмі крові в 2 рази та зростанням концентрації PAI-1 у 60% пацієнтів в 1,4 рази відносно показників, характерних для групи

хворих з діагнозом атеротромботичний ішемічний інсульт. Отримані дані вказують на загострення протромботичного прогнозу для хворих з кардіоемболічним ішемічним інсультом на фоні миготливої аритмії відносно хворих з атеротромботичним ішемічним інсультом.

Список використаних джерел

1. Вахнина Н.В. Лечение ишемического инсульта. // Русский медицинский журнал. – 2008. – Т. 16, № 12. С. 1641-1644.
2. Данковцева Е.Н., Архипов С.Л., Затеищikov Д.А. Применение варфарина у больных с кардиоэмболическим инсультом // Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии. – 2012. – 8(4). – 581-586.
3. Духанин А.С., Шимановский Н.Л. Современные тенденции в применении антитромбоцитарных препаратов для профилактики атеротромботических событий // Международный медицинский журнал. – 2011, № 2. – 88-94.
4. Малыгин А. Ю., Хохлов А. Л. Клинические аспекты применения симвастина в комплексной терапии ишемического инсульта // Вестник современной клинической медицины. – 2012. – Т. 5, № 4. – С. 6-13.
5. Токар А.В., Макогоненко Э.М., Платонова Т.М. Сучасні методи лабораторної діагностики внутрішньосудинного мікроссідання крові (методичні рекомендації). – К., 1994.
6. Davignon J., Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. Circulation. 2004 Jun 15;109(23 Suppl 1):II127-32.
7. Dovjak N., Blinc A., Keber D. In vivo release of tissue-type plasminogen activator antigen from the human brachial artery. Thromb Res. 2002 May 15;106(4-5):249-55.
8. Johansson L., Jansson J.-H., Boman K., et al. Tissue Plasminogen Activator, Plasminogen Activator Inhibitor-1, and Tissue Plasminogen Activator/Plasminogen Activator Inhibitor-1 Complex as Risk Factors for the Development of a First Stroke. Stroke. 2000; 31: 26-32.
9. Kharbada R., MacAllister R.J. The Atherosclerosis Time-Line and the Role of the Endothelium Curr. Med. Chem. – Immun., Endoc. & Metab. Agents, 2005, 5: 47-52.
10. Zabczyk M., Majewski J., Lelakowski J. Thromboembolic events are associated with prolonged clot lysis time in patients with permanent atrial fibrillation // Polskie archiwum medycyny wewnetrznej 2011; 121 (11) 400-407.
11. Selected methods for antibody and nucleic acid probes / Cold Spring Harbor Laboratory Press. – USA, 1993.

Надійшла до редколегії 11.09.13

М. Бурлова-Васильева, канд. биол. наук, Т. Кух, асп., Н. Кравченко, канд. биол. наук, Д. Гребиник, канд. биол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

УРОВЕНЬ ТКАНЕВОГО АКТИВАТОРА ПЛАЗМИНОГЕНА И ИНГИБИТОРА АКТИВАТОРОВ ПЛАЗМИНОГЕНА 1 ТИПА

ПРИ АТЕРОТРОМБОТИЧЕСКОМ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ

И КАРДИОЭМБОЛИЧЕСКОМ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ НА ФОНЕ МЕРЦАТЕЛЬНОЙ АРИТМИИ

Определить уровень тканевого активатора плазминогена и ингибитора активаторов плазминогена 1 типа в плазмах крови пациентов с атеротромботическим ишемическим инсультом и кардиоэмболическим ишемическим инсультом на фоне мерцательной аритмии. В исследовании приняли участие 42 пациента с диагнозом атеротромботический ишемический инсульт и кардиоэмболический ишемический инсульт на фоне мерцательной аритмии. Уровень тканевого активатора плазминогена и ингибитора активаторов плазминогена 1 типа определяли методом иммуноферментного анализа. Установлено, что уровень t-PA при инсульте на фоне мерцательной аритмии понижен практически в 2 раза относительно показателей группы с атеротромботическим ишемическим инсультом. Установлена тенденция к повышению PAI-1 относительно той же референтной группы. Развитие кардиоэмболического ишемического инсульта на фоне мерцательной аритмии сопровождается обострением протромботического прогноза относительно больных с атеротромботическим ишемическим инсультом.

Ключевые слова: атеротромботический ишемический инсульт, кардиоэмболический ишемический инсульт на фоне мерцательной аритмии, тканевый активатор плазминогена, ингибитор активаторов плазминогена 1 типа.

M. Burlova-Vasyleva, PhD., T. Kuh, PhD stud., N. Kravchenko, PhD., D. Grebinuk, PhD.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

TISSUE TYPE PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR TYPE 1 LEVEL IN PATIENTS WITH ATHEROTHROMBOTIC ISCHEMIC STROKE AND CARDIOEMBOLIC ISCHEMIC STROKE AND CARDIOEMBOLIC ISCHEMIC STROKE WITH ATRIAL FIBRILLATION

To define tissue plasminogen activator and plasminogen activators inhibitor type 1 level in the blood plasma of patients with atherothrombotic ischemic stroke and cardioembolic ischemic stroke with atrial fibrillation. Blood samples were collected from 42 subjects with atherothrombotic ischemic stroke and cardioembolic ischemic stroke with atrial fibrillation. Tissue plasminogen activator antigen and plasminogen activator inhibitor-1 antigen were analyzed by ELISA assay. t-PA was decreased by nearly 2 times in a group of patients with atrial fibrillation stroke against patients with atherothrombotic ischemic stroke. The tendency towards PAI-1 increment was detected relative to the same reference group. Development of cardioembolic ischemic stroke with atrial fibrillation was accompanied by worsening of prothrombotic prognosis relative to patients with atherothrombotic ischemic stroke.

Keywords: atherothrombotic ischemic stroke, cardioembolic ischemic stroke with atrial fibrillation, tissue plasminogen activator, plasminogen activators inhibitor type 1.

УДК 616.85-009.86

В. Левченко, д-р мед. наук, П. Карабанович, асист.
Івано-Франківський національний медичний університет, Івано-Франківськ

СТАН КАРДІОРЕСПІРАТОРНОЇ СИСТЕМИ В ДІВЧАТ ІЗ ГІПОТЕНЗИВНИМ ТИПОМ НЕЙРОЦИРКУЛЯТОРНОЇ ДИСТОНІЇ В УМОВАХ СТРЕС-ТЕСТА

У хворих на нейроциркуляторну дистонію дівчат юнацького віку низька толерантність до фізичного навантаження пов'язана із особливостями функціонального стану кардіореспіраторної системи, у вигляді ранньої гемодинамічної реакції на перших сходинах велоергометричної проби, погіршення об'ємних та швидкісних показників легеневої вентиляції, зниження кисневого забезпечення стрес-тесту. Збільшення тривалості відновного періоду після навантаження є наслідком кардіореспіраторних розладів. Підтверджена необхідність застосування велоергометрії, спірометрії, пульсоксиметрії для діагностики та оцінки ефективності оздоровчих заходів при нейроциркуляторній дистонії.

Ключові слова: нейроциркуляторна дистонія, велоергометрична проба, гемодинаміка, спірометрія, пульсоксиметрія.

Вступ. Нейроциркуляторна дистонія (НЦД), це поліетіологічне структурно-функціональне, нейрогенне захворювання серцево-судинної системи, в основі якої лежать порушення нейроендокринної регуляції з множинною та різноманітною симптоматикою, яка виникає або посилюється в умовах стресу. Дезінтеграція нейрогормональної, метаболічної регуляції на рівні кори головного мозку, лімбікоретикулярної системи і гіпоталамуса,

призводить до дисфункції вегетативної нервової системи і функціональних розладів з боку вісцеральних систем у т. ч. кардіореспіраторної системи, особливо в умовах стресу, що запускає компенсаторні механізми в організмі хворого, які при НЦД швидко виснажуються [3, 7, 11].

НЦД гіпотензивного типу найчастіше виявляється в підлітковому та юнацькому віці, особливо в дівчат [10, 14]. Літературні дані свідчать про тенденцію до зрос-

тання частоти артеріальної гіпотензії в молодих людей, так в підлітковому віці вона виявляється у 3,1 – 20,9 % осіб під час медичного огляду [8, 10]. Гіпотензивний тип НЦД проявляється поліморфною клінічною симптоматикою і супроводжується зниженням фізичної та розумової працездатності в підлітковій та юнацькій популяції, що призводить до формування дезадапційного синдрому, і зниженні якості життя [13]. При неконтрольованому перебігу цього типу дистонії у молодому віці, можливі ризики розвитку в майбутньому артеріальної гіпертензії, порушень церебрального кровотоку, розладів перебігу вагітності та пологів, дебюту раннього атеросклерозу, синдрому хронічного втомилення тощо [9, 13, 14].

В зв'язку з цим розширення знань про функціональний стан стресзабезпечуючих систем, особливо кардіореспіраторної системи в умовах стресорного навантаження, при гіпотензивному типі дистоній в юнацькому віці набуває особливої актуальності. Система кровообігу, це чутливий індикатор стану адаптаційних механізмів цілісного організму, так як показники гемодинаміки тонко відображають ступінь напруження регуляторних систем, особливо обумовлених стресорним впливом [1, 3, 7], який супроводжується значним споживанням кисню працюючими м'язами, підвищенням виділенням CO₂ й метаболітів. При цьому, лімітуючим фізичні навантаження є система кровообігу, її здатність транспортувати кисень із легень до працюючих органів і тканин, що поглиблюється респіраторним синдромом, який виявляється у більшості дівчат із проявами НЦД [3, 6, 17].

Тому представляє інтерес дослідження стану гемодинамічного та респіраторного забезпечення стресорного навантаження у дівчат із гіпотензивним типом НЦД в юнацькому віці.

Метою дослідження була оцінка в умовах стрес-тесту функціональних резервів кардіореспіраторної системи, стану толерантності до дозованих фізичних навантажень у дівчат із гіпотензивним типом нейроциркуляторної дистонії.

Матеріал і методи дослідження. Було обстежено 119 студенток віком 17–18 років, хворих на НЦД за гіпотензивним типом, які склали основну групу і 14 практично здорових дівчат того ж віку – контрольна група. Дівчата в обох групах регулярно не займалися фізичною культурою. Стан адаптаційних резервів визначався у дівчат в стані спокою (сп) і шляхом оцінки динаміки потужності велоергометричної (ВЕМ) проби, а також за характером гемодинамічної реакції, кисневого забезпечення під час неї. ВЕМ-проба виконувалася на цифровому велоергометрі "Siemens" за протоколом "Cornell" – східчаста проба, яка безперервно зростала кожні 2 хвилини на 25 Вт. Під час дослідження контролювалися загальний стан дівчат, електрокардіограма, оцінювалися динаміка показників частоти серцевих скорочень (ЧСС), рівень артеріального тиску (АТ), співвідношення ЧСС/Вт, визначали ударний об'єм крові (УОК), хвилинний об'єм крові (ХОК), "коефіцієнт резерву" (ХОК-вем/ХОКсп), пульсовий тиск (ПТ) на досягнутих сходинках навантаження [4, 5]. В дівчат у стані спокою також досліджувалися об'єми та швидкісні показники легеневої вентиляції на цифровому спірометрі "Кардіо+" (Росія) за стандартною методикою з аналізом показників спірографії і кривої "потік-об'єм" [2, 10]. Під час проведення спірометрії виконувался вдих і видих із максимальною силою, при цьому визначали життєву ємкість легень (ЖЄЛ) вдиху (вд) і видиху (вид), форсовану життєву ємкість легень (ФЖЄЛ), об'єм форсованого видиху за 1 сек (ОФВ1), резервний об'єм вдиху (РОВд), пікову об'ємну швидкість (ПОШ). Також визначали насиченість крові киснем за

допомогою пульсоксиметра (ЮТАСОКСИ-201) під час стресорного навантаження і в відновний період.

Для оцінки ступеня вірогідності результатів дослідження застосовували варіаційно-статистичний метод аналізу отриманих результатів із використанням пакета статистичних програм Statistica v. 6.1 (США) та рекомендацій О. Ю. Ребрової [12].

Результати дослідження та їх обговорення. За результатами дослідження було встановлено, що у (73 %) дівчат із гіпотензивним типом НЦД у стані спокою виявлялися ознаки постійної тахікардії, у (20,6 %) дівчат надмірне серцебиття відмічалось тільки при незначному психоемоційному чи фізичному навантаженні, лише в 6,4 % осіб ЧСС зберігалася постійно в межах норми. На час огляду систолічний і діастолічний АТ становив, відповідно, (95,43±1,33) мм рт. ст. і (66,82±0,56) мм рт. ст. Також у 76,47 % дівчат основної групи виявлялася суб'єктивна симптоматика респіраторного синдрому, що підтверджувало результати існуючих публікацій [3, 15, 17].

Дослідження проведенні в умовах стрес-тесту серед дівчат із гіпотензивним типом НЦД виявили у них зниження показників потужності велоергометричної проби (104,65±10,29) Вт, проти результату (146,43±11,73) Вт отриманого в групі здорових дівчат однолітків ($p < 0,001$).

Аналіз результатів динаміки показників системи кровообігу на перших сходинках ВЕМ-проби виявив у хворих на НЦД ранню гемодинамічну реакцію (прискорення ЧСС, збільшення УОК і співвідношення ЧСС/Вт) у порівнянні з аналогічними показниками контрольної групи. Так, при навантаженні 25 Вт приріст ЧСС був майже однаковий, як у групі хворих, так і серед дівчат контрольної групи, відповідно, (19,92±1,44) % і (18,73±1,28) %. При навантаженні 50 Вт, 75 Вт, 100 Вт у дівчат основної групи приріст ЧСС становив, відповідно, (38,83±2,52) %, (52,6±1,8) %, (63,1±3,82) % і достовірно перевищував показники приросту отримані в контрольній групі, відповідно, (32,4±1,64) %, (46,17±1,3) % і (56,88±1,6) % ($p < 0,05$). При навантаженні 125 Вт у хворих дівчат, які його досягли, приріст ЧСС (70,25±4,35) % поступався перед показником отриманим у здорових дівчат (81,48±2,68) % ($p < 0,05$). У дівчат контрольної групи тільки після 100 Вт навантаження виявлявся значний приріст ЧСС – (81,48±2,68) %, (90,54±3,14) %, (108,12±4,06) %, (122,42±4,34) %, відповідно, до 125 Вт, 150 Вт, 175 Вт і 200 Вт ВЕМ-проби.

Показники УОК у стані спокою при гіпотензивному типі НЦД були на 9,82 % ($p < 0,05$) нижчі від результату отриманого в дівчат контрольної групи (61,14±1,93) мл, а в умовах стрес-тесту УОК збільшився на 15,39 %, з (55,67±) мл до (64,24±) мл ($p < 0,05$). При цьому УОК у дівчат із проявами дистонії достовірно почав змінюватися з 25 Вт навантаження. Серед дівчат контрольної групи УОК в умовах ВЕМ-проби достовірно збільшувався на 19,87 %, але тільки після навантаження 100 Вт і вище, що свідчить про оптимальну систолічно-діастолічну функцію міокарда в здорових дівчат. Збільшення приросту УОК в основній групі, на перших сходинках ВЕМ-навантаження свідчить про пришвидшене використання енергетичних "запасів" міокарда, і/або їх дефіцит, чого не спостерігалось серед дівчат контрольної групи [4, 6].

Зростання ЧСС, УОК є важливим адаптаційним механізмом направленим на збільшення ХОК, який забезпечує нормальний перебіг фізіологічних процесів в умовах стресорного навантаження. Збільшення ХОК серед дівчат основної групи відбувалося за рахунок приросту ЧСС і УОК. В групі здорових дівчат на висоті субмаксимального навантаження, ХОК зростав переважно за рахунок ЧСС. При цьому приріст показника ХОК на висоті

навантаження в здорових дівчат на 39,84 % ($p < 0,001$) переважав результат отриманий у дівчат хворих на НЦД, відповідно, $(12,32 \pm 0,56)$ л/хв. I $(8,81 \pm 0,46)$ л/хв.

Вивчення у цих хворих на висоті ВЕМ-проби "коефіцієнту резерву" (ХОКвем/ХОКсп), виявило, що у дівчат основної групи він становив $(1,54 \pm 0,13)$ ум. од., у дівчат контрольної групи – $(2,34 \pm 0,15)$ ум. од., що також свідчить про недостатнє кисневе забезпечення працюючих м'язів у дівчат із проявами гіпотонічної форми дистонії.

Під час аналізу результатів ВЕМ-проби доречною є оцінка співвідношення ЧСС/Вт, яке при гіпотонічному типі НЦД становило $(1,65 \pm 0,08)$ ум. од., проти $(1,06 \pm 0,03)$ ум. од. ($p < 0,001$) показника групи контролю. Даний показник відображає середнє міокардіальне забезпечення одного вату навантаження, який при НЦД виявився надмірним.

Відомо, що АТ має два компоненти – постійний, який характеризується величиною середнього АТ, і пульсуючий, який виявляється величиною пульсового тиску. Пульсовий тиск – відображає взаємодію між скоротливою функцією лівого шлуночка і розтяжністю магістральних артерій (прямий компонент), і величиною хвилі віддзеркалення (непрямий компонент) [16]. У дівчат основної групи відмічався значний зріст ПТ на всіх сходинках ВЕМ-проби – від 25 до 125 Вт, відповідно на $(20,11 \pm 2,13)$ %, $(37,28 \pm 1,66)$ %, $(63,80 \pm 1,72)$ %, $(64,50 \pm 1,45)$ %, $(115,34)$ %. В контрольній групі показники приросту ПТ при 50, 75, 100 і 125 Вт навантаження були достовірно нижчими від показників отриманих в 1-й групі, і становили, відповідно $(11,36 \pm 3,1)$ %, $(20,99 \pm 2,34)$ %, $(33,85 \pm 1,42)$ %, $(69,48 \pm 2,12)$ %. При цьому у дівчат контрольної групи ПТ при навантаженні 25 Вт достовірно не змінювався. Подібна реакція пульсового тиску при НЦД може бути пов'язана із підвищенням тону магістральних артерій і неадекватною скоротливою функцією міокарда під час стресу. Значне збільшення ПТ у дівчат 1-ї групи в умовах стрес-тесту може слугувати предиктором розвитку більш складної серцево-судинної патології в майбутньому [14, 16]. Не виключено, що показник ПТ є більш інформативним, незалежно від рівня систолічного АТ, показником ступеня ризику.

Таким чином, збільшення ЧСС, УОК, в умовах стрес-тесту, свідчить про зростаючі енергетичні запити організму, насамперед в скелетній мускулатурі, міокарді тощо. Збільшення ЧСС є маркером активації симпатикoadреналової системи з якою асоціюється як збільшення, так і зниження толерантності до фізичного навантаження, зменшення кардіального резерву, збільшення напруження артеріальної стінки, споживання кисню тканинами тощо [1]. Характер гемодинамічної реакції в дівчат контрольної групи на висоті навантаження показав, що у них функціональні резерви серцево-судинної системи вищі і використовуються більш раціонально, аніж у дівчат із проявами гіпотонічного типу НЦД.

Проведена спірометрія виявила достовірні зміни показників легеневої вентиляції у більшості дівчат із гіпотонічним типом дистонії. Так показник ЖЄЛ вд становив $(65,90 \pm 3,17)$ % від належної величини ($p < 0,001$), ЖЄЛ вид – $(71,00 \pm 2,46)$ % ($p < 0,01$), РО вд – $(24,46 \pm 3,83)$ % ($p < 0,05$), ФЖЄЛ – $(72,30 \pm 3,10)$ % ($p < 0,05$), ОФВ1 – $(69,42 \pm 2,26)$ % ($p < 0,05$), ПОШ – $(70,26 \pm 1,86)$ % ($p < 0,05$). Подібне погіршення легеневої вентиляції сприяє зменшенню кисневого забезпечення організму пацієнта при НЦД, особливо в умовах навантаження.

Виявлені зміни легеневої вентиляції у дівчат із ознаками НЦД, при наявності здорових легень, свідчать про безпосередній зв'язок між вегетативною дисфункцією та метаболічною незабезпеченістю дихальних м'язів, що супроводжується розладами паттерну

дихання, порушеннями гемодинаміки і низькою толерантністю до фізичного навантаження. Отриманні результати спірометрії при НЦД схожі на ті, що мають місце при захворюваннях із рестриктивними ураженнями паренхіми легень [2].

Показники пульсоксиметрії (ПСМ) в основній та контрольній групах у стані спокою достовірно не різнилися між собою, відповідно, $(97,64 \pm 0,33)$ % і $(98,18 \pm 0,54)$ % ($p > 0,5$). В той же час показник ПСМ на висоті велоергометрії в основній групі зменшився до $(94,35 \pm 0,46)$ % ($p < 0,001$), в контрольній групі цей показник не зазнав достовірних змін. Таким чином, нестача кисню в умовах фізичного навантаження обмежує енергоутворення і відповідно виносливість та тривалість навантаження.

У відновному періоді показники гемодинаміки в контрольній групі повернулися до вихідних показників на 3-й хвилині у 35,71 % дівчат, на 5-й хвилині у 50 % і на 7-й хвилині у – 14,29 % осіб. В основній групі відновлення у більшості дівчат настало пізніше – на 5-й хвилині у 14,29 % дівчат, на 7-й хвилині – у 35,71 % осіб, на 10-й – у 42,86 % хворих, у 7,14 % – показники пульсу, АТ, ПТ повернулися до вихідних цифр на 15 хвилині відновного періоду. Показники ПСМ в основній групі на 10 хвилині відновного періоду зросли до $(96,29 \pm 0,38)$ % у 62,18 % хворих, хоча достовірно різнилися від вихідного показника в спокої, у 37,82 % осіб цей показник становив $(97,58 \pm 1,13)$ %, тобто повернувся до вихідного стану.

Розлади нейрогормонально-метаболічного забезпечення серцево-судинної системи при НЦД реалізуються неадекватним реагуванням насамперед міокарда на звичайні і тим більше значні подразники стресорного характеру. У дівчат із проявами НЦД, це виражається ранньою та надмірною гемодинамічною реакцією на фізичний стрес. Аналіз показників ЧСС, ЧСС/Вт в умовах стрес-тесту виступає не тільки як показник стабільності функціонування серцево-судинної системи, але й відображає баланс активності стрес-реалізуючих і стрес-лімітуючих систем, що особливо важливо для оцінки перебігу і ефективності корекції проявів НЦД.

Оцінку стану адаптаційних механізмів при НЦД в молодому віці необхідно проводити в умовах стрес-тесту, шляхом дослідження показників нейрогормонального забезпечення, гемодинаміки на висоті навантаження до і після застосування оздоровчих програм.

Стрес-тест у дівчат із вегетативною дисфункцією, протікає з розладами кисневого забезпечення фізичного навантаження, через функціональні розлади гемодинамічних та респіраторних систем. Внаслідок чого енергозабезпечення організму здійснюється переважно за рахунок анаеробних механізмів, що супроводжується низькою толерантністю до фізичного навантаження. Подібні зміни в тканинах, особливо в міокарді, викликають розлади метаболізму і навіть розвиток дистрофічних змін. Під час фізичного стресу при НЦД виявляються приховані "дефекти" нейрорегуляторних механізмів, які в першу чергу виявляються ранньою, надмірною і короткочасною реакцією показників центральної та периферичної гемодинаміки, направленою на вирівнювання гомеостазу.

Ступінь і динаміка змін фізіологічних параметрів під час різних по інтенсивності та тривалості навантаженнях, а також швидкість і повнота їх відновлення після фізичного стресу дають можливість не тільки визначити стан резервних можливостей людини, але й описати її так званий "фізіологічний портрет", дати розгорнуту характеристику її адаптаційних резервів до дозованих фізичних навантажень.

Виявленні зміни у дівчат хворих на НЦД свідчать про дисфункцію міокардіально-гемодинамічного гомеостазу, з яким тісно пов'язана здатність адаптуватися до

впливу зовнішніх стресорних факторів, а також від адекватності й економічності реагування, від ефективності управління у використанні та відновленні резервів. Ефективність міокардіально-гемодинамічного гомеостазу визначається станом вегетативної регуляції, з одного боку, й енергетичними витратами з іншого, спрямованими на підтримку необхідного рівня функціонування системи кровообігу (наприклад, систолічних показників). Ці дві умови взаємопов'язані між собою через одночасний хроно- та інотропний вплив вегетативної нервової системи на серце. Однак у практичній медицині в більшості випадків ураховується лише кінцевий результат регуляторного впливу – частота пульсу, ударний і хвилинний об'єми кровообігу, тобто показники рівня функціонування системи кровообігу. Тому одним із найважливіших методологічних питань для діагностики та лікування донозологічних станів є вибір тестування не тільки відповідних показників гемодинаміки, а й показників нейрогуморального гомеостазу, особливо в умовах стресу, а також визначення шляхів корекції виявлених змін.

Висновки:

1. Виконання фізичних навантажень хворими на НЦД, наявність елементів стресорного напруження, висуває підвищені вимоги до діяльності кардіореспіраторної системи, перебудова якої супроводжується неадекватним кисневим забезпеченням працюючих систем, розладами адаптації, множинною симптоматикою.
2. У дівчат хворих на НЦД, на фоні низької толерантності до фізичного навантаження, виявляється рання гемодинамічна реакція вже на перших сходинках велоергометричної проби, збільшення співвідношення ЧСС/Вт і рівня пульсового тиску в умовах стрес-тесту, зниження показників пульсоксиметрії та подовження відновного періоду.
3. У більшості хворих на НЦД дівчат виявляються прояви респіраторного синдрому, які супроводжуються зниженням об'ємних та швидкісних показників легеневої вентиляції, що сприяє формуванню чи поглибленню вегетосудинної та вісцеральної симптоматики. Це потребує застосування спірометрії для об'єктивізації перебігу респіраторного синдрому і контролю ефективності оздоровчих програм.
4. Стан адаптаційних резервів у дівчат юнацького віку, ступінь важкості і перебіг НЦД необхідно оцінювати за толерантністю до фізичних навантажень, шляхом проведення велоергометричної проби, орієнтуючись на

досягнення субмаксимальної ЧСС, та динамічним аналізом гемодинамічного забезпечення навантажень.

5. За наявності у хворих на НЦД проявів респіраторного синдрому, окрім медикаментозного лікування, рекомендуються систематичні дозовані фізичні навантаження і обов'язково дихальна гімнастика.

Перспектива подальших досліджень. Дослідження особливостей показників центральної і периферичної гемодинаміки в умовах стрес-тесту, дозволять створити оптимальний підхід в процесі оздоровлення молодих людей з проявами гіпотензивного типу НЦД.

Список використаних джерел

1. Амосова Е. Н. Стресс-тесты в кардиологии: возможности и нерешенные проблемы / Е. Н. Амосова, Е. В. Андреев // Серце і судини. – 2006. – № 4 – С. 10–12.
2. Баранов В. Л. Исследование функции внешнего дыхания / В. Л. Баранов, И. Г. Куренкова, В. А. Казанцев. – С. Пб.: Элби-СПб, 2002. – 302 с.
3. Вейн А. М. Вегетативные расстройства: клиника, диагностика, лечение / А. М. Вейн. – М.: Медицинское информационное агентство, 2003. – 752 с.
4. Дубровский В. И. Спортивная физиология / В. И. Дубровский. – М.: Владос, 2005. – 462 с.
5. Жарінов О. Й. Навантажувальні проби в кардіології / О. Й. Жарінов, В. О. Куць, Н.В. Тхор. – К. Медицина світу, 2006. – 89 с.
6. Калоева З.Д. Показатели центральной и внутрисердечной гемодинамики у детей с первичной артериальной гипотензией / З. Д. Калоева, В. Б. Брин, М. Г. Дзгоева // Педиатрия. – 2002. – № 6. – С. 30–32.
7. Коваленко В. М. Некоронарогенные болезни. Практическое руководство / В.М.Коваленко, Е.Г.Несукай. – К.: МОРИОН, 2001. – 480 с.
8. Левина Л. И. Подростковая медицина / Л. И. Левина, А. М. Куликова. – С. Пб.: Питер, 2006. – 544 с.
9. Леонтьева И. В. Лекции по кардиологии детского возраста / И. В. Леонтьева. – М.: Медпрактика-М, 2005. – 536 с.
10. Маколкин В. И. Нейроциркуляторная дистония в терапевтической практике / В.И.Маколкин, С.А.Аббакумов. – М.: Медицина, 2005. – 192 с.
11. Окорочков А. Н. Нейроциркулярная дистония / А. Н. Окорочков, Н. П. Базенко. – М.: Мед. лит., 2004. – 192 с.
12. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – М.: МедиаСфера, 2002. – 312 с.
13. Потапенко В. П. Низкое давление. Причины и эффективное лечение / В. П. Потапенко. – М.: АСТ; С. Пб.: Сова, 2007. – 94 с.
14. Circulatory and plasma catecholamine responses to mental stress in young subjects with two different types of hypertension / H. Kawabe, I. Saito, C. Hasegawa [et al.] // Angiology. – 2002. – Vol. 45, № 6. – P. 435–441.
15. Bass C. Hyperventilation syndrome: a chimera? / C. Bass // J. Psychosom. Res. – 2004. – Vol. 42, № 5. – P. 421–426.
16. Franklin S. Is pulse pressure useful in predicting risk of coronary heart-disease? The Framingham Heart Study / S. Franklin, S. Khan // Circulation. – 1999. – № 100. – P. 354–360.
17. Nardi A. E. Hyperventilation in panic disorder and social phobia // A. E. Nardi, A. M. Valenca, I. Nascimento // Psychopathology. – 2002. – Vol. 34, № 3. – P. 123–127.

Надійшла до редколегії 11.09.13

В. Левченко, д-р мед. наук, П. Карабанович, ассист.
Ивано-Франковский медицинский университет, Ивано-Франковск

СОСТОЯНИЕ КАРДИОРЕСПИРАТОРНОЙ СИСТЕМЫ У ДЕВУШЕК ИЗ ГИПОТЕНЗИВНЫМ ТИПОМ НЕЙРОЦИРКУЛЯТОРНОЙ ДИСТОНИИ В УСЛОВИЯХ СТРЕСС-ТЕСТА

У девушек юношеского возраста больных нейроциркуляторной дистонией низкая толерантность к физической нагрузке связана с особенностями функционального состояния кардиореспираторной системы, в виде ранней гемодинамической реакции на первых этапах велоэргометрической пробы, ухудшения объемных и скоростных показателей легочной вентиляции, снижения кислородного обеспечения стресс-теста. Увеличение продолжительности восстановительного периода после нагрузки есть следствием кардиореспираторных расстройств. Подтверждена необходимость применения велоэргометрии, спирометрии, пульсоксиметрии для диагностики и оценки эффективности оздоровительных мероприятий при нейроциркуляторной дистонии.

Ключевые слова: нейроциркуляторная дистония, велоэргометрическая проба, гемодинамика, спирометрия, пульсоксиметрия.

V. Levchenko, D.Sc, P. Karabanovych, assistant prof.
Ivano-Frankovsk National Medical University, Ivano-Frankovsk

STATE CARDIORESPIRATORY SYSTEM IN WOMEN WITH HYPOTENSIVE TYPE OF NEUROCIRCULATORY DYSTONIA IN CONDITIONS STRESS TESTS

The girls adolescence neurocirculatory dystonia patients with low exercise capacity is associated with features of the functional state of the cardiorespiratory system, in the form of early hemodynamic response to the first steps of the bicycle exercise test, the deterioration of volume and velocity parameters of pulmonary ventilation, reducing the oxygen supply of the stress test. Increasing the length of the recovery period after exercise is due to cardiorespiratory disorders. Confirmation of the need for cycle ergometry, spirometry, pulseoximetry for the diagnosis and evaluation of the effectiveness of health interventions in neurodystonia.

Keywords: neurocirculatory dystonia, bicycle stress test, hemodynamics, spirometry, pulseoximetry.

УДК 577.121.7:616-056.52

Т. Карповець, асп., А. Нагірняк, студ., В. Конопельнюк, канд. біол. наук,
Л. Остапченко, д-р біол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка

АНАЛІЗ БІОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ СИРОВАТКИ КРОВІ ПРИ ВІДТВОРЕННІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ МОДЕЛЕЙ ОЖИРІННЯ

Проведено аналіз основних біохімічних показників сироватки крові щурів експериментальних моделей ожиріння. Встановлено зміни досліджуваних показників сироватки крові, які співпадають з клінічною картиною розвитку ожиріння у людини. Зроблено висновок, що дані моделі є адекватними та близьким за біохімічними показниками до ожиріння у людини і можуть бути використані в дослідженнях патогенезу даного захворювання на тваринах.

Ключові слова: сироватка крові, експериментальна модель ожиріння.

Вступ. Ожиріння являється однією з найбільш поширених світових проблем ХХІ століття. За останніми оцінками ВОЗ [1], надмірною вагою в сучасному світі страждають приблизно 1,5 мільярда людей і ще 350 млн. схильні до захворювання. В Україні ожирінням страждає близько 15% населення і з кожним роком кількість новодіагнованих випадків ожиріння неухильно зростає [2]. На сьогодні, пошук нових та доцільних підходів до діагностики та лікування ожиріння є нагальною потребою в боротьбі з розвитком та розповсюдженням цього захворювання. Експериментальні моделі ожиріння на дослідних тваринах дозволяють поглибити знання про розвиток та прогресування, а також оптимізувати нові підходи до лікування цього захворювання. Проте відкритим залишається питання адекватного підбору моделі ожиріння та біохімічних параметрів для її підтвердження. Тому метою нашої роботи була оцінка різних моделей ожиріння на основі ключових біохімічних маркерів розвитку даної патології.

Об'єкт і методи досліджень. Досліди проводили на білих нелінійних щурах-самках з початковою масою 160-200 г з дотриманням нормативів Конвенції з біоетики Ради Європи 1997 року, Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей, загальним етичним принципом експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 року), інших міжнародних угод та національного законодавства у цій галузі.

Упродовж першого тижня всі щури отримували стандартну їжу "Purina rodent chow" і воду ad libitum. На 8-й день тварини рандомізовано були розділені на 3 групи. Тварини першої групи ("контроль") протягом 10 тижнів отримували стандартну їжу та воду. Тварини другої групи ("фруктоза") знаходились на стандартному раціоні та отримували 10% розчин фруктози ad libitum [3]. Щури третьої групи ("ВКД") знаходились на висококалорійній дієті, яка складалась із стандартної їжі (60%), свинячого жиру (10%), курячих яєць (10%), сахарози (9%), арахісу (5%), сухого молока (5%) та рослинної олії (1%) [4].

Концентрацію глюкози встановлювали за допомогою приладу "ГЛЮКОФОР-ІІ" (Україна) згідно інструкції. Біохімічний аналіз крові (вміст загального білірубіну, креатиніну, сечової кислоти, сечовини, тригліцеридів, загального холестеролу, ліпопротеїдів низької щільності (ЛПНЩ), ліпопротеїдів високої щільності (ЛПВЩ), активність лужної фосфатази (ЛФ) аланінаміно-трансферази (АЛТ), аспартатамінотрансферази (АСТ), α -амілази) проводили за допомогою напівавтоматичного біохімічного аналізатора Microlab 300 (Vital Scientific, Нідерланди).

Статистичний аналіз здійснювали за допомогою прикладних програм статистичного аналізу Microsoft Excel. Для оцінки міжгрупових відмінностей застосовували параметричний критерій Стьюдента. Різницю між показниками вважали статистично значущою при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. На сьогодні основними біохімічними параметрами діагностики розвитку ожиріння виділяють дослідження білково-ліпідного складу крові. Тому першим етапом нашої роботи було визначення загального вмісту тригліцеридів, холестеролу, ліпопротеїнів високої (ЛПВЩ) та низької (ЛПНЩ) щільності в сироватці крові щурів експериментальних моделей ожиріння (рис.1).

В результаті дослідження було показано збільшення вмісту тригліцеридів (рис. 1, А) у сироватці крові щурів моделі "фруктоза" в 2 рази ($p < 0,05$), порівняно з даними контрольної групи. Вміст тригліцеридів в сироватці крові щурів, що знаходились на висококалорійній дієті зростає в 1,3 рази ($p < 0,05$), порівняно з контрольними показниками. 10-тижнєве споживання 10% розчину фруктози призводило до зниження вмісту загального холестеролу в сироватці крові в 1,7 разів ($p < 0,05$), порівняно з даними контрольної групи. Вміст холестеролу в крові щурів, що споживали висококалорійну дієту знижувався в 1,4 рази ($p < 0,05$), порівняно з контрольними показниками (рис. 1, Б). Дослідження вмісту ЛПНЩ в сироватці крові щурів дослідних груп "фруктоза" та "ВКД" показало збільшення вмісту даних ліпопротеїнів в 1,3 рази ($p < 0,05$) та в 1,6 разів ($p < 0,05$), відповідно, порівняно з показниками контрольної групи (рис. 1, В). Вміст ЛПВЩ в сироватці крові щурів групи "фруктоза" знижувався в 1,7 разів ($p < 0,05$) та в 1,4 рази ($p < 0,05$) у тварин групи "ВКД", порівняно з даними контролю (рис. 1, Г).

Отримані дані свідчать про розвиток дисбалансу у білково-ліпідному складі крові щурів дослідних груп. Зафіксоване нами збільшення вмісту тригліцеридів в крові, поряд зі збільшенням вмісту ЛПНЩ може свідчити про розвиток гіпертригліцеридемії – метаболічного розладу, прогресування якого характерне при ожирінні, метаболічному синдромі та цукровому діабеті 2 типу [5]. В свою чергу це може призвести до розвитку ішемічної хвороби серця, інфаркту міокарда, атеросклерозу та тромбозу судин мозку. Зниження вмісту ЛПВЩ та загального холестеролу в крові щурів дослідних груп може свідчити про порушення засвоєння, або синтезу холестеролу в організмі, що на фоні зростання вмісту тригліцеридів та ЛПНЩ може призвести до розвитку та прогресування серцево-судинних захворювань.

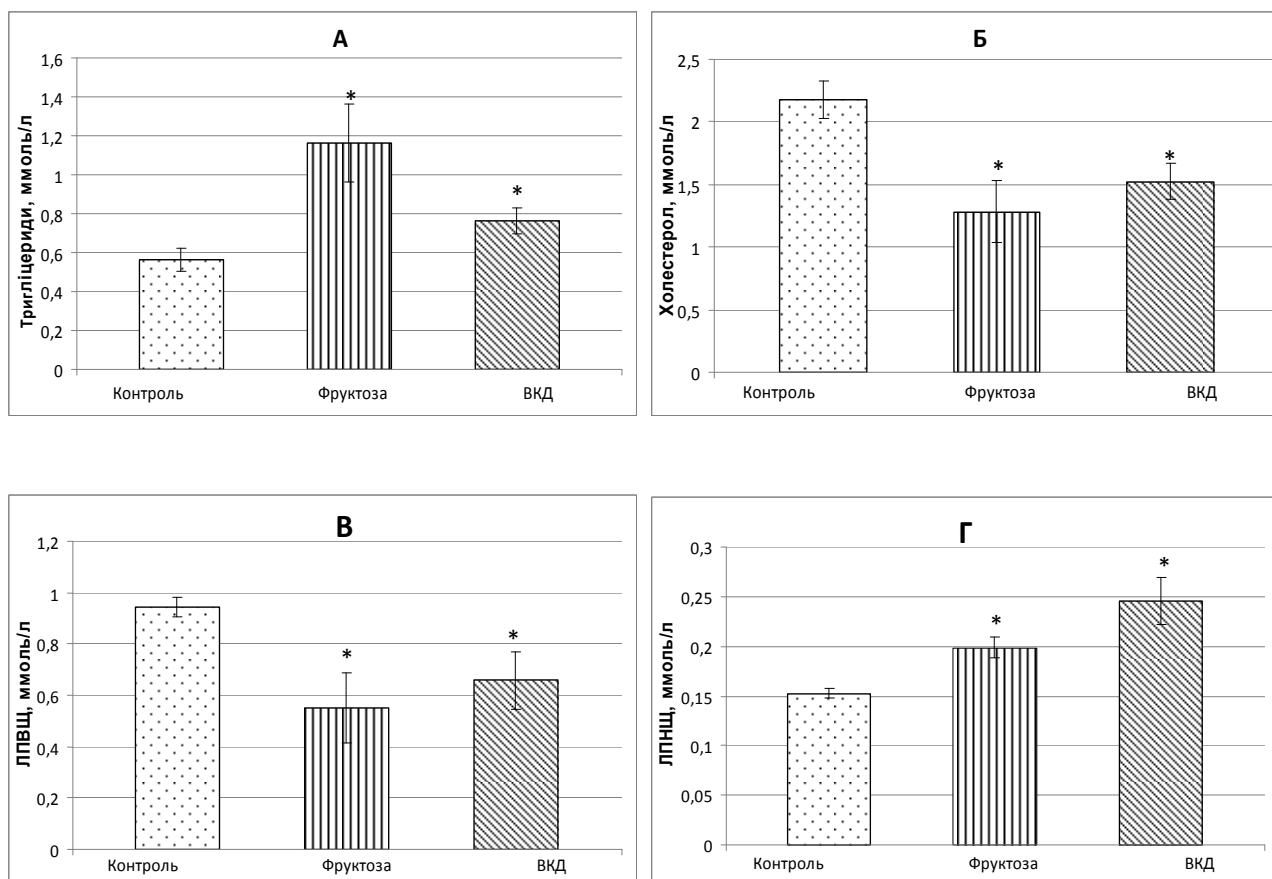


Рис. 1. Концентрація тригліцеридів (А), холестеролу (Б), ЛПВЩ (В), ЛПНЩ (Г) у сироватці крові контрольних щурів та тварин експериментальних моделей ожиріння ("Фруктоза", "ВКД") ($M \pm m$; $n = 10$)

* – $p < 0,05$ різниці достовірні по відношенню до контролю.

Наступним етапом нашого дослідження було визначення основних показників біохімічного аналізу сироватки крові щурів, за якими можна оцінити функціональ-

ний стан організму та охарактеризувати метаболічні перетворення, що відбуваються на фоні розвитку експериментального ожиріння.

Таблиця 1. Показники біохімічного аналізу сироватки крові щурів експериментальних моделей ожиріння ("Фруктоза", "ВКД") ($M \pm m$; $n = 10$)

	Контроль	Фруктоза	ВКД
Креатинін, мкмоль/л	45,85±0,84	65,54±4,91*	54,78±4,03*
Сечовина, ммоль/л	10,38±1,94	6,51±1,02*	8,82±1,67
Білірубін загальний, мкмоль/л	3,9±0,41	1,06±0,36*	2,9±0,5*
Глюкоза, ммоль/л	4,25±0,35	6,58±0,65*	7,35±0,76*
α -амілаза, од/л	592,4±15,3	375,8±78,1*	523±83
АЛТ, од/л	85,64±16,7	31,83±10,4*	46,94±10,6*
АСТ, од/л	195,225±18,3	177,73±37,3	143,5±19,2*
ЛФ, од/л	497,3±108	253±57,7*	270,8±61*

*- $p < 0,05$ різниці достовірні по відношенню до контролю.

На сьогодні в клінічній практиці широкого розповсюдження набуло визначення активності маркерних ферментів для оцінки функціонального стану організму. Одними з таких є аспартатамінотрансфераза (АСТ) та аланінамінотрансфераза (АЛТ) – ферменти з групи трансаміназ, що беруть участь у реакціях переамінування амінокислот в процесах білково-вуглеводного обміну. Активність даних ферментів найчастіше використовується в діагностиці захворювань печінки, інфаркту міокарду, ниркової недостатності та дефіциту вітамінів групи В. В результаті досліджень нами було показано зниження активності АЛТ та АСТ в сироватці крові щурів експериментальних моделей ожиріння порівняно

з даними контролю (табл. 1). Отримані дані вказують на можливий розвиток дефіциту вітаміну В6, який широко розповсюджений у хворих на ожиріння [6]. Лужні фосфатази (ЛФ) – це група ізоензимів, що беруть участь у процесах дефосфорилування ряду біологічно активних молекул. В клінічній практиці визначення їх активності в крові використовується для діагностики захворювань гепатобілярної та скелетної систем, а також при авітамінозах. Нами було показано зниження активності ЛФ в сироватці крові щурів моделей "фруктоза" та "ВКД" порівняно з показниками контрольної групи (табл. 1). Зниження активності ЛФ ймовірно пов'язане з дефіцитом вітамінів В6 та В12, що розвивається при прогресуванні

ожиріння [6,7]. Також нами було показано зниження вмісту сечовини та загального білірубину в сироватці крові щурів експериментальних моделей ожиріння (табл.1). Зниження вмісту сечовини на фоні зниження активності маркерних гепатичних ферментів може свідчити про розвиток дисбалансу у синтетичній функції печінки, що ймовірно пов'язане з жировою інфільтрацією цього органу. За даними літератури [8] зниження вмісту загального білірубину в сироватці крові відбувається при розвитку ішемічної хвороби серця, що є ускладненням ожиріння.

Показано зниження активності маркерного ферменту стану панкреатичної залози – α -амілази в сироватці крові щурів дослідних груп (табл. 1). Згідно з даними літератури [9], зниження активності α -амілази в крові хворих на ожиріння спостерігається під час розвитку неалкогольної жирової Кратинін – це кінцевий продукт розпаду креатинфосфату в організмі теплокровних тварин та людини. Креатинін утворюється в м'язах та виділяється в кров, звідки відфільтровується нирками та виводиться з організму разом з сечею. Тому визначення концентрації цієї речовини часто застосовується в клінічній практиці для діагностування захворювань нирок. В результаті дослідження було показано збільшення концентрації креатиніну в сироватці крові щурів експериментальних моделей ожиріння, порівняно з показниками контрольної групи (табл. 1). Підвищення концентрації креатиніну в крові щурів дослідних груп може вказувати на розвиток хронічного захворювання нирок, що часто діагностується у хворих з морбідною формою ожиріння [10]. З літератури відомо [11], що 85% хворих на цукровий діабет 2 типу страждають на ожиріння, тому в клінічній практиці широко використовується визначення рівня глікемії натще – інтегрального показника, що характеризує зміни у вуглеводному обміні організму. В результаті досліджень нами було показано збільшення концентрації глюкози в крові щурів моделей "фруктоза" та "ВКД", порівняно з контролем (табл.1). Отримані результати свідчать про розвиток гіперглікемії у щурів дослідних груп, що ймовірно пов'язано зі зниженням поглинання глюкози в печінці, зумовленим її

жировою інфільтрацією; відносною функціональною недостатністю β -клітин та зміною чутливості до інсуліну на рівні рецепторів тканин-мішеней.

Висновок. Таким чином, показано, що 10-тижневе вживання щурами висококалорійної дієти та 10% розчину фруктози призводило до розвитку ожиріння, що підтверджується змінами ключових біохімічних показників крові. Отримані результати дозволяють стверджувати, що дані моделі є адекватними та близькими за біохімічними показниками до ожиріння у людини і можуть бути використані в дослідженнях на тваринах для більш поглибленого вивчення біохімічних та молекулярних механізмів розвитку та прогресування даної патології.

Список використаних джерел

1. World Health Organization. Obesity and overweight // WHO Fact sheet. – 2013. – №311. – P. 1-2.
2. Пономарьов П. Х. Потенційна небезпечність швидкої їжі // Вісник Львівської комерційної академії. – 2009. – №10. – С.6-10
3. Sanchez-Lozada L.G., Tapia E., Jimenez A., et al. Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. // American journal of physiology. Renal physiology. – 2007. – №292. – P. 423-429.
4. Xiu-Hua Shen, Qing-Ya Tang, Juan Huang, Wei Cai. Vitamin E regulates adipocytokine expression in a rat model of dietary-induced obesity. // Experimental Biology and Medicine. – 2010. – №235. – P. 47-51.
5. Zaman M., Leray V., Le Bloc'h J., et al. Lipid profile and insulin sensitivity in rats fed with high fat or high-fructose diets // British Journal of Nutrition. – 2011. – №106. – P. 206-210.
6. Aasheim E.T., Hofsø D., Hjeltnes J., et al. Vitamin status in morbidly obese patients: a cross-sectional study. // American Society for Clinical Nutrition. – 2008. – №87. – P. 362-369.
7. Harnroongroj T., Jintaridhi P., Vudhivai N., et al. B vitamins, vitamin C and hematological measurements in overweight and obese Thais in Bangkok. // Journal of the Medical Association of Thailand. – 2002. – №85. – P. 17-25.
8. Щербинина, М. Б. Низкий уровень билирубина крови: возможное диагностическое и прогностическое значение // Клиническая медицина. – 2007. – № 10. – С. 10-14.
9. Wu W.C., Wang C.Y., Association between non-alcoholic fatty pancreatic disease (NAFPD) and the metabolic syndrome: case-control retrospective study. // Cardiovascular Diabetology. – 2013. – №20. – P. 71-77.
10. Eknoyan G. Obesity and chronic kidney disease // Nefrologia. – 2011. – №31. – P. 397-403.
11. World Health Organization. Conquering suffering, enriching humanity. // The world health report. – 1997. – №92. – P. 1-168.

Надійшла до редколегії 18.09.13

Т. Карповец, асп., А. Нагирняк, студ., В. Конопельнюк, канд. биол. наук, О. Савчук, д-р биол. наук, Л. Остапенко, проф.
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

АНАЛИЗ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СЫРОВАТКИ КРОВИ ПРИ ВОСПРОИЗВЕДЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЕЙ ОЖИРЕНИЯ

Проведен анализ основных биохимических показателей сыворотки крови крыс экспериментальных моделей ожирения. Установлены изменения исследуемых показателей сыворотки крови, которые совпадают с клинической картиной развития ожирения у человека. Сделан вывод, что данные модели являются адекватными и близкими за биохимическими показателями к ожирению у человека и могут быть использованы в исследованиях патогенеза данного заболевания на животных.

Ключевые слова: сыворотка крови, экспериментальная модель ожирения.

T. Karpovetz, PhD student, A. Nagirnyak, PhD stud, V. Konopelnuyk, PhD, A. Savchuk, D.Sc, L. Ostapchenko, Prof.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

ANALYSIS BIOCHEMICALLY INDICATORS IN SERUM WHEN EXPERIMENTAL MODELS OBESITY

Basic biochemical parameters of blood serum in rat models of obesity have been analyzed. Changes in the studied parameters of rat blood serum, which coincide with the clinical development of obesity in humans, have been found. It was concluded that these models are adequate and are close by biochemical parameters to human obesity and can be used in studies of the pathogenesis of the disease in animals.

Key words: blood serum, experimental models obesity.

УДК 616.6:616.8

А. Пустовалов, доц., М. Матвієнко, асп.,
І. Балла, ст. наук. співроб., А. Безлюдна, студ.
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ВПЛИВ ІММОБІЛІЗАЦІЙНОГО СТРЕСУ НА МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ЗМІНИ КЛІТИН ПРЕОПТИЧНОГО ЯДРА ГІПОТАЛАМУСА ЩУРІВ НА РІЗНИХ СТАДІЯХ ЕСТРАЛЬНОГО ЦИКЛУ

Встановлено, що клітини преоптичного ядра гіпоталамуса щурів по-різному реагують на вплив іммобілізаційного стресу. Морфометричні параметри нейроцитів продемонстрували підсилення синтетичних процесів. Натомість, у астроцитах функціональна активність знизилася при дії стресу.

Ключові слова: гіпоталамус, нейроцит, астроцит, іммобілізаційний стрес, естральний цикл.

Вступ. Репродуктивна функція регулюється завдяки взаємодії цілого комплексу структур гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної системи, ключове місце серед яких посідає гіпоталамус. Преоптичне ядро гіпоталамуса є одним з найважливіших центрів регуляції репродуктивної функції. У статевозрілих самців це ядро більше за розмірами, ніж у статевозрілих самок. Така різниця в розмірі зумовлена дією тестостерону в процесі розвитку мозку [6]. При цьому у кастрованих тварин розмір ядра зменшується. Подібні відмінності в об'ємі пов'язані зі змінами у розмірах клітин, а не в їх кількості, оскільки після замісної терапії тестостероном спостерігається відновлення розмірів преоптичного ядра. Слід зазначити, що в преоптичному ядрі синтезуються різні форми гонадоліберину та вазотоксину, а також інші види нейропептидів та нейротрансмітерів (чільне місце в цьому ряді займає нейротензин). Також у преоптичному ядрі знайдено ароматазу, яка бере участь у процесі перетворення тестостерону в естроген [3]. Серед продуктів секреції гіпоталамічних ядер, причетних до регуляції репродуктивної функції, провідна роль належить гонадоліберину (ГнРГ). Саме ГнРГ забезпечує вивільнення лютроліну і фолітроліну гонадотропами аденогіпофіза. Крім того, гонадоліберин здатен впливати на гонади безпосередньо. Принаймні, у гонадах також, як і в преоптичній області гіпоталамуса та аденогіпофізі, є мРНК рецепторів ГнРГ [5]. В гіпоталамусі ГнРГ-вмісні клітини ідентифіковані в преоптичному, паравентрикулярному, перивентрикулярному та супраоптичному ядрах. Вважається, що саме преоптичне ядро інтегрує інформацію, яка надходить від вищевказаних ділянок гіпоталамуса [4].

Дослідження на самках мишей показало зниження альфа-рецепторів естрогену в преоптичній зоні гіпоталамуса при старінні [6]. Інтерналізація естрогеніндукованого μ -опіоїдного рецептора в медіальному преоптичному ядрі опосередковується через активацію рецептора нейропептида-У в аркуатному ядрі самок щурів. Крім того, статевий диморфізм медіального преоптичного ядра знаходить своє відображення в тимчасових істотних відмінностях розміру ядер його нейронів. Важливими й актуальними є дослідження нейронгліальних взаємодій в умовах стресу та їхньої ролі в регуляції розмноження тварин [7]. Загальновідомо, що стресові фактори здатні порушувати регулярність естрального циклу й негативно впливати на репродуктивну здатність організму [1,2].

Метою роботи було дослідження функціональної активності нейроцитів і астроцитів преоптичного ядра гіпоталамуса самок щурів на різних стадіях статевого циклу в умовах іммобілізаційного стресу.

Матеріали та методи. Експеримент проведений на 24 самках щурів *Rattus norvegicus* трьохмісячного віку. Тварин, які перебували на стадії еструса і дієструса, піддавали дії іммобілізаційного стресу протягом 1,5 годин. Наприкінці досліду всі тварини були піддані

анестезії з подальшою декапітацією. Для гістологічних досліджень видаляли преоптичні ядра гіпоталамуса щурів за допомогою стереотаксичного атласу мозку щура. Гіпоталамічні ядра були оброблені за стандартною гістологічною методикою. Зрізи для електронної мікроскопії (завтовшки 30 нм) виготовляли на ультрамікромомі LKB Ultratom ME III TYP (Швеція) 888802. Ультрараструктурне дослідження здійснювали під електронним мікроскопом TEM-125 С (АТ "Селмі", Суми, Україна). На мікрофотографіях, отриманих на збільшенні $\times 2400$, проводили підрахунок параметрів клітин за допомогою програмного забезпечення Scion Image (США). Висновки про функціональну активність клітин робили на основі вивчення наступних морфометричних показників: площа поперечного перерізу ядер нейроцитів і астроцитів; фактор форми ядер нейроцитів та астроцитів; питома кількість ядерних пор – кількість ядерних пор на мкм довжини периметру ядра. Саме в ядра клітини відбуваються енергетичні, транспортні та синтетичні процеси. Тому величина ядра пов'язана з інтенсивністю вищезазначених процесів у клітині. Фактор форми ядра є додатковим показником, який також відображає функціональну активність. Він характеризує ступінь нерівності ядерної оболонки. В дуже активних ядрах каріолема утворює численні випини, за рахунок чого збільшується площа поверхні ядра. Кількість ядерних пор також враховується при оцінці функціонального стану ядер. Їх кількість збільшується при активації синтетичних процесів у ядрі. Отримані результати обробляли з застосуванням стандартних методів варіаційної статистики за допомогою програмного забезпечення Sewss Statistica 7.0. (for Windows). Число досліджуваних об'єктів n в усіх виборках складало не менше 100. Вірогідність різниці між морфометричними показниками контрольної та піддослідних груп щурів у випадку розподілу даних за нормальним законом оцінювали за t -критерієм Стюдента при $p < 0,05$. При непараметричному розподілі використовували критерій Манн-Уїтні.

Результати та їх обговорення. В даному дослідженні розглядалися клітини медіального преоптичного ядра гіпоталамуса. Взагалі преоптичне ядро знаходиться в передньому гіпоталамусі та вміщує медіальне, середнє, латеральне і паравентрикулярне ядра. Основними клітинами нервової тканини вважаються нейрони. Вони мають досить крупні ядра, які в активному стані займають більшу частину цитоплазми. Досить яскравою ознакою нейрона є аксон. В аксоплазмі (цитоплазмі аксона) міститься багато мітохондрій, ендоплазматичного ретикулулу. В місці переходу нейрона в аксон буває помітний апарат Гольджі (Рис.1). Іншою популяцією клітин, які зустрічаються в преоптичному ядрі гіпоталамуса, є астроцити. Ці клітини отримали таку назву за галузисті відростки, через що астроцити можуть нагадувати зірку. Вони оточують нейрони і виконують ряд функцій, пов'язаних з забезпеченням

нормального функціонування нервових клітин. На сьогоднішній день важлива роль астроцитів загальновідома. В даному дослідженні розрізнялися астроцити двох типів: фіброзні та протоплазматичні. Фіброзні астроцити при електронномікроскопічному дослідженні характеризуються світлою цитоплазмою. Ядерна оболонка фіброзних астроцитів може утворювати інвагіна-

ції, а каріоплазма (вміст ядра) характеризується рівномірною електронною щільністю (Рис.1). Протоплазматичні астроцити мають коротші та більш численні відростки, ніж у фіброзних астроцитів. Цитоплазма протоплазматичних астроцитів містить небагато вільних рибосом і мікротрубочок, багата на мітохондрії [8] (Рис.2).

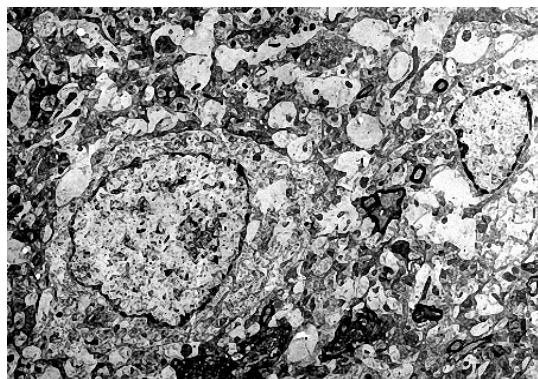


Рис.1. Електронограма преоптичного ядра гіпоталамуса щура

Примітка: Ядро нейрона (ліворуч) та ядро фіброзного астроцита (праворуч). $\times 2400$.

Оцінка активності нейроцитів та астроцитів преоптичного ядра гіпоталамуса щурів на стадії дієструса. Площа поперечного перерізу ядер нейроцитів (НЦ) щурів контрольної групи на стадії дієструса становить $129,64 \pm 3,87$ мкм². Після впливу стресу даний показник достовірно зростає ($155,83 \pm 3,12$ мкм²), що свідчить про інтенсифікацію синтетичної функції в цих клітинах. Фактор форми ядер нейроцитів достовірно зменшується у тварин на стадії дієструса після впливу стресу ($0,45 \pm 0,07$), в порівнянні з контрольною групою ($0,73 \pm 0,09$), що також свідчить про підсилення синтетичних процесів у нейроцитах. Даний показник у контрольній групі щурів та тварин, що зазнали впливу іммобілізаційного стресу, становлять $0,73 \pm 0,11$ і $0,45 \pm 0,07$ відповідно. Нейроцити в групі щурів на стадії дієструса після дії стресу проявили статистично достовірне зменшення питомої кількості ядерних пор ($0,59 \pm 0,09$), на відміну від контрольної групи ($0,91 \pm 0,06$) (табл. 1). Загалом, отримані дані можна розглядати як свідчення зростання синтетичної активності нейроцитів у тварин на стадії дієструса.

У тварин на стадії дієструса фіброзні астроцити (ФА) мають достовірне зменшення за площею поперечного перерізу ядер після дії стресу ($30,24 \pm 2,51$ мкм²), порівняно з контрольною групою ($42,96 \pm 1,72$ мкм²), що свідчить про зниження синтетичної активності в цих клітинах. Фактор форми ядер фіброзних астроцитів не проявляє достовірних змін при стресі ($0,53 \pm 0,06$), порівняно з контрольною групою щурів ($0,58 \pm 0,07$). Показник питомої кількості ядерних пор достовірно знижується після впливу стресу в фіброзних астроцитах тварин на стадії дієструса ($0,71 \pm 0,07$), на відміну від контрольної групи щурів ($0,58 \pm 0,08$) (табл. 1). Таким чином, під дією стресу синтетична активність фіброзних астроцитів зменшується.

Протоплазматичні астроцити (ПА) характеризуються достовірним зменшенням площі поперечного перерізу ядер при дії іммобілізаційного стресу ($22,56 \pm 0,88$), на відміну від тварин контрольної групи на стадії дієструса ($33,61 \pm 0,81$), що вказує на зниження синтетичних процесів у цих клітин. Достовірних змін у показниках фактора форми в протоплазматичних астроцитах щурів при дії стресу не відбувається ($0,82 \pm 0,04$), порівняно з тваринами контрольної групи ($0,79 \pm 0,04$). Питома кількість ядерних пор у цього виду астроцитів у

тварин на стадії дієструса після впливу іммобілізаційного стресу ($0,66 \pm 0,11$) також достовірно не змінюється, порівняно з контрольною групою тварин ($0,74 \pm 0,16$) (табл. 1). Отже, під дією стресу в тварин на стадії дієструса синтетична активність астроцитів, як фіброзних, так і протоплазматичних, знижується.

Оцінка активності нейроцитів та астроцитів преоптичного ядра гіпоталамуса щурів на стадії еструса. Площа поперечного перерізу ядер нейроцитів преоптичного ядра гіпоталамуса щурів на стадії еструса достовірно збільшується після впливу іммобілізаційного стресу ($177,7 \pm 3,62$ мкм²), порівняно з тваринами контрольної групи ($134,26 \pm 2,66$). Цей же показник достовірно зростає в тварин на стадії еструса ($177,7 \pm 3,62$ мкм²), порівняно з щурами на стадії дієструса ($155,83 \pm 3,12$) після впливу стресу. Фактор форми нейроцитів не проявив достовірних змін після дії стресу в тварин на стадії еструса ($0,60 \pm 0,09$), порівняно з щурами контрольної групи ($0,76 \pm 0,05$) на такій же стадії естрального циклу. Вплив стресу також не відзначився на змінах цього показника в тварин на стадії еструса ($0,60 \pm 0,09$), порівняно з тваринами на стадії дієструса ($0,45 \pm 0,07$). Нейроцити не проявили достовірних змін за показником питомої кількості ядерних пор у тварин на стадії еструса після стресового впливу ($0,77 \pm 0,09$), порівняно з щурами контрольної групи ($0,55 \pm 0,08$). Але відбулися достовірне зменшення даного показника у контрольної групи тварин на стадії еструса ($0,55 \pm 0,08$), порівняно з контрольною групою щурів на стадії дієструса ($0,91 \pm 0,06$) (табл. 1). В дослідженнях нейроцитів аркуатного ядра гіпоталамуса щурів такого ж віку й виду не відбувалося достовірного зниження показника кількості ядерних пор при переході від стадії дієструса до еструса [8]. Як видно, нейроцити аркуатного і преоптичного ядер гіпоталамуса по-різному поведуть себе на стадії еструса і дієструса. В аркуатному ядрі вищезазначений морфометричний показник залишається майже без змін у тварин на обох стадіях естрального циклу, в той час як у преоптичному ядрі гіпоталамуса в еструсі знижується кількість ядерних пор у каріолемі нейроцитів. Причина цього явища нез'ясована і потребує додаткових досліджень. Загалом при стресі відбувається зростання синтетичної активності нейроцитів досліджуваних тварин.

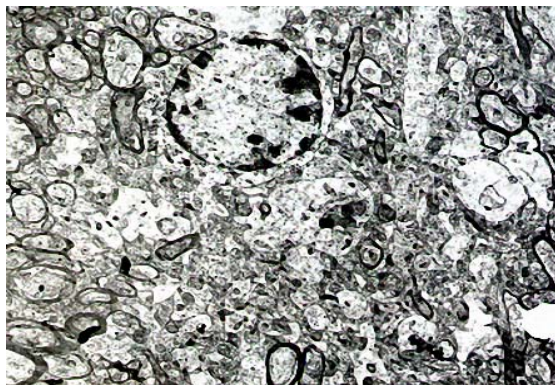


Рис.2. Електроннограма преоптичного ядра гіпоталамуса щура

Примітка: Ядро протоплазматичного астроцита (зверху). $\times 2400$.

Фіброзні астроцити щурів на стадії еструса проявили достовірне зростання площі поперечного перерізу ядер ($85,10 \pm 2,72 \text{ мкм}^2$) при стресі, на відміну від тварин контрольної групи також на стадії еструса ($58,09 \pm 1,31 \text{ мкм}^2$). Імобілізаційний стрес також суттєво вплинув на зростання даного морфометричного показника у тварин на стадії еструса ($85,10 \pm 2,72 \text{ мкм}^2$), порівняно з щурами на стадії дієструса ($30,24 \pm 2,51$). Крім того, відбулося статистично достовірне зростання площі поперечного перерізу ядер нейроцитів у щурів контрольної групи на стадії еструса ($58,09 \pm 1,31 \text{ мкм}^2$), порівняно з щурами також контрольної групи на стадії дієструса ($42,96 \pm 1,72$). Фактор форми ядер клітин не зазнав достовірних змін у тварин на стадії еструса після стресового впливу ($0,55 \pm 0,08$), порівняно з щурами контро-

льної групи на стадії еструса ($0,54 \pm 0,08$). Також не відбулося достовірних змін за даним показником у групах тварин при переході від еструса до дієструса незалежно від стресового впливу. Фіброзні астроцити не показали жодних достовірних змін за показником питомої кількості ядерних пор у тварин на стадії еструса після впливу стресу ($0,85 \pm 0,12$), порівняно з контрольною групою тварин ($0,63 \pm 0,06$) (табл. 1). Достовірних змін у цих групах тварин, порівняно з відповідними групами на стадії дієструса, також статистично не зафіксовано. Ці дані можна інтерпретувати як свідчення певного зростання синтетичної активності фіброзних астроцитів. Загалом у тварин на стадії еструса при стресі спостерігається активація як нейроцитів, так і обох типів досліджуваних астроцитів.

Таблиця 1. Морфометричні показники клітин аркуатного ядра гіпоталамуса щурів

Група тварин		Контроль дієструс	Контроль еструс	Стрес дієструс	Стрес еструс
Параметр	Клітини				
Площа перерізу ядер клітин, мкм^2	НЦ	$129,64 \pm 3,87$	$134,26 \pm 2,66$	$155,83 \pm 3,12^*$	$177,74 \pm 3,62^{\#}$
	ФА	$42,96 \pm 1,72$	$58,09 \pm 1,31^{\#}$	$30,24 \pm 2,51^*$	$85,10 \pm 2,72^{\#}$
	ПА	$33,61 \pm 0,81$	$40,26 \pm 0,63^{\#}$	$22,56 \pm 0,88^*$	$55,33 \pm 1,24^{\#}$
Фактор форми ядер клітин	НЦ	$0,73 \pm 0,09$	$0,76 \pm 0,05$	$0,45 \pm 0,07^*$	$0,60 \pm 0,09$
	ФА	$0,58 \pm 0,07$	$0,54 \pm 0,08$	$0,53 \pm 0,06$	$0,55 \pm 0,08$
	ПА	$0,79 \pm 0,04$	$0,77 \pm 0,05$	$0,82 \pm 0,04$	$0,89 \pm 0,03^*$
Питома кількість ядерних пор	НЦ	$0,91 \pm 0,06$	$0,55 \pm 0,08^{\#}$	$0,59 \pm 0,09^*$	$0,77 \pm 0,09$
	ФА	$0,58 \pm 0,08$	$0,63 \pm 0,06$	$0,71 \pm 0,07$	$0,85 \pm 0,12$
	ПА	$0,74 \pm 0,16$	$0,62 \pm 0,07$	$0,66 \pm 0,11$	$0,62 \pm 0,09$

$\#$ – $p < 0,05$, порівняно з відповідною групою тварин на стадії дієструса;

$*$ – $p < 0,05$, порівняно з відповідною групою тварин, що не піддавалася стресу.

Тварини проявили максимальну кількість статистично достовірних змін за показниками протоплазматичних астроцитів. По-перше, даний вид астроцитів у щурів на стадії еструса достовірно збільшує площу поперечного перерізу ядер після впливу стресу ($55,33 \pm 1,24 \text{ мкм}^2$), на відміну від показника контрольної групи тварин на стадії еструса ($40,26 \pm 0,63 \text{ мкм}^2$). Також достовірно зріс даний морфометричний показник у тварин на стадії еструса ($55,33 \pm 1,24 \text{ мкм}^2$), порівняно з щурами на стадії дієструса ($22,56 \pm 0,88 \text{ мкм}^2$) при впливі імобілізаційного стресу. Крім того, в протоплазматичних астроцитах контрольних груп щурів теж відмічаються достовірні зміни: зростання площі поперечного перерізу ядер клітин у групі тварин на стадії еструса ($40,26 \pm 0,63 \text{ мкм}^2$), порівняно з щурами на стадії дієструса ($33,61 \pm 0,81 \text{ мкм}^2$). Фактор форми ядер достовірно зростає в протоплазматичних астроцитах щурів на стадії еструса після дії стресу ($0,89 \pm 0,03$), на відміну від тварин контрольної групи на стадії еструса ($0,77 \pm 0,05$). Змін цього показни-

ка при переході від еструса до дієструса не відбувається як в контрольних групах тварин, так і в щурів після впливу імобілізаційного стресу. Питома кількість ядерних пор залишається незмінною в щурів на стадії еструса при дії стресу ($0,62 \pm 0,09$), порівняно з цим показником у контрольній групі тварин на стадії еструса, який становить $0,62 \pm 0,07$. Жодних статистично достовірних змін питомої кількості ядерних пор не відбулося у цього виду астроцитів тварин як при переході від однієї стадії репродуктивного циклу до іншої, так і після впливу імобілізаційного стресу. Загалом для протоплазматичних астроцитів притаманне підсилення синтетичних процесів при стресі на тлі еструса (табл. 1).

Висновки. На основі досліджених показників можна заключити, що при імобілізаційному стресі в щурів спостерігається достовірне зростання синтетичної активності нейроцитів преоптичного ядра гіпоталамуса як на стадії дієструса, так і на стадії еструса. Натомість, фіброзні та протоплазматичні астроцити тварин на ста-

дії дієструса реагували на стресорний вплив зниженням синтетичної активності, а на стадії еструса синтетичні процеси в клітинах зростали.

Список використаних джерел

1. Devall A.J. Differential activation of the periaqueductal gray by mild angiogenic stress at different stages of the estrous cycle in female rats / A.J. Devall, T.A. Lovick // *Neuropsychopharmacology*. – 2010. – Vol. 5, № 35. – P. 1174-1185.
2. Goldstein J.M. Sex differences in stress response circuitry activation dependent on female hormonal cycle / J.M. Goldstein, M. Jerram, et al. // *J. Neurosci*. – 2010. – Vol. 2, № 30. – P. 431-438.
3. Panzica G. Sexual dimorphism in the neuronal circuits of the quail preoptic and limbic regions / G. Panzica, C. Viglietti-Panzica, J. Balthazart // *Microsc. Res. Tech.* – 2001. – Vol. 54, №6. – P. 364-374.
4. Panzica G.C. Ultrastructural characterization of the sexually dimorphic medial preoptic nucleus of male Japanese quail / G.C. Panzica, S. Spigolon, C. Castagna // *Cell. Tissue. Res.* – 1995. – Vol. 279. – № 3. – P. 517-527.

5. Sun Y.M. Distribution and regulation by oestrogen of fully processed and variant transcripts of gonadotropin releasing hormone I and gonadotropin releasing hormone receptor mRNAs in the male chicken / Y.M. Sun, I.C. Dunn, et al. // *J. Neuroendocrinol.* – 2001. – Vol.13., №1. – P. 37-49.

6. Yaghmaie F. Caloric restriction reduces cell loss and maintains estrogen receptor-alpha immunoreactivity in the preoptic hypothalamus of female B6D2F1 mice / F. Yaghmaie, O. Saeed, et al. // *Neuroendocrinol. Lett.* – 2005. – Vol. 3, № 26. – P. 197-203.

7. Матвієнко М. Вплив стресу на морфометричні параметри функціональної активності мітохондрій астроцитів і нейроцитів аркуатного та преоптичного ядер гіпоталамуса щурів на різних стадіях статевого циклу / М. Матвієнко, А. Пустовалов, М. Дзержинський // *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія* – 2011. – Т. 1, № 58. – С. 15-17.

8. Пустовалов А. Вплив стресу на морфометричні параметри функціональної активності астроцитів і нейроцитів аркуатного та преоптичного ядер гіпоталамуса щурів на різних стадіях естрального циклу / А. Пустовалов, М. Матвієнко, М. Дзержинський // *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія*. – 2012. – Т. 1, № 61. – С. 17-20.

Надійшла до редколегії 21.10.13

А. Пустовалов, доц., М. Матвієнко, асп., І. Балла, ст. наук. сотр., А. Безлюдна, студ. КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ВЛИЯНИЕ ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА НА MORFOFUNKSIONALNIE IZMENENIYA KLETOK PREOPTICHESKOGO YADRA HIPOTALAMUSA KRYC NA RAZNYKH STADIYAH ESTRALNOGO CYKLA

Установлено, что клетки преоптического ядра гипоталамуса крыс по-разному реагируют на воздействие иммобилизационного стресса. Морфометрические параметры нейронов продемонстрировали усиление синтетических процессов. Зато в астроцитах функциональная активность снизилась при воздействии стресса.

Ключевые слова: гипоталамус, нейроцит, астроцит, иммобилизационный стресс, эстрального цикла.

A. Pustovalov, PhD, M. Matvienko, PhD stud, I. Balla, research woker, A. Bezlyudna, stud Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

IMMOBILIZATION STRESS EFFECT ON MORPHOFUNCTIONAL CHANGES OF CELLS IN RAT HYPOTHALAMIC PREOPTIC NUCLEUS AT DIFFERENT STAGES OF OESTROUS CYCLE

It is established that cells of rat hypothalamic preoptic nucleus respond differently to immobilization stress. Morphometric parameters of the neurocytes demonstrated the increasing of synthesis processes. On the other hand, the functional activity of the astrocytes decreased after stress effect.

Key words: hypothalamus, neurocyte, astrocyte, immobilization stress, oestrous cycle.

УДК 616.33-008.821.14:612.336

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

ПОСЛАБЛЕННЯ КИСЛОТОПРОДУКУЮЧОЇ ФУНКЦІЇ ШЛУНКА ЯК ФАКТОР, ЩО СПРИЯЄ РОЗВИТКУ ПАТОЛОГІЇ ДВНАДЦЯТИПАЛОЇ КИШКИ

Проведено аналіз сучасної наукової літератури за період 1976-2013 років, яка присвячена розгляду тривалого прийому кислотосупресуючих препаратів як фактора, що сприяє виникненню ентеропатій. Результати аналізу показали, що послаблення кислотопродукуючої функції шлунка призводить до розвитку патологічних процесів у дванадцятипалій кишці.

Ключові слова: кислотосупресуючі препарати, кислотопродукуюча функція шлунка, дванадцятипала кишка.

Вступ. Значну кількість патологічних станів шлунково-кишкового тракту (ШКТ) супроводжує знижена кислотність шлункового соку, яка виникає внаслідок порушення секреції гідрохлоридної кислоти парієтальними клітинами (ПК) шлунка. Гіпоацидні стани шлунка мають поліетіологічну природу: вони виникають внаслідок фармакологічного пригнічення кислотної секреції шлунка, супроводжують ряд захворювань (атрофічний гастрит, аутоімунні порушення, інфекція *H. Pylori*, ахілія тощо), в деяких випадках мають генетичну природу (наприклад, мутантні форми субодиноць H^+/K^+ -АТФази парієтальних клітин шлунка), а також розвиваються при старінні організму [1, 2, 3].

Особливу увагу привертає група препаратів, які гальмують кислотну секрецію шлунка: інгібітори H^+/K^+ -АТФази ПК шлунка (інгібітори протонної помпи (ІПП) – омепразол, лансопразол, рабепразол, пантопразол, езомепразол тощо); блокатори м-холінорецепторів ПК шлунка (пірензепін та ін.); антагоністи H_2 -гістамінових рецепторів шлункових ПК (ранітидин, циметидин, нізатидин і фамотидин). Будучи достатньо безпечними,

вони, тим не менше, здатні призводити до диспепсії та дефіциту мікроелементів, підвищення рівня гастрину в крові (гіпергастринемія), а також розвитку дисбіотичних станів та запальних процесів у різних відділах ШКТ [4].

Протягом останнього часу з'явилися дані про те, що тривалий прийом ІПП може бути асоційований із підвищенням ризику виникнення ентеропатій [5, 6, 7]. Треба відмітити, що питанню розвитку патологічних процесів у дванадцятипалій кишці (ДПК) за умов вживання блокаторів кислотної секреції шлунка приділяється недостатньо уваги. Існуючі дані в більшості випадків є фрагментарними, а тонкі молекулярні механізми взагалі не розглядаються.

Представлений систематичний аналіз літератури присвячений огляду наявних сьогодні літературних даних щодо зазначених питань та має на меті узагальнити сучасні уявлення про роль кислотності шлункового соку в розвитку патологічних процесів у ДПК.

Методи дослідження. Усі процедури, проведені для даного систематичного огляду, здійснено згідно з остан-

німи рекомендаціями по проведенню мета-аналізів та систематичних оглядів. В даній роботі ми дотримувалися положень інструкції PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses) [8].

Нашою метою був пошук статей, в яких оцінювався зв'язок між зниженням кислотопродукуючої функції шлунка та патологією дванадцятипалої кишки, а також клінічні дані та історії хвороб, які стосуються даної тематики.

В якості баз даних для пошуку використано MEDLINE Національної медичної бібліотеки США із пошуковим сервісом PubMed, а також архів HighWire Press Стенфордського університету (штат Каліфорнія, США).

При відборі статей виключались дублікати, а також статті, які прямо не відповідали темі (слід пам'ятати, що до пошукового результату потрапляють усі статті, які мають в назві або анотації ключові слова, що, однак, не гарантує прямої їх відповідності конкретній темі). До остаточного огляду включено лише ті статті, які прямо стосуються зв'язку між послабленням кислотопродукуючої функції шлунка та патологією дванадцятипалої кишки.

Результати та їх обговорення. Після первинного пошуку було загалом ідентифіковано 425 статей. Після ознайомлення із назвами та анотаціями знайдених статей було, по-перше, виключено дублікати, а, по-друге, відкинуто статті, суть яких не відноситься до теми дослідження. Загалом до остаточного огляду включено 41 експериментальну та оглядову статтю. Обрані статті було опубліковано в період між 1976 та 2013 роками.

Тринадцять з них присвячені розгляду ризику бактеріальної колонізації тонкого кишечника (БКТК) при застосуванні блокаторів кислотної секреції шлунка. Так, у швейцарському дослідженні групи Fried et al. [9] продемонстровано здатність ІПП – омепразолу викликати бактеріальну колонізацію ДПК у пацієнтів з виразкою шлунка за умов прийому препарату (20 та 40 мг на добу) протягом п'яти тижнів. Наряду з цим, у роботі нідерландських дослідників Nelis et al. [10] показано, що шеститижневе введення омепразолу (40 мг на добу) пацієнтам не призводило до БКТК. В 1996 році в Нідерландах групою вчених Brummer et al. [11] були отримані схожі дані за умов чотирьохтижневого введення омепразолу (20 мг на добу) хворим з гострою виразкою дванадцятипалої кишки. В той же час, у дослідженні групи Lewis et al. [12] спостерігалось порушення функціонування кишечника та бактеріальна колонізація дванадцятипалої кишки при прийомі омепразолу (20 мг на добу) протягом чотирьох тижнів у пацієнтів з виразкою шлунка. В одному з досліджень початку 1990-х років, групою Goenka et al. [13] вивчалися наслідки використання ІПП та H₂-антагоністів при лікуванні хворих з виразкою дванадцятипалої кишки. Показано, що використання циметидину, фамотидину та омепразолу протягом шести тижнів супроводжувалось ростом грибів роду *Candida* у ДПК. В дослідженні, проведеному у Великобританії групою Pereira et al. [14], яке присвячене гіпохлоргідрії викликаній вживанням препаратів, що гальмують кислотну секрецію шлунка, продемонстровано істотне підвищення кількості анаеробних грамнегативних та аеробних бактерій у ДПК літніх пацієнтів при двомісячному введенні омепразолу (20 мг на добу) та ранітидину (300 мг двічі на добу). У літературному огляді американської групи Chey et al. [15], що включає дані за 1994-2009 роки, підтверджується взаємозв'язок між терапією ІПП та підвищенням частоти розвитку бактеріальної колонізації тонкого кишечника. Два ґрунтовних дослідження італійських груп вчених на чолі з Lombardo et al. [16] та Compare et al. [17] навели переконливі дані про наявність зв'язку між прийомом кислотосупресуючих препаратів та розвитком БКТК. У першій

з робіт [16], яка включала результати 200 хворих з гастроєзофагеальною рефлюксною хворобою (ГЕРХ), що проходили тривалу (в середньому 36 місяців) терапію ІПП (езопазол 35%, лансопазол 30%, омепразол 15%, рабепразол 10%, пантопазол 10% – стандартне дозування): спостерігалась бактеріальна колонізація тонкого кишечника у 40-50% випадків. В наступному дослідженні [17] показаний розвиток БКТК у 62% з 42 пацієнтів, що приймали інгібітори протонної помпи (езомепразол 20 мг двічі на добу) протягом шести місяців у якості терапії ГЕРХ.

У статті нідерландських дослідників van Vlerken et al. [18] описано історії хвороб 84 пацієнтів з цирозом печінки, що вживали ІПП (лантопазол чи омепразол по 40 мг на добу) протягом 30 місяців, в середньому. Також наводяться дані експериментів проведених на щурах, які приймали омепразол (400 мг/кг на добу) шість тижнів. Вченими продемонстровано чіткий зв'язок етіології бактеріальної колонізації тонкого кишечника саме з застосуванням блокаторів кислотної секреції шлунка. В той же час, у дослідженні американських науковців Ratuapli et al. [19], що включало 1191 пацієнта, не відмічалась чітка кореляція між терапією ІПП та розвитком БКТК. Натомість, у роботі групи Jacobs et al. [20], які вивчали історії хвороб 150 пацієнтів, підтверджується взаємозв'язок між тривалою терапією ІПП та підвищенням частоти розвитку бактеріальної колонізації тонкого кишечника. Нарешті, статистичний мета-аналіз американських вчених Lo et al. [5] 2013 року показав наявність достовірного підвищення ризику бактеріальної колонізації тонкого кишечника при прийомі ІПП. Існує велика кількість суперечливих даних стосовно інших ентеропатій викликаних прийомом кислотосупресуючих препаратів. В США група вчених Serfaty-Lacrosniere et al. [21] відмітила, що омепразол-індукована короточасна гіпохлоргідрія не впливає на всмоктування Ca, Mg, Zn, P з їжі у кишечнику здорових пацієнтів. У статті російських дослідників Daminov et al. [22] продемонстровано, що омепразол активував глутатіонову систему ДПК на фоні ацетатної виразки дванадцятипалої кишки у щурів, що може бути пов'язано з розвитком окисного стресу у ДПК. У роботі італійських науковців Bianchi Porro et al. [23] проаналізовано історії хвороб 98 пацієнтів з артритом чи артрозом та індукованими вживанням нестероїдних протизапальних препаратів (НПЗП) виразками шлунка або дванадцятипалої кишки, що приймали омепразол (20 мг) для терапії протягом 4-8 тижнів. Показано позитивний вплив короткотривалого введення омепразолу на загоєння НПЗП-індукованих виразок. В 1998 році дослідники Jeppesen et al. [24] описали посилення абсорбції води в кишечнику без впливу на поглинання Na, Ca, Mg, N, жирів та вуглеводів омепразолом (40 мг двічі на день) за умов двох п'ятиденних курсів у пацієнтів з кишковою резекцією. Також ідентифікували незначний ефект ранітидину (150 мг двічі на день) на аналогічні показники, що може бути пов'язаним з низькими дозами препарату.

Група вчених Rasmussen et al. [25] спостерігала випадки гальмування евакуації їжі зі шлунка та незначного уповільнення постпрандіальної моторики кишечника у здорових людей після десятиденного прийому омепразолу (40 мг на добу).

В одному з перших досліджень XX століття Dorta et al. [26] на тему НПЗП-викликаних пошкоджень (диклофенак 50 мг) у людей показано, що прийом омепразолу (40 мг) протягом двох тижнів не впливав на загоєння виразкових уражень шлунка та дванадцятипалої кишки.

У статті науковців Hendriks et al. [27] відмічено, що однорічне введення лансопазолу (15 мг на добу) част-

ково зменшує проникність стінки кишечника у пацієнтів з кістозним фіброзом підшлункової залози.

В 2004 році у США група вчених Koch et al. [28] підтвердила помірне посилення антиоксидантного захисту тканин проксимальної частини ШКТ у мишей при десятиденному введенні омепразолу (0,5-50 мг/кг на добу).

В роботі японських дослідників Ichikawa et al. [29] продемонстровано захисну дію від виразкових ушкоджень на слизову оболонку (СО) кишечника щурів однократного введення лансопразолу (у дозі 1 мг/кг) перед ішемією-реперфузією.

У 2005 році американськими науковцями Goldstein et al. [30] описано збільшення ерозії СО тонкого кишечника при сумісному прийомі омепразолу (20 мг на добу) та нестероїдних протизапальних препаратів (целекоксиб – 200 мг, напроксен – 500 мг два рази на день), ніж при окремому вживанні НПЗП протягом двох тижнів у здорових пацієнтів. На відміну від вищезгаданої роботи, група Pozzoli et al. [32] спостерігала протекторний протизапальний та антиоксидантний ефект ІПП (омепразол, лансопразол у дозі 90 мкмоль/кг) на СО тонкої кишки щурів при короточасному введенні на фоні впливу НПЗП (індометацин 20 мг/кг). У дослідженні, проведеному в Туреччині групою Cadir et al. [33], також показано протекторну дію короткотривалого (2-5 діб) прийому омепразолу (20 мг/кг на добу) при некротичному ентероколіті у щурів. Натомість, у роботі великобританських науковців Hawkey et al. [34] продемонстровано збільшення пошкоджень слизової оболонки тонкого кишечника здорових пацієнтів при сумісному прийомі омепразолу (20 мг на добу) та нестероїдних протизапальних препаратів, ніж при окремому вживанні НПЗП протягом шістнадцяти днів.

Японською групою вчених Higuchi et al. [33] відмічалась здатність лансопразолу (60-100 мг/кг) частково протидіяти пошкодженню СО тонкого кишечника щурів, що обумовлене вживанням НПЗП (індометацин 10 мг/кг), на відміну від омепразолу (30-100 мг/кг). В той час, як у ґрунтовному експерименті канадської групи Wallace et al. [6] описано збільшення НПЗП-індукованих пошкоджень (напроксен або целекоксиб 10 мг/кг двічі на добу) слизової оболонки тонкого кишечника щурів при вживанні антисекреторних доз (10 мг/кг двічі на добу) омепразолу та лансопразолу протягом дев'яти днів.

Не менш цікавим є вплив інгібіторів протонної помпи безпосередньо на стан дванадцятипалої кишки. Науковцями Knutson et al. [36] підтверджується, що застосування ІПП (омепразол у дозі 14 мг/кг двічі на день) та H₂-антагоністів (ранітидин дозуванням 300 мг/кг 2 р/д) не впливає на секрецію бікарбонатів у ДПК щурів протягом 4-6 тижнів.

У статті американських вчених Erickson et al. [37] спостерігається підвищення чутливості СО ДПК до етанолового пошкодження у щурів при введенні омепразолу (10 мг/кг) протягом 29 днів, але механізм встановленої взаємодії залишається невідомим.

У дослідженні групи Mertz-Nielsen et al. [38] показана здатність високих доз омепразолу стимулювати секрецію бікарбонатів у проксимальному відділі ДПК здорових пацієнтів, на відміну від ранітидину. Перша група пацієнтів отримувала омепразол по 60 мг на добу протягом 3 днів та 80 мг ранітидину за годину до перфузії, друга – омепразол по 60 мг за 12 та 2 години до перфузії та ранітидин (50 мг/год) під час процедури, третя – ранітидин по 900 мг за 12 та 2 години до перфузії та 50 мг/год під час процедури.

Особливий інтерес має розгляд гіпергастринемії як фактора, що сприяє виникненню ентеропатій, оскільки тривале зниження кислотопродукуючої функції шлунка супроводжується підвищенням рівня гастрину [2]. Так, в

2006 році дослідниками Merchant et al. [39] відмічено зростання ризику розвитку спорадичної гіперплазії G-клітин у ДПК пацієнтів на фоні довготривалого прийому ІПП. Шведськими науковцями Hakanson et al. [40] відмічена здатність омепразолу (400 мкмоль/кг на добу) викликати гіпергастринемію за умов десятиденного введення препарату курам, свинкам та хом'якам. У статті Gregor et al. [40] продемонстровано, що хронічна гіпергастринемія сприяє гіпертрофії печінки та кишечника у щурів. В США науковцями Deveney et al. [42] були отримані схожі дані стосовно гіпертрофії СО кишечника та ПЗ тварин.

Групою вчених Schwartz et al. [43] описана здатність гастрину стимулювати синтез ДНК в клітинах тонкого кишечника щурів, а також підвищувати всмоктування білків та вуглеводів у ньому. У роботі дослідників Conteas et al. [43] показана здатність гастрину (50-500 нг/мл) стимулювати проліферацію клітин крипти тонкого кишечника.

В Ізраїлі група Lysy et al. [45] підтвердила підвищення рівня пепсиногену А та гастрину в крові на фоні зниження PAF (фактор активації тромбоцитів) у СО ДПК за умов двохтижневого лікування омепразолом (20 мг на добу) пацієнтів із дуоденальною виразкою.

У статті науковців Rasmussen et al. [46] описано зниження секреції холецистокініну, який продукується І-клітинами СО ДПК та проксимальним відділом тонкої кишки, та зростання рівня гастрину при десятиденному введенні омепразолу (40 мг на добу).

У дослідженні, проведеному вченими Wang et al. [47], спостерігали здатність гастрину підвищувати проліферацію епітелію ДПК щурів через активацію орнітіндекарбоксилази, що є однією з найбільш ранніх біохімічних подій, пов'язаних з індукцією клітинної проліферації.

В 2006 році групою вчених Ottewell et al. [48] на INS-Gas мишах з надекспресією гастрину були отримані дані стосовно позитивної кореляції між регенерацією крипти після їх пошкодження та гіпергастринемією.

Отже, однозначної відповідності між прийомом кислотосупресуючих препаратів та розвитком ентеропатій у більшості дослідженнях не показано. В той же час, все більше даних свідчить про істотне підвищення ймовірності розвитку патологічних станів дванадцятипалої кишки в умовах терапії блокаторами кислотної секреції [37, 39]. На жаль, дуже мало уваги приділено вивченню зв'язку між ІПП та станом ДПК. Точний механізм, що лежить в основі патологій дванадцятипалої кишки в умовах прийому кислотосупресантів на сьогодні невідомий. Тим не менше, наявні дані дозволяють висувати обґрунтовані гіпотези.

Показано, що при тривалому застосуванні ІПП (та, в меншій мірі, антагоністів H₂-рецепторів) розвивається патологічний для організму стан гіпоацидності, що характеризується стійким підвищенням значення рН шлункового соку [7]. Відповідна кислотність шлункового соку відіграє важливу роль в захисті від мікроорганізмів. Нестача гідрохлоридної кислоти ослаблює бактерицидну дію шлункового соку, що сприяє колонізації шлунково-кишкового тракту патогенною мікрофлорою та розвитку запальних процесів у ШКТ, зокрема в ДПК [6, 9, 11]. Слід зазначити, що значну роль у розвитку патологій дванадцятипалої кишки відіграє порушення окисно-антиоксидантної рівноваги в епітеліоцитах ДПК та розвиток окисного стресу, що, зокрема, підтверджується нашими дослідженнями [49].

Виходячи з цього, для більш точного та детального з'ясування механізмів, що знаходяться в основі зв'язку між прийомом блокаторів кислотної секреції шлунка та підвищенням ризику розвитку патологій дванадцятипа-

лої кишки, необхідне проведення подальших досліджень, в яких особливу увагу буде приділено ефектам тривалого застосування ІПП, як основної та найбільш поширеної групи препаратів, що застосовуються в терапії кислотозалежних захворювань.

Висновки. Отримані в ході даного систематичного огляду результати свідчать про те, що зниження кислотопродукуючої функції шлунка за умов тривалого прийому блокуаторів кислотної секреції призводить до патологічних станів дванадцятипалої кишки. Детальне вивчення молекулярних механізмів дії кислотосупресуючих препаратів на ШКТ, зокрема, ДПК, дозволить оптимізувати схеми їх прийому та можливі шляхи протекції органів травної системи пацієнтів.

Список використаних джерел

1. Beales I.L. H. pylori-associated hypochlorhydria // *Gastroenterology*. – 1998. – Vol. 3. – P. 618–621.
2. Jensen R. Consequences of long-term proton-pump blockade: insights from studies of patients with gastrinomas // *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* – 2006. – Vol. 98, № 1. – P. 4–19.
3. Salles N. Basic mechanisms of the aging gastrointestinal tract // *Dig. Dis.* – 2007. – Vol. 25. – P. 112–117.
4. Shin J., Vagin O., Munson K., Kidd M., Modlin I., Sachs G. Molecular mechanisms in therapy of acid-related diseases // *Cellular and molecular life sciences*. – 2008. – Vol. 65, №2. – P. 264–281.
5. Lo W.K., Chan W.W. Proton pump inhibitor use and the risk of small intestinal bacterial overgrowth: a meta-analysis // *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. – 2013. – Vol. 11, №5. – P. 483–490.
6. Wallace J.L., Syer S., Denou E., de Palma G., Vong L., McKnight W., Jury J., Bolla M., Bercik P., Collins S.M., Verdu E., Ongini E. Proton pump inhibitors exacerbate NSAID-induced small intestinal injury by inducing dysbiosis // *Gastroenterology*. – 2011. – Vol. 141, №4. – P. 1314–1322.
7. Thomson A., Sauve M., Kassam N., Kamitakahara H. Safety of long-term use of proton pump inhibitors // *World Journal of Gastroenterology*. – 2010. – Vol. 16, №19. – P. 2323–2330.
8. Liberati A., Altman D., Tetzlaff J., Mulrow C., Gøtzsche P., Ioannidis J., Clarke M., Devereaux P., Kleijnen J., Moher D. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration // *British medical journal*. – 2009. – Vol. 339. – P. b2700.
9. Fried M., Siegrist H., Frei R., Froehlich F., Duroux P., Thorens J., Blum A., Bille J., Gonvers J.J., Gyr K. Duodenal bacterial overgrowth during treatment in outpatients with omeprazole // *Gut*. – 1994. – Vol. 35, №1. – P. 23–26.
10. Nelis G.F., Engelage A.H., Samson G. Does long-term inhibition of gastric acid secretion with omeprazole lead to small intestinal bacterial overgrowth? // *Netherlands Journal of Medicine*. – 1994. – Vol. 45, №3. – P. 93–100.
11. Brummer R.J., Stockbrügger R.W. Effect of nizatidine 300 mg at night and omeprazole 20 mg in the morning on 24-hour intragastric pH and bacterial overgrowth in patients with acute duodenal ulcer // *Digestive Diseases and Sciences*. – 1996. – Vol. 41, №10. – P. 2048–2054.
12. Lewis S.J., Franco S., Young G., O'Keefe S.J. Altered bowel function and duodenal bacterial overgrowth in patients treated with omeprazole // *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. – 1996. – Vol. 10, №4. – P. 557–561.
13. Goenka M.K., Kochhar R., Chakrabarti A., Kumar A., Gupta O., Talwar P., Mehta S.K. Candida overgrowth after treatment of duodenal ulcer. A comparison of cimetidine, famotidine, and omeprazole // *Journal of Clinical Gastroenterology*. – 1996. – Vol. 23, №1. – P. 7–10.
14. Pereira S.P., Gainsborough N., Dowling R.H. Drug-induced hypochlorhydria causes high duodenal bacterial counts in the elderly // *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. – 1998. – Vol. 12, №1. – P. 99–104.
15. Chey W.D., Spiegel B. Proton pump inhibitors, irritable bowel syndrome, and small intestinal bacterial overgrowth: coincidence or Newton's third law revisited? // *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. – 2010. – Vol. 8, №6. – P. 480–482.
16. Lombardo L., Foti M., Ruggia O., Chiechio A. Increased incidence of small intestinal bacterial overgrowth during proton pump inhibitor therapy // *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. – 2010. – Vol. 8, №6. – P. 504–508.
17. Compare D., Pica L., Rocco A., De Giorgi F., Cuomo R., Samelli G., Romano M., Nardone G. Increased incidence of small intestinal bacterial overgrowth during proton pump inhibitor therapy // *European Journal of Clinical Investigation*. – 2010. – Vol. 8, №6. – P. 380–386.
18. van Vliet L.G., Huisman E.J., van Hoek B., Renooij W., de Rooij F.W., Siersema P.D., van Erpecum K.J. Bacterial infections in cirrhosis: role of proton pump inhibitors and intestinal permeability // *European Journal of Clinical Investigation*. – 2012. – Vol. 42, №7. – P. 760–767.
19. Ratuapli S.K., Ellington T.G., O'Neill M.T., Umar S.B., Harris L.A., Foxx-Orenstein A.E., Burdick G.E., Dibaise J.K., Lacy B.E., Crowell M.D. Proton pump inhibitor therapy use does not predispose to small intestinal bacterial overgrowth // *American Journal of Gastroenterology*. – 2012. – Vol. 107, №5. – P. 730–735.
20. Jacobs C., Coss Adame E., Attaluri A., Valestin J., Rao S.S. Dysmotility and proton pump inhibitor use are independent risk factors for

small intestinal bacterial and/or fungal overgrowth // *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. – 1996. – Vol. 37, №11. – P. 1103–1111.

21. Serfaty-Lacroisniere C., Wood R.J., Voytko D., Saltzman J.R., Pedrosa M., Sepe T.E., Russell R.R. Hypochlorhydria from short-term omeprazole treatment does not inhibit intestinal absorption of calcium, phosphorus, magnesium or zinc from food in humans // *Journal of the American College of Nutrition*. – 1995. – Vol. 14, №4. – P. 364–368.

22. Daminov Sh.N., Inoiatova F.Kh. A comparative evaluation of the action of kvamatel and omez on the glutathione system in different sections of the digestive system in experimental duodenal ulcer // *Eksperimental'naia i klinicheskaia farmakologiya*. – 1998. – Vol. 61, №4. – P. 26–28.

23. Bianchi Porro G., Lazzaroni M., Manzionna G., Petrillo M. Omeprazole and sucralfate in the treatment of NSAID-induced gastric and duodenal ulcer // *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. – 1998. – Vol. 12, №4. – P. 355–360.

24. Jeppesen P.B., Staun M., Tjellesen L., Mortensen P.B. Effect of intravenous ranitidine and omeprazole on intestinal absorption of water, sodium, and macronutrients in patients with intestinal resection // *Gut*. – 1998. – Vol. 43, №6. – P. 763–769.

25. Rasmussen L., Oster-Jørgensen E., Qvist N., Pedersen S.A. The effects of omeprazole on intragastric pH, intestinal motility, and gastric emptying rate // *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. – 1999. – Vol. 34, №7. – P. 671–675.

26. Dorta G., Nicolet M., Vouillamoz D., Margalith D., Saraga E., Bouzourene H., Häcki W.H., Stolte M., Blum A.L., Armstrong D. The effects of omeprazole on healing and appearance of small gastric and duodenal lesions during dosing with diclofenac in healthy subjects // *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. – 2000. – Vol. 14, №5. – P. 535–541.

27. Hendriks H.J., van Kreel B., Forget P.P. Effects of therapy with lansoprazole on intestinal permeability and inflammation in young cystic fibrosis patients // *Journal of Pediatric Gastroenterology*. – 2001. – Vol. 33, №3. – P. 260–265.

28. Koch T.R., Petro A., Darrabie M., Opara E.C. Effect of the H, K-ATPase inhibitor, esomeprazole magnesium, on gut total antioxidant capacity in mice // *Journal of Nutritional Biochemistry*. – 2004. – Vol. 15, №9. – P. 522–526.

29. Ichikawa H., Yoshida N., Takagi T., Tomatsuri N., Katada K., Isozaki Y., Uchiyama K., Naito Y., Okanoue T., Yoshikawa T. Lansoprazole ameliorates intestinal mucosal damage induced by ischemia-reperfusion in rats // *World Journal of Gastroenterology*. – 2004. – Vol. 10, №19. – P. 2814–2817.

30. Goldstein J.L., Eisen G.M., Lewis B., Gralnek I.M., Zlotnick S., Fort J.G. Video capsule endoscopy to prospectively assess small bowel injury with celecoxib, naproxen plus omeprazole, and placebo // *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. – 2005. – Vol. 3, №2. – P. 133–141.

31. Pozzoli C., Menozzi A., Grandi D., Solenghi E., Ossiprandi M.C., Zullian C., Bertini S., Cavestro G.M., Coruzzi G. Protective effects of proton pump inhibitors against indomethacin-induced lesions in the rat small intestine // *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. – 2007. – Vol. 374, №4. – P. 283–291.

32. Cadir F.O., Bicakci U., Tander B., Kilicoglu-Aydin B., Rizalar R., Arıturk E., Aydın O., Bernay F. Protective effects of vitamin E and omeprazole on the hypoxia/reoxygenation induced intestinal injury in newborn rats // *Pediatric Surgery International*. – 2008. – Vol. 24, №7. – P. 809–813.

33. Hawkey C.J., Ell C., Simon B., Albert J., Keuchel M., McAlindon M., Fortun P., Schumann S., Bolten W., Shonde A., Hugot J.L., Yu V., Arulmani U., Krammer G., Reboli R., Toth E. Less small-bowel injury with lumiracoxib compared with naproxen plus omeprazole // *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. – 2008. – Vol. 6, №5. – P. 536–544.

34. Higuchi K., Yoda Y., Amagase K., Kato S., Tokioka S., Murano M., Takeuchi K., Umegaki E. Prevention of NSAID-Induced Small Intestinal Mucosal Injury: Prophylactic Potential of Lansoprazole // *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. – 2009. – Vol. 45, №2. – P. 125–130.

35. Knutson L., Flemström G., Gustavsson S., Jedstedt G., Lönnholm G. HCO₃⁻ secretion in rat duodenum after treatment with omeprazole and ranitidine // *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. – 1987. – Vol. 22, №1. – P. 87–90.

36. Erickson R.A., Bezabeh S., Jonas G., Lifrak E., Tarnawski A.S. Chronic omeprazole treatment increases duodenal susceptibility to ethanol injury in rats // *Digestive Diseases and Sciences*. – 1991. – Vol. 36, №7. – P. 897–904.

37. Mertz-Nielsen A., Hillingsø J., Bukhave K., Rask-Madsen J. Omeprazole promotes proximal duodenal mucosal bicarbonate secretion in humans // *Gut*. – 1996. – Vol. 38, №1. – P. 6–10.

38. Merchant S.H., VanderJagt T., Lathrop S., Amin M.B. Sporadic duodenal bulb gastrin-cell tumors: association with *Helicobacter pylori* gastritis and long-term use of proton pump inhibitors // *American Journal of Surgical Pathology*. – 2006. – Vol. 30, №12. – P. 1581–1587.

39. Häkanson R., Axelsson J., Ekman R., Sundler F. Hypergastrinaemia evoked by omeprazole stimulates growth of gastric mucosa but not of pancreas or intestines in hamster, guinea pig and chicken // *Regulatory Peptides*. – 1988. – Vol. 23, №1. – P. 105–115.

40. Gregor I.L., Way L.W. Chronic hypergastrinemia produces hypertrophy of the liver and intestine in rats // *Surgical forum*. – 1976. – Vol. 27, №62. – P. 411–413.

41. Deveney C.W., Owen R.L., Deveney K., Reber H.A., Way L.W. Effect of acid secretory capacity and chronic endogenous hypergastrinemia

on pancreatic secretion and intestinal morphology in the rat // Digestive Diseases and Sciences. – 1983. – Vol. 28, №1. – P. 65-73.

42. Schwartz M.Z., Storozuk R.B. Enhancement of small intestine function by gastrin // Journal of Surgical Research. – 1985. – Vol. 38, №6. – P. 613-617.

43. Contreas C.N., Majumdar A.P. The effects of gastrin, epidermal growth factor, and somatostatin on DNA synthesis in a small intestinal crypt cell line (IEC-6) // Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine. – 1987. – Vol. 184, №3. – P. 307-311.

44. Lysy J., Karmeli F., Wengrower D., Rachmilewitz D. Effect of duodenal ulcer healing induced by omeprazole and ranitidine on the generation of gastroduodenal eicosanoids, platelet-activating factor, pepsinogen A, and gastrin in duodenal ulcer patients // Scandinavian Journal of Gastroenterology. – 1992. – Vol. 27, №1. – P. 13-19.

47. Rasmussen L., Oster-Jørgensen E., Qvist N., Hovendal C.P., Kraglund K., Olsen O., Schaffalitzky de Muckadell O.B., Rehfeld J.,

Pedersen S.A. The effects of omeprazole on interdigestive motility and early postprandial levels of gastrin and secretin // Scandinavian Journal of Gastroenterology. – 1992. – Vol. 27, №2. – P. 119-123.

48. Wang J.Y., McCormack S.A., Viar M.J., Johnson L.R. Secretin inhibits induction of ornithine decarboxylase activity by gastrin in duodenal mucosa and IEC-6 cells // American Journal of Physiology. – 1994. – Vol. 267, №2. – P. 276-284.

49. Ottewill P.D., Duckworth C.A., Varro A., Dimaline R., Wang T.C., Watson A.J., Dockray G.J., Pritchard D.M. Gastrin increases murine intestinal crypt regeneration following injury // Gastroenterology. – 2006. – Vol. 130, №4. – P. 1169-1180.

50. Дворченко К.О., Савко У.В., Остапенко Л.І. Вплив мультипробіотику Симбітер на вільнорадикальні процеси в епітеліоцитах дванадцятипалої кишки за умов тривалої шлункової гіпохлоридрії // Експериментальна та клінічна фізіологія та біохімія. – 2013. – №1(61). – С.85-90.

Надійшла до редколегії 25.12.13

У. Савко, асп., К. Дворченко, канд. биол. наук, В. Верещака, д-р мед. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ОСЛАБЛЕНИЕ КИСЛОТОПРОДУЦИРУЮЩЕЙ ФУНКЦИИ ЖЕЛУДКА КАК ФАКТОР, СПОСОБСТВУЮЩИЙ РАЗВИТИЮ ПАТОЛОГИИ ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ

Проведен анализ современной научной литературы за период 1976-2013 годов, которая посвящена рассмотрению длительного приема кислотосупрессирующих препаратов как фактора, способствующего возникновению энтеропатий. Результаты анализа показали, что ослабление кислотопродуцирующей функции желудка приводит к развитию патологических процессов в двенадцатиперстной кишке.

Ключевые слова: кислотосупрессирующие препараты, кислотопродуцирующая функция, двенадцатиперстная кишка.

U. Savko, PhD stud., K. Dvorschenko, PhD., V. Vereschaka, D.Sci
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

ATTENUATION OF GASTRIC ACID-PRODUCING FUNCTION AS A FACTOR CONTRIBUTING TO THE DUODENAL PATHOLOGY DEVELOPMENT

Literature data (for the years 1976-2013) regarding the association between long-term use of gastric acid suppressants and enteropathy development were reviewed. On the basis of review results it can be concluded that attenuation of acid-producing function of the stomach leads to duodenal pathology development.

Key words: acid suppressants, acid-producing function duodenal pathology.

УДК 577.112.7

Ю. Башта, асп., Р. Герасименко, студ.,
Н. Глущак, студ., О. Мінченко, проф.
Інститут біохімії НАН України, Київ

ЕКСПРЕСІЯ ФАКТОРІВ ПРОЛІФЕРАЦІЇ У ПІДШКІРНІЙ ЖИРОВІЙ ТКАНИНІ ЧОЛОВІКІВ ЗА ОЖИРІННЯ

Проведено вивчення експресії низки важливих факторів, що контролюють процеси проліферації, у підшкірній жировій тканині та ізольованих адипоцитах двох груп чоловіків з ожирінням: з нормальною і порушеною толерантністю до глюкози у порівнянні з групою худих. Встановлено, що рівень експресії генів *FAT1*, *PPDPF*, *SFRP4*, *CTHRC1* та *EGFL6* як у підшкірній жировій тканині чоловіків, так і в ізольованих із неї адипоцитах, за умов ожиріння і нормальної толерантності до глюкози є збільшеним у порівнянні з контролем (групою худих чоловіків). За умов ожиріння, ускладненого порушеною толерантністю до глюкози, рівень експресії генів *FAT1* та *PPDPF* у підшкірній жировій тканині та ізольованих адипоцитах також посилювався у порівнянні з контрольною групою, але істотно не відрізнявся від значень рівня їх експресії, виявлених в групі чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози. Разом з тим, порушення толерантності до глюкози за умов ожиріння знижувало рівень експресії генів *EGFL6* та *CTHRC1* і підвищувало *SFRP4* як у підшкірній жировій тканині, так і в ізольованих адипоцитах, у порівнянні з групою чоловіків, що мали ожиріння і нормальну толерантність до глюкози. Результати даної роботи вказують на те, що у підшкірній жировій тканині та ізольованих адипоцитах чоловіків з ожирінням посилюється експресія генів низки важливих факторів, що контролюють процеси проліферації, але з порушенням толерантності до глюкози асоціюється лише зниження експресії генів *CTHRC1* і *EGFL6* та збільшення *SFRP4*.

Ключові слова: ожиріння, експресія генів *FAT1*, *PPDPF*, *SFRP4*, *CTHRC1*, *EGFL6*.

Вступ. Численні дані вказують на те, що за ожиріння спостерігається порушення різноманітних метаболічних процесів, в тому числі і процесів проліферації, зокрема у підшкірній жировій тканині [1 – 4]. Більше того, дослідження, проведені на молекулярному та клітинному рівнях, продемонстрували наявність взаємозв'язків між метаболічними порушеннями за ожиріння та його ускладнень (резистентності до інсуліну і діабету 2 типу) та дисрегуляцією ключових регуляторних механізмів шляхом змін в експресії багатьох генів [5 – 8]. Звичайно, ожиріння та його ускладнення, як і багато інших захворювань, є результатом тісної взаємодії генетичних факторів і різноманітних зовнішніх чинників [3,

4, 6, 9]. Разом з тим, і порушення метаболізму можуть, в свою чергу, призводити до змін у функціонуванні регуляторних механізмів на різному рівні [10]. Відомо, що процеси транспорту і метаболізму глюкози, ліполіз та адіпогенез, а також багато інших процесів, включаючи проліферативні процеси, контролюються сіткою транскрипційних та інших регуляторних факторів [11]. Можна сподіватися, що пізнання механізмів порушення метаболічних процесів на молекулярному, клітинному та системному рівнях допоможе краще зрозуміти природу такого захворювання як ожиріння та його ускладнень.

Відомо, що за ожиріння суттєво змінюється інтенсивність метаболізму глюкози і ліпідів, а також проліфе-

ративних процесів шляхом змін в експресії генів, що відповідають за їх регуляцію [12 – 17]. Так, фактор FAT1 (FAT Atypical Cadherin 1), який ще називають гомологом 1 супресора пухлин FAT (FAT tumor suppressor homolog 1) є супресором пухлин, що важливий для контролю проліферації клітин, їх міграції та міжклітинних взаємодій, оскільки він контролює вищі рівні регуляції про-запальних та онкогенних сигнальних шляхів [14]. Відомо також, що фактор росту *EGFL6* (Epidermal Growth Factor [EGF]-Like-domain, multiple 6) задіяний у регуляції клітинного циклу і процесів проліферації і посилено експресується за ожиріння [15]. Недавно було встановлено, що важливу роль у регуляції процесів росту та диференціації відіграє фактор *SFRP4* (Secreted Frizzled-Related Protein 4), який є модулятором сигналіну прото-онкогена *WNT1* (Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 1) [16]. Фактор *CTHRC1* (Collagen Triple Helix Repeat Containing 1) задіяний у розвитку м'язових дистрофій, а також посилено експресується у злоякісних пухлинах і активує метастазування [17].

Важливо відмітити, що характерною детермінантою ожиріння та асоційованої з ним резистентності до інсуліну, як і злоскісного росту, є стрес ендоплазматичного ретикулуму [18, 19]. Він є центральним фактором виникнення резистентності до інсуліну та багатьох метаболічних порушень за ожиріння, оскільки за стресу ендоплазматичного ретикулуму страждає сигналінг з рецептора інсуліну. Стрес ендоплазматичного ретикулуму є чинником, що контролює експресію великої кількості генів, в тому числі і генів, контролюючих проліферативні процеси, і пов'язує між собою ожиріння, дію інсуліну та виникнення діабету 2 типу.

Разом з тим, детальні молекулярні механізми розвитку ожиріння та його ускладнень не зовсім з'ясовані і заслуговують на подальше детальне вивчення. **Метою даної роботи** було вивчити рівень експресії генів *FAT1*, *PPDPF*, *SFRP4*, *CTHRC1* та *EGFL6* у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням та нормальною або порушеною толерантністю до глюкози у порівнянні з групою худих чоловіків для виявлення тих генів, зміна експресії яких може бути пов'язана як з розвитком ожиріння, так і його ускладнень.

Матеріали і методи досліджень. Дослідження проведені на підшкірній жировій тканині, яку було взято шляхом біопсії у трьох груп чоловіків віком біля 45 років (по шість осіб у кожній групі): 1) контрольна група худих чоловіків (індекс маси тіла 23 ± 0.6), 2) група чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози (індекс маси тіла 32 ± 0.6) і 3) група чоловіків з ожирінням, що мали порушену толерантність до глюкози (індекс маси тіла 34 ± 0.6). 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 [19]. Адіпоцити виділяли із жирової тканини як описано Considine et al. [20]. РНК із жирової тканини виділяли за допомогою спеціального набору реагентів (RNasy Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN, Німеччина) згідно протоколу виробника. Експресію генів *FAT1*, *PPDPF*, *SFRP4*, *CTHRC1* та *EGFL6*, 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, що були отримані 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 Quantiscrypt 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, пробі швидко охолоджували і отриману таким чином кДНК використовували для дослідження експресії генів. Для вивчення рівня експресії гена *FAT1* (FAT Atypical Cadherin 1), відомого ще як FAT tumor suppressor homolog 1, були використані такі праймери: прямий 5'-ATCGTGAGGAGCAAGCTGTT -3' і зворотний 5'-CTGCCTGGAGTTCTCTGTCC -3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 9445 – 9464 та 9768 – 9749 кДНК *FAT1* людини (GenBank номер NM_005245); розмір ампліфікованого фрагмента 324 пар нуклеотидних залишків (п.н.з.). Для гена *PPDPF* (pancreatic progenitor cell differentiation and proliferation factor) кДНК – 5'-GTCCTGACCTGAGCGGTTAC -3' прямий і 5'-AGGAAAGCTAGCGAGTGCTG -3' зворотний, які відповідали нуклеотидним послідовностям 479 – 498 та 713 – 694 кДНК *PPDPF* людини (GenBank номер NM_024299); розмір ампліфікованого фрагмента 235 п.н.з. Для ампліфікації *SFRP4* (Secreted Frizzled-Related Protein 4) кДНК ми використали прямий 5'-CTGCCCCATCAAGATGTTCT -3' та зворотний 5'-CGGCTGTTTTCTTCTTGTC -3' праймери з послідовністю 1131 – 1150 та 1302 – 1283 в кДНК *SFRP4* людини (GenBank номер NM_003014, а довжина фрагмента ампліфікації – 172 п.н.з.). Для ампліфікації *CTHRC1* (Collagen Triple Helix Repeat Containing 1) кДНК ми використали прямий 5'-GCTCACTTCGGCTAAAATGC -3' та зворотний 5'-GAACAAGTGCCAACCCAGAT -3' праймери з послідовністю 527 – 546 та 755 – 736 в кДНК *CTHRC1* людини (GenBank номер NM_138455, а довжина фрагмента ампліфікації – 229 п.н.з.). Ампліфікацію кДНК *EGFL6* (Epidermal Growth Factor [EGF]-Like-domain, multiple 6) cDNA проводили з праймерами 5'-CCTGATTCTGGTCCAAAGGA -3' – прямий та 5'-GCCAGGGCATTGTTACTGTT -3' – зворотний, що відповідали нуклеотидним послідовностям 1421 – 1440 та 1759 – 1740 кДНК *EGFL6* людини (GenBank номер NM_015507; довжина фрагмента – 339 п.н.з.). Відносно кількість транскриптів досліджених генів нормалізували по рівню експресії бета-актину (*ACTB*), для ампліфікації якого використовували наступні праймери: прямий – 5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG -3' та зворотний – 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG -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 *FAT1*, *PPDPF*, *SFRP4*, *CTHRC1* та *EGFL6* 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, що задіяні у регуляції процесів проліферації (*FAT1*, *PPDPF*, *SFRP4*, *CTHRC1* та *EGFL6*), у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози суттєво збільшується порівняно з жировою тканиною від худих осіб (контрольна група) за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції, але найбільш виражені зміни в експресії виявлені для *SFRP4* та *EGFL6* генів.

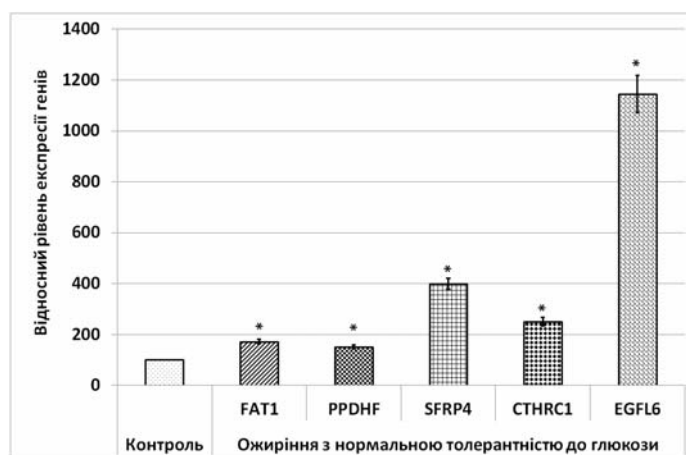


Рис. 1. Відносний рівень експресії генів *FAT1*, *PPDPF*, *SFRP4*, *CTHRC1* та *EGFL6* у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням, за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції (у реальному часі).

Контролем слугувала група худих чоловіків.

Величину експресії генів *FAT1*, *PPDPF*, *SFRP4*, *CTHRC1* та *EGFL6* нормалізували по експресії бета-актину, причому рівень експресії всіх досліджених генів у контролі був прийнятим за 100 %;

$n = 6$; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем

При дослідженні рівня експресії генів *FAT1*, *PPDPF*, *SFRP4*, *CTHRC1* та *EGFL6* в адипоцитах, виділених із підшкірної жирової тканини чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози, було показано, що

експресія всіх цих генів змінюється майже в такій же мірі, як і у підшкірній жировій тканині, але в дещо меншій мірі, за винятком гена *CTHRC1* (рис. 2).

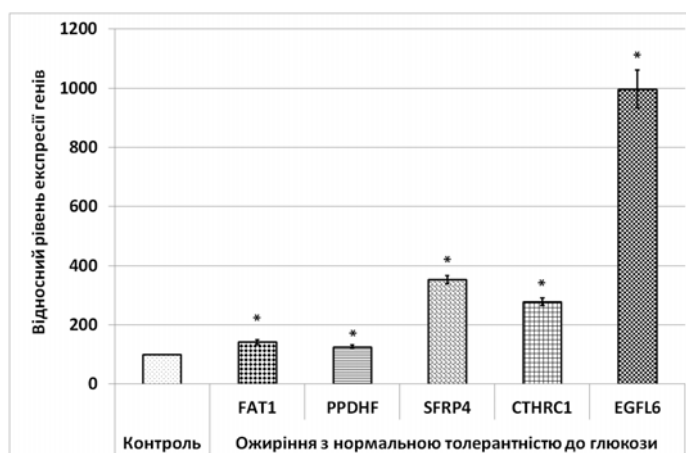


Рис. 2. Відносний рівень експресії генів *FAT1*, *PPDPF*, *SFRP4*, *CTHRC1* та *EGFL6* в адипоцитах, виділених із підшкірної жирової тканини чоловіків з ожирінням, за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції.

Контролем слугувала група худих чоловіків. Величину експресії генів *FAT1*, *PPDPF*, *SFRP4* та *EGFL6* нормалізували по експресії бета-актину, причому рівень експресії всіх досліджених генів у контролі був прийнятим за 100 %;

$n = 6$; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем

Так, рівень експресії генів *FAT1*, *PPDPF* та *CTHRC1* у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози збільшувався порівняно з контрольною групою худих осіб на 72 %, 51 % та 151 %, відповідно, а генів *SFRP4* та *EGFL6* – в 4 та 11,5 разів, відповідно (рис. 1). В той же час, рівень експресії генів *FAT1*, *PPDPF* та *SFRP4* в адипоцитах, виділених із підшкірної жирової тканини чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози, збільшувався порівняно з контрольною групою осіб лише на 42 %, 26 % та 253 %, відповідно, а генів *CTHRC1* та *EGFL6* – на 178 % та в 9 разів, відповідно (рис. 2). Ці результати узгоджуються з даними літератури про зміни в експресії генів, що контролюють процеси проліферації у жировій тканині через різні сигнальні шляхи та акумуляцією ліпідів, причому зміни в експресії гена *CTHRC1* асоціюються ще і із м'язовою дистрофією [12, 14 – 17].

Нами проведено також дослідження експресії генів *FAT1*, *PPDPF*, *SFRP4*, *CTHRC1* та *EGFL6* у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням і порушеною толерантністю до глюкози. Як видно із даних, представлених на рис. 3А, рівень експресії генів *FAT1* та *PPDPF* у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози, порівняно з жировою тканиною осіб чоловічої статі, що мали ожиріння з нормальною толерантністю до глюкози істотно не змінювався. В той же час, рівень експресії генів *CTHRC1* та *EGFL6* у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням і порушеною толерантністю до глюкози знижувався на 32 % і 63 %, відповідно, порівняно з особами, що мали ожиріння і нормальну толерантність до глюкози, а рівень експресії гена *SFRP4*, навпаки, збільшувався (на 24 %). В адипоцитах, виділених

із підшкірної жирової тканини чоловіків з ожирінням, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози, рівень експресії генів *FAT1* та *PPDPF* також істотно не змінювався, а генів *CTHRC1* та *EGFL6* знижувався на 39 % та 40 %, відповідно, у порівнянні з групою чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози (рис. 3Б). Таким чином, зміни в експресії гена *CTHRC1* в адипоцитах і підшкірній жировій тканині цієї групи чоловіків з ожирінням є подібними, а що стосується змін в експресії гена *EGFL6*, то вони були значно меншими в

адипоцитах, порівняно з жировою тканиною. Можливо, що ген *EGFL6* експресується як у адипоцитах, так і у клітинах строми, і що ці клітини мають різну чутливість до порушення метаболізму глюкози, але це питання заслуговує на подальше ґрунтовне вивчення.

Більше того, рівень експресії гена *SFRP4* посилюється як у підшкірній жировій тканині, так і у виділених із неї адипоцитах (на 24 % та 20 %, відповідно), що видно із даних, представлених на рис. 3А та 3Б.

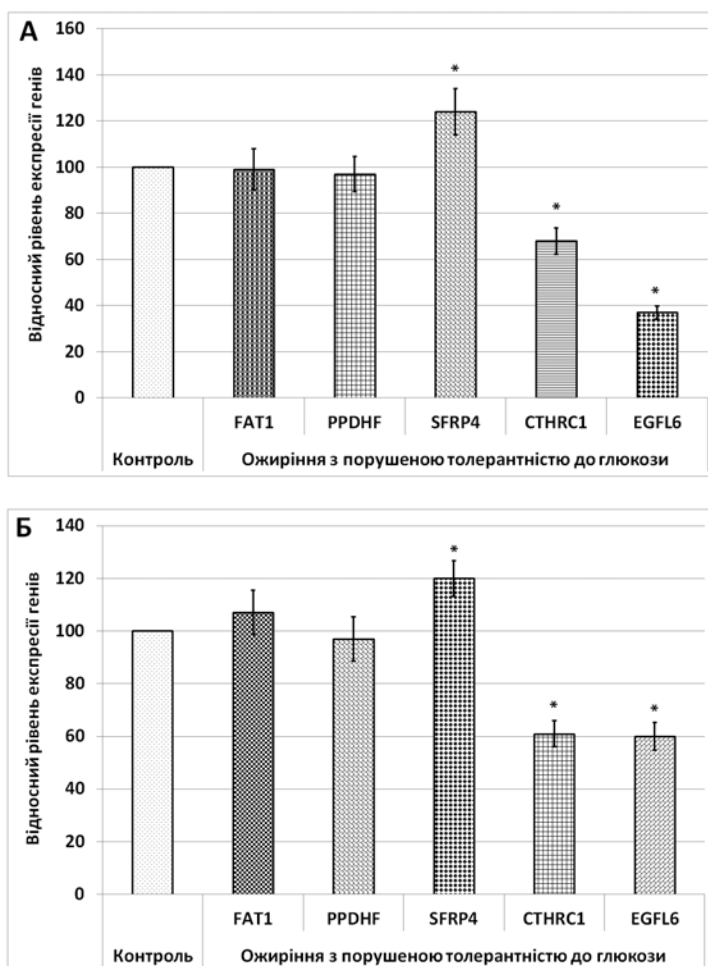


Рис. 3. Відносний рівень експресії генів *FAT1*, *PPDPF*, *SFRP4*, *CTHRC1* та *EGFL6* у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням, ускладненим порушеною толерантністю до глюкози (А), а також в адипоцитах, виділених із неї (Б), за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції. Контролем слугувала група чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози.

Величину експресії генів *FAT1*, *PPDPF*, *SFRP4* та *EGFL6* нормалізували по експресії бета-актину, причому рівень експресії всіх досліджених генів у контролі був прийнятий за 100 %; $n = 6$; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем

Посилення експресії гена *SFRP4* у підшкірній жировій тканині за умов ожиріння і ще більше підвищення рівня його експресії при порушенні толерантності до глюкози узгоджується з даними літератури [16] про важливу участь протеїну *SFRP4* у розвитку резистентності до інсуліну та порушенні толерантності до глюкози, з високим рівнем його експресії за діабету 2 типу.

Таким чином, результати даної роботи вказують на те, що за умов ожиріння у підшкірній жировій тканині чоловіків посилюється експресія генів *FAT1*, *PPDPF*, *SFRP4*, *CTHRC1* та *EGFL6*, які відіграють важливу роль в регуляції проліферації, міграції клітин та акумуляції ліпідів, а також у розвитку м'язової дистрофії. Разом з тим, з порушенням толерантності до глюкози на фоні

ожиріння корелюють зміни в експресії лише трьох генів: *SFRP4*, *CTHRC1* та *EGFL6*, хоча детальні молекулярні механізми як розвитку ожиріння, так і його ускладнень, заслуговують на подальше всебічне вивчення.

Висновки. 1. Встановлено, що у підшкірній жировій тканині чоловіків за умов ожиріння у порівнянні з групою худих посилюється експресія генів, що контролюють процеси проліферації (*FAT1*, *PPDPF*, *SFRP4*, *CTHRC1* та *EGFL6*), причому аналогічні зміни виявлені і в адипоцитах, ізольованих із цієї жирової тканини. 2. Показано, що рівень експресії генів *FAT1* та *PPDPF* істотно не змінюється, а *SFRP4* – збільшується як у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням, ускладненим порушенням толерантності до глюкози, так і в адипоци-

тах, ізольованих із цієї жирової тканини, у порівнянні з групою осіб, що мали ожиріння і нормальну толерантність до глюкози. 3. Виявлено, що порушення толерантності до глюкози за умов ожиріння супроводжується зниженням рівня експресії генів *CTHRC1* та *EGFL6* як у підшкірній жировій тканині, так і в ізольованих адіпоцитах, у порівнянні з групою чоловіків, що мали ожиріння і нормальну толерантність до глюкози. 4. Отримані результати вказують на те, що у підшкірній жировій тканині та ізольованих адіпоцитах чоловіків з ожирінням посилюється експресія генів низки важливих факторів, що контролюють процеси проліферації, але з порушення толерантності до глюкози асоціюється лише зниження рівня експресії генів *CTHRC1* та *EGFL6*, а також збільшення рівня експресії гена *SFRP4*.

Список використаних джерел

- Bray M.S., Young M.E. // *Obes. Rev.* – 2009. – 10, Suppl. 2. – P. 6 – 13.
- Bray M.S., Young M.E. // *J. Biol. Chem.* – 2011. – 286, 14. – P. 11883 – 11889.
- Turek F.W., Joshi C., Kohsaka A. et al. // *Science.* – 2005. – 308. – P. 1043 – 1045.
- Kovac J., Husse J., Oster H. // *Mol. Cells.* – 2009. – 282. – P. 75 – 80.
- Green C.B., Takahashi J.S., Bass J. // *Cell.* – 2008. – 134. – P. 728-742.
- Ramsey KM, Marcheva B, Kohsaka A, Bass J. // *Annu. Rev. Nutr.* – 2007. – 27. – P. 219 – 240.
- Ando H., Kumazaki M., Motosugi Y. et al. // *Endocrinology.* – 2011. – 152. – P. 1347 – 1354.
- Ando H., Takamura T., Matsuzawa-Nagata N. et al. // *Diabetologia.* – 2009. – 52. – P. 329 – 335.
- Shimba S., Ogawa T., Hitosugi S. et al. // *PLoS One.* – 2011. – 6. – P. e25231.
- Duong H.A., Robles M.S., Knutti D., Weitz C.J. // *Science.* – 2011. – 332. – P. 1436 – 1439.
- Huang W., Ramsey KM, Marcheva B, Bass J. // *J. Clin. Invest.* – 2011. – 121. – P. 2133 – 2141.
- Atsumi T., Nishio T., Niwa H. et al. // *Diabetes.* – 2005. – 54. – P. 3349–3357.
- Moon J.S., Jin W.J., Kwak J.H. et al. // *Biochem J.* – 2011. – 433. – P. 225–233.
- Aguer C., Foretz M., Lantier L. et al. // *PLoS ONE.* – 2011. – 6. – P. E28981.
- Oberauer R., Rist W., Lenter M.C. et al. // *Mol Cell Biochem.* – 2010. – 343. – P. 257-269.
- Mahdi T., Hanzelmann S., Salehi A. et al. // *Cell Metab.* – 2012. – 16. – P. 625-633.
- Spector I., Zilberstein Y., Lavy A. et al. // *Am. J. Pathol.* – 2013. – 182. – P. 905-916.
- Wang S., Kaufman R.J. // *J. Cell. Biol.* – 2012. – 197. – P. 857–867.
- Ratushna O.O., Minchenko D.O., Danilovsky S.V. et al. // *Studia Biologica.* – 2012. – 6, N 2. – P. 17 – 32.
- Considine R.V., Nyce M.R., Kolaczynski J.W. et al. // *J. Cell. Biochem.* – 1997. – 65. – P. 254-258.

Надійшла до редколегії 09.12.13

Ю.Башта, асп., Р.Герасименко, студ., Н. Глушак, студ., А. Минченко, проф.
Институт биохимии НАН Украины, Киев

ЭКСПРЕССИЯ ФАКТОРОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ В ПОДКОЖНОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ МУЖЧИН В УСЛОВИЯХ ОЖИРЕНИЯ

Проведено изучение экспрессии ряда важных факторов, контролирующих процессы пролиферации, в подкожной жировой ткани и изолированных адипоцитах двух групп мужчин с ожирением: с нормальной и нарушенной толерантностью к глюкозе по сравнению с группой худых. Установлено, что уровень экспрессии генов *FAT1*, *PPDPF*, *SFRP4*, *CTHRC1* и *EGFL6* как в подкожной жировой ткани мужчин, так и в изолированных из нее адипоцитах, в условиях ожирением и нормальной толерантности к глюкозе является увеличенным по сравнению с контролем (группой худых мужчин). В условиях ожирения, осложненного нарушенной толерантностью к глюкозе, уровень экспрессии генов *FAT1* и *PPDPF* в подкожной жировой ткани и изолированных адипоцитах также усиливался по сравнению с контрольной группой, но существенно не отличался от значений уровня их экспрессии, выявленных в группе мужчин с ожирением и нормальной толерантностью к глюкозе. Вместе с тем, нарушение толерантности к глюкозе в условиях ожирения снижало уровень экспрессии генов *EGFL6* и *CTHRC1* и повышало *SFRP4* как в подкожной жировой ткани, так и в изолированных адипоцитах, по сравнению с группой мужчин, имевших ожирение и нормальную толерантность к глюкозе. Результаты данной работы показывают, что в подкожной жировой ткани и изолированных адипоцитах мужчин с ожирением усиливается экспрессия генов ряда важных факторов, контролирующих процессы пролиферации, но с нарушением толерантности к глюкозе ассоциируется лишь снижение экспрессии генов *CTHRC1* и *EGFL6* и увеличение *SFRP4*.

Ключевые слова: ожирение, экспрессия генов *FAT1*, *PPDPF*, *SFRP4*, *CTHRC1*, *EGFL6*.

Y. Bashta, PhD stud., R.Herasymenko, stud., N. Hlushchak, stud., O. Minchenko, prof.
Palladin institute of biochemistry of National Academy of Sciences of Ukraine NASU, Kyiv

EXPRESSION OF PROLIFERATION FACTORS IN SUBCUTANEOUS FAT TISSUE IN OBESE MEN

We studied the expression of several important growth factors, which control proliferative processes, in subcutaneous adipose tissue and isolated adipocytes of two groups of obese men: with normal and impaired glucose tolerance. It was shown that the expression of *FAT1*, *PPDPF*, *SFRP4*, *CTHRC1* and *EGFL6* genes in subcutaneous adipose tissue and isolated adipocytes of obese men with normal and impaired glucose tolerance is increased compared to control group (lean men). At the same time, the expression of *FAT1* and *PPDPF* genes is also increased both in subcutaneous adipose tissue and isolated adipocytes as compared to control group, but did not change significantly from obese group with normal glucose tolerance. However, impaired glucose tolerance in obesity leads to decrease of *CTHRC1* and *EGFL6* gene expressions and to increase *SFRP4* both in subcutaneous adipose tissue and isolated adipocytes as compared to obese group with normal glucose tolerance. Results of this study provide evidence that the expression of several important growth factors in subcutaneous adipose tissue and isolated adipocytes of obese men is increased but impaired glucose tolerance in obesity is associated with suppression of *CTHRC1* and *EGFL6* gene expressions as well as with increased expression of *SFRP4* gene.

Key words: obese, expression of *FAT1*, *PPDPF*, *SFRP4*, *CTHRC1* and *EGFL6*.

УДК 591.1:612.3:612.6

Н. Скочко, інж. 2-ї кат., Є. Торгалло, канд. біол. наук, О. Берник, інж. 2-ї кат.
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

КОНЦЕНТРАЦІЯ АЗОТУ СЕЧОВИНИ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ ТА ЗА УМОВ ПЕРІОДИЧНОГО ВВЕДЕННЯ МУЛЬТИПРОБІОТИКА

Встановлено, що концентрація азоту сечовини в сироватці крові щурів зростала лише при досягненні ними старечого віку. Періодичне введення щурам упродовж життя мультипробіотика "Симбітер® ацидофільний" концентрований усувало збільшення в старечому віці концентрації азоту сечовини в сироватці крові.

Ключові слова: азот сечовини, старіння, мультипробіотик.

Вступ. Одним з важливих завдань сучасної науки є створення терапевтичних препаратів, спрямованих на подовження життя людини та покращення його якості [17]. Щоб виконати таке завдання мають бути ідентифіковані біомаркери старіння, які можуть бути провісниками старіння. Традиційними фізіологічними маркерами старіння є сиве волосся, катаракти [6, 9], зменшення резистентності шкіри до дії стресу [16] та зменшений імунітет [12]. Інші фізіологічні показники, які використовуються для оцінки старіння, включають зміни в тиску крові, гематокрит, концентрацію альбуміну в крові і концентрацію азоту сечовини в сироватці крові [13].

Відомо, що процес старіння впливає на філогенетичний склад мікробіоти шлунково-кишкового тракту та її зв'язок з імунітетом і метаболізмом [3,5,18]. Є навіть дані про те, що у практично всіх людей старших вікових груп розвивається дисбактеріоз [1]. Не дивлячись на те, що зв'язок між кишковою мікрофлорою та процесом старіння зрозумілий лише частково, показано, що екосистема шлунково-кишкового тракту є обнадійливою мішенню для стратегій, здатних сприяти оздоровленню старших людей [3,7,8]. До таких стратегій належить використання пробіотиків, які за даними літератури подовжують та покращають якість життя старих людей [4, 10, 11]. Так, встановлено, що *L. acidophilus* and *B. lactis* можуть попераркерджувати або зменшувати метаболічну дисфункцію, викликану старінням, що проявлялось насамперед в тому, що на фоні введення пробіотика у сечі дорослих і старих мишей збільшувалась концентрація диметилглїцина, у дорослих мишей знижувалась концентрація саркозіна і нікотината та збільшувалась концентрація N-метилнікотинаміда, у старих мишей знижувалась концентрація N-метилнікотинаміда у порівнянні з відповідними контролями [10]. Ці дані свідчать про активацію пробіотиками гомоцистеїнового та нікотинамідного шляхів метаболізму, які включені у важливі клітинні процеси, що змінюються при старінні. За іншими даними, згодовування старим мишам пробіотика Dahi зворотні зміни (зростання) у зниженій експресії таких біомаркерів старіння як рецептор- α , що активується проліфератором пероксидом, та маркерний білок старіння 30 (MBC-30) [8].

Що стосується даних відносно впливу інтервального введення пробіотиків тваринам упродовж всього їх життя на концентрацію азоту сечовини в сироватці крові, то такі відомості в літературі відсутні.

Метою роботи було визначення концентрації азоту сечовини в сироватці крові щурів різних вікових груп, які утримувались на стандартній дієті, та у щурів, яким періодично упродовж життя в стандартну дієту додавали пробіотик.

Об'єкт та методи досліджень. Дослідження проведені в умовах хронічного експерименту на 120 білих нелінійних щурах, самках, які народжені різними самка-

ми в один день та рандомізовано були поділені на 2 групи: контрольну, яку утримували на стандартному раціоні, та дослідну, якій до стандартного корму періодично додавали мультипробіотик "Симбітер® ацидофільний" концентрований (0,14 мл/кг) (НВК "О.Д. Пролісок"). Щурам контрольної групи у віці 3, 6, 9, 18, 21 та 24 місяців упродовж 30 днів перорально вводили 0,5 мл водопровідної дехлорованої води кімнатної температури. Щурам дослідної групи в перші 10 днів після народження щоденно в ротіву порожнину вводили 1 краплю мультипробіотика "Симбітер® ацидофільний". В подальшому цим щурам у віці 3, 6, 9, 18, 21 та 24 місяців упродовж 30 днів перорально вводили мультипробіотик "Симбітер® ацидофільний" концентрований, розчиненого у 0,5 мл води. Всі експерименти виконували у відповідності до вимог комісії з біоетики ННЦ "Інститут біології" та згідно з "Загальними етичними принципами експериментів на тваринах" (Київ, 2001), що узгоджується з положеннями "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних наукових цілей" (Страсбург, 1986).

В склад однієї дози "Симбітеру® ацидофільний" концентрований (10 мл) входить концентрована біомаса живих клітин симбіозу 14 штамів пробіотичних бактерій, КУО/см³, не менше: лактобацили і лактококи – $6,0 \times 10^{10}$, пропіоновікислі бактерії – $3,0 \times 10^{10}$, біфідобактерії – $1,0 \times 10^{10}$, оцтовікислі бактерії – $1,0 \times 10^6$. У віці 3 (ювенільний вік), 6 (юнацький вік), 12 і 18 (зрілий вік), 21 (літній вік) та 24 (старечий вік) місяця з кожної групи щурів відбирали по 6-11 тварин, яких умертвляли летальною дозою уретану, після чого швидко робили забір крові. Вміст сечовини та азоту сечовини в сироватці крові визначали за допомогою уреаза/колориметричним методом за допомогою наборів "DialabUrea".

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

Результати та їх обговорення. Концентрація азоту сечовини у сироватці крові щурів контрольної групи залишалася стабільною до досягнення ними літнього віку. У щурів старечого віку концентрація азоту сечовини (24 місяці) була на 80% ($p < 0,01$) та 45,1% ($p < 0,05$) більшою у порівнянні з даним показником у щурів 3-х і 21 місячного віку (рис.1). Так як концентрація азоту сечовини у сироватці крові щурів віком 3 та 21 місяць знаходилась в межах фізіологічної норми, то середнє збільшення даного показника у щурів старечого віку складало приблизно 60% відносно середнього значення фізіологічної норми.

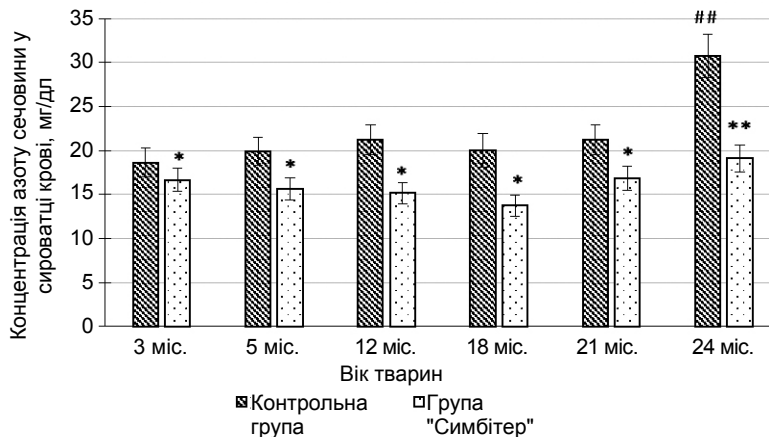


Рис. 1. Концентрація азоту сечовини у сироватці крові щурів різного віку (M±m)

Примітка: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ у порівнянні з контрольною групою щурів відповідного віку;

- $p < 0,01$ у порівнянні з контрольною 3-х місячних щурів;

$n=11$ в групах щурів 3, 6, 12 та 18 місяців віком, $n=6$ в групах щурів 21 та 24 місячного віку

У щурів, яким упродовж життя періодично вводили мультипробіотик "Симбітер® ацидофільний", концентрація азоту сечовини була меншою у порівнянні з контролем відповідного вікового періоду (рис.1). І хоча це зменшення було статистично достовірним, воно знаходилось в межах фізіологічної норми. Найбільш важливим результатом даних досліджень є зменшення концентрації азоту сечовини у щурів старечого віку, так як під впливом мультипробіотика вона не відрізнялася від значень концентрації азоту сечовини в інших вікових періодах. Тобто, інтервальне введення мультипробіотика щурам упродовж всього їх життя запобігає збільшенню в старечому віці концентрації азоту сечовини в сироватці крові.

Одержані результати щодо збільшення концентрації азоту сечовини в сироватці крові у щурів старечого віку, можна пояснити даними літератури, за якими в процесі нормального старіння у людини і щурів концентруюча здатність сечі зменшується за рахунок зменшення експресії транспортних білків в мозковій речовині нирок, в результаті чого в сироватці крові зростає концентрація сечовини [2, 14, 15]. Також, на нашу думку, слід звернути увагу на відомості про те, що з віком склад мікрофлори змінюється в сторону інтенсифікації росту протеолітичних бактерій, в результаті чого зростає вміст продуктів азотистого обміну в кишечнику та крові [5]. Знешкодження аміаку, який утворюється внаслідок дезамінування амінокислот (головним чином глутамінової) і, меншою мірою, пуринових основ, біогенних амінів, амідів амінокислот і розпаду піримідинових основ, здійснюється декількома шляхами. Значна частина аміаку зв'язується в тканинах з глутаміновою і аспарагіновою кислотами з утворенням їх амідів – транспортних форм аміаку. У печінці вони віддають аміак для утворення сечовини, а в нирках – для утворення амонієвих солей.

І якщо за умов збереження кількісного і якісного складу мікрофлори в шлунково-кишковому тракті роль кишкової флори у створенні загального азотного пулу в організмі відносно мала, то за умов дисбактеріозу з переважанням протеолітичної мікрофлори її внесок в утворення азотних сполук різко зростає.

Зростання в крові концентрації продуктів азотного обміну, які є високо токсичними, призводить до порушення кислотно-лужної рівноваги, до підвищення осмотичного тиску крові, розвитку гіпертонії, набряків і т.д. Тому розробка методів профілактики вікових змін в азотному обміні є не менш актуальною проблемою чим розробка нових методів лікування. Отримані результати вка-

зують на можливість попередження наведених вікових змін шляхом періодичного прийому пробіотиків упродовж життя шляхом підтримання нормобіозу в травному тракті.

Висновки: 1. У щурів ювенільного, юнацького, зрілого та літнього віку концентрація азоту сечовини в сироватці крові коливається в межах фізіологічної норми. І лише в старечому віці вона зростає на 60% відносно фізіологічної норми. 2. Інтервальне введення щурам мультипробіотика "Симбітер® ацидофільний" концентрований усувало збільшення в старечому віці концентрації азоту сечовини в сироватці крові. 3. Періодичний прийом пробіотиків упродовж життя покращує якість життя та є засобом профілактики вікових змін в організмі.

Список використаних джерел

1. Функциональные продукты для людей старших возрастов / Григорьев Ю.Г. [и др.] // Проблемы харчування. – 2005. – № 2. – С. 23-27.
2. Age-associated decrease in response of rat aquaporin-2 gene expression to dehydration / Y.Terashima [et al.] // Life Sci. – 1998. – Vol.62, N 10. – P. 873-882.
3. Ageing and gut microbes: perspectives for health maintenance and longevity / E. Biagi [et al.] // Pharmacol Res. – 2013. – Vol. 69, № 1. – P. 11-20.
4. Chrysohoou C. Longevity and diet. Myth or pragmatism? / C.Chrysohoou, C.Stefanadis // Maturitas. – 2013. – Vol. 76, N4. – P. 303-307.
5. Duncan S.H. Probiotics and prebiotics and health in ageing populations / S.H.Duncan, H.J.Flint // Maturitas. – 2013. – Vol. 75, № 1. – P. 44-50.
6. Hormone levels and cataract scores as sex-specific, mid-life predictors of longevity in genetically heterogeneous mice / J.M. Harper [et al.] // Mech Ageing Dev. – 2003. – Vol. 124. – P. 801-810.
7. Kaushal D. Age-related decline in macrophage and lymphocyte functions in mice and its alleviation by treatment with probiotic Dahi containing Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum / D. Kaushal, V.K. Kansal // J Dairy Res. – 2011. – Vol. 78, № 4. – P. 404-411.
8. Kaushal D. Probiotic Dahi containing Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum alleviates age-inflicted oxidative stress and improves expression of biomarkers of ageing in mice / D. Kaushal, V.K. Kansal // Mol Biol Rep. – 2012. – Vol. 39, №2. – P. 1791-1799.
9. Klein E.K. Incidence of age-related cataract over a 10-year interval: the beaver dam eye study / B.E.K. Klein, R. Klein, K.E. Lee // Ophthalmology. – 2002. – Vol. 109. – P. 2052-2057.
10. Lactobacillus acidophilus La5 and Bifidobacterium lactis Bb12 induce different age-related metabolic profiles revealed by 1H-NMR spectroscopy in urine and feces of mice / E.Brasili [et al.] // J Nutr. – 2013. – Vol. 143, N 10. – P. 1549-1557.
11. Lactobacillus in jelly enhances the effect of influenza vaccination in elderly individuals / H.Akatsuet al. // J Am Geriatr Soc. – 2013. – Vol. 61, N 10. – P. 1828-1830.
12. Miller R.A. The aging immune system: primer and prospectus / R.A. Miller // Science. – 1996. – Vol. 273. – P. 70-74.
13. Nakamura E. A method for identifying biomarkers of aging and constructing an index of biological age in humans / E. Nakamura, K. Miyao // J Gerontol A Biol Sci Med Sci. – 2007. – Vol. 62. – P. 1096-1105.
14. O'Neill P.A. Water and ageing / P.A. O'Neill, K.A. McLean // Medical Laboratory Sciences. – 1992. – Vol. 49. – P. 291-298.
15. Sands J.M. Urine concentrating and diluting ability during aging / J.M. Sands // J Gerontol A Biol Sci Med Sci. – 2012. – Vol. 67, N 17. – P. 1352-1357.

16. Scin-derived fibroblasts from long-lived species are resistant to some, but not all, lethal stresses and to the mitochondrial inhibitor rotenone / M.H. James [et al.] // *Aging Cell*. – 2007. – Vol. 6. – P. 1-13.

17. The aging population – is there a role for endocrine interventions? / R. Nass [et al.] // *Growth Horm IGF Res*. – 2009. – P. 89-100.

18. The effects of ageing on the colonic bacterial microflora in adults / P.Enck[et al.] // *Z Gastroenterol*. – 2009. – Vol. 47, № 7. – P. 653-658.

Надійшла до редколегії 26.01.14

Н. Скочко, инж. 2-й кат., Е. Торгалло, канд. биол. наук, О. Берник, инж. 2-й кат.
КНУ имени Тараса Шевченко, Киев

КОНЦЕНТРАЦИЯ АЗОТА МОЧЕВИНЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА И ПРИ УСЛОВИИ ПЕРИОДИЧЕСКОГО ВВЕДЕНИЯ МУЛЬТИПРОБИОТИКА

Установлено, что концентрация азота мочевины в сыворотке крови крыс увеличивалась только при достижении ими старческого возраста. Периодическое введение крысам на протяжении жизни мультипробиотика "Симбитер® ацидофильный" концентрированный устраняло увеличение в старческом возрасте концентрации азота мочевины и мочевины в сыворотке крови.

Ключевые слова: азот мочевины, старение, мультипробиотик.

N. Skochko, ing.2 k., E. Torgalo, PhD., O. Bernuk, ing 2 k.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

BLOOD UREA NITROGEN CONTENT IN RATS OF DIFFERENT AGE GROUPS AND UNDER CONDITION OF PERIODIC MULTIPROBIOTIC CONSUMPTION

It was found that serum urea nitrogen was increased only in elderly rats. Periodic administration during the life of multiprobiotic "Symbiter® acidophilic" concentrated prevented the increase of serum urea concentration in elderly rats.

Key words: blood urea nitrogen, aging, multiprobiotic.

УДК 616.006.4+62.33.31+576.31+576.36+577.152

І. Белінська, канд. біол. наук, Л. Гарманчук, д-р біол. наук, О. Андрущенко, студ.,
О. Калмикова, студ., В. Рибальченко, д-р біол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА КЛІТИН ЛІНІЇ U-937 ЗА УМОВ ВПЛИВУ АКТИВАТОРА ПРОТЕЇН-КІНАЗИ С ФОРБОЛ-12-МІРІСТАТ-13-АЦЕТАТУ

Досліджено морфофункціональний стан клітин лінії U-937 за умов впливу активатора протеїнкінази С форбол-12-мірїстат-13-ацетату (РМА). Показано зменшення проліферативної активності U-937 за умов впливу РМА, за що свідчать дані зменшення загальної кількості клітин та мітотичного індексу. Кількість некротичних клітин за дії РМА не відрізняється від такої в контролі; тоді як рівень апоптозу зростає в 1,5 рази.

Ключові слова: клітини лінії U-937, мітотичний індекс.

Вступ. Порушення функціонування різних генів призводить до появи клітин, які не залежать від ростових сигналів, мають високий проліферативний потенціал, не здатні до кінцевого диференціювання та не вступають в фазу запрограмованої клітинної смерті, що призводить до виникнення та накопичення пухлинних клітин [1,2]. Ідентифікація таких патологічних генів та їх продуктів є мішенню для їх інактивації лікарськими препаратами та основою для оцінки прогнозу перебігу захворювання [3]. Одними із ключових молекул, які задіяні в передачі сигналу в клітині і визначають її долю (виживання, проліферацію, диференціювання або апоптоз) є протеїнкінази. Саме з їх гіперактивністю пов'язаний розвиток багатьох пухлин, в тому числі і гемопоетичних: хронічна мієлоїдна лейкемія – з хімерною протеїнкіназою BCR/ABL [4], хронічні мієлопроліферативні захворювання – з рецепторною мембранозв'язаною протеїнкіназою тромбоцитарного фактору росту (PDGF) [5], гостра мієлоїдна лейкемія – з FMS-протеїнкіназою 3 (Flt3), c-kit, фосфотидил-інозитол-3-кіназою (PI3K) та мітоген-активованими протеїнкіназами [6]. Захворювання кровотворної системи, які пов'язані із надмірною проліферацією моноцитарної лінії клітин на різних стадіях диференціювання включають гостру мієломоноцитарну і моноцитарну лейкемії, хронічну мієломоноцитарну лейкемію, гістіоцитарну лімфому та ін. [7]. Проліферація і активація моноцитів пов'язана із активацією різних протеїнкіназ [8,9]. Показано, що гіперекспресія фосфоінозітид-залежної кінази-1 (PDK1) призводить до активації мембранозв'язаної протеїнкінази С і виживання моноцитарних лейкоцидних клітин стійких до протипухлинної терапії, як наслідок, поганий прогноз і

короткий період виживання пацієнтів [10, 11]. Класичним лігандом до протеїнкінази С (PKC) є форбол-12-мірїстат-13-ацетат (phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA) [12]. PKC є складовою ланкою при передачі сигналів в клітині і бере участь у проліферації, диференціюванні і загибелі клітин [13, 14, 15]. Модельною лінією клітин для досліджень особливостей проліферації і диференціювання клітин моноцитарного ряду [16, 17], механізмів передачі сигналу в клітині [18, 19], впливу нових протипухлинних препаратів [20, 21], ролі моноцитів/макрофагів у хронічних захворюваннях [22, 23, 24] є U-937, яка належить до гемопоетичних клітин моноцитарно/макрофагального напрямку диференціювання [25].

Мета роботи полягала у дослідженні впливу активатора протеїнкінази С РМА на морфофункціональний стан та проліферативну активність клітин лінії U-937.

Матеріали і методи. Лінію клітин U-937 інкубували в 96-лункових планшетах в середовищі RPMI-1640 (Sigma, США) із додаванням 10% телячої ембріональної сироватки (Sigma, США), 2 мМ-глутаміна (Sigma, США), 40 мкг/мл гентаміцину (Біофарма, Україна), в присутності або без РМА (Sigma, США) в концентрації 100 нг/мл, за стандартних умов культивування (5% CO₂, 100% вологості, 37 °C) протягом 24 та 48 годин. Після цього підраховували кількість живих клітин і клітин, забарвлених 0,1% трипановим синім (мертвих клітин) в камері Горяєва. Для підрахунку кількості мітотичних, апоптотичних та некротичних клітин в зразках готували цитологічні препарати та фарбували за Паппенгеймом, аналізували 1000 клітин. Обчислювали середні значення і стандартне відхилення в програмі SPSS 16,0 для Windows. Різницю між досліджуваними показниками

вважали вірогідною за умов $p < 0.05$ за результатами t-критерія Стьюдента.

Результати та їх обговорення. РМА істотно впливає на морфофункціональний стан та проліферативну активність U-937. Як видно з рис. 1 зменшується кількість клітин на 31% після 24 годин ($34,38 \pm 1,77 \times 10^4$) і на 64% після 48 годин ($38,13 \pm 1,32 \times 10^4$) впливу РМА, без впливу РМА – $50,31 \pm 0,88 \times 10^4$; $106,41 \pm 4,20 \times 10^4$, відповідно. При цьому кількість мертвих клітин не змінюється. Аналіз цитологічних препаратів показав зменшення відсотка клітин у фазі мітозу майже вдвічі як після 24 годин впливу РМА ($1,65 \pm 0,21\%$), так і після 48 годин ($1,90 \pm 0,42\%$), без впливу РМА – $3,35 \pm 0,35\%$; $3,90 \pm 0,28\%$, відповідно. (рис. 2). На мікрофотографії (рис. 5. Б) видно зменшення співвідношення мітотичних клітин до загальної кількості клітин в порівнянні з U-937 без впливу РМА (рис. 5 А, В). Спостерігається збільшення кількості клітин в стадії апоптозу більше ніж на 50% (в 1,5 раза) (рис. 3, рис. 5 Д, Е), однак змін кількості некротичних клітин не виявлено (рис. 4, рис. 5. А, Е). Отже, виявлене нами зменшення загальної кількості клітин та мітотичного індексу, свідчить про зниження проліферативної активності U-937 за умов впливу РМА.

Виявлено також морфологічні зміни клітин під впливом РМА: так, спостерігається збільшення кількості відростків цитоплазми, зменшується ядерно/цитоплазматичне співвідношення, збільшується кількість вакуолей в цитоплазмі (рис. 5, Б, Г). За даними літератури відомо, що активація протеїнкінази С під впливом РМА призводить до збільшення експресії поверхневих антигенів CD11c і CD18, які є молекулами адгезії до ендотеліальних клітин, траспітотичного транспорту, хемотаксису та фагоцитозу, що вказує на диференціювання цих клітин [26]. Збільшується експресія лейкоцитарних антигенів (головного комплексу гістосумісності) і продукція цитокінів [27]. РМА підвищує експресію циклооксигенази у відповідь на дію ліпополісахаридів, що свідчить про підвищення функціональної активності U-937 [28]. Отже, можна зазначити, що активація РКС призводить до блокування проліферативної активності клітин і запуску їх диференціювання. Здійснення антибактеріального захисту та продукція цитокінів моноцитами/макрофагами, тобто виконання їх функцій, також пов'язана із активацією РКС [14, 18, 19]. Отримані нами дані є підтвердженням диференціювання клітин в моноцитарно-макрофагальному напрямку за дії РМА.

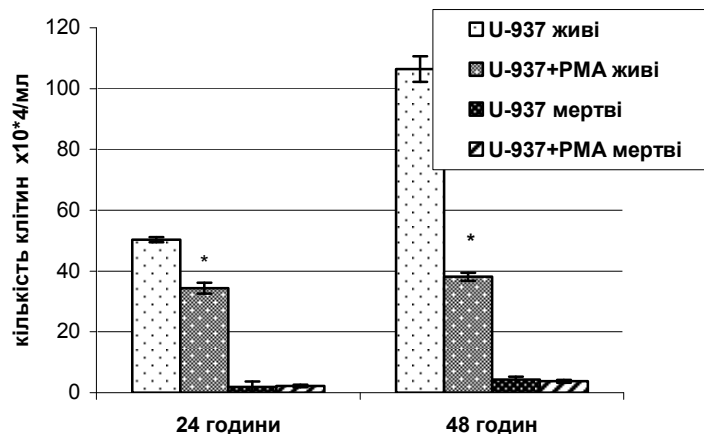


Рис.1. Кількість живих і мертвих клітин U-937 після 24 та 48 годин впливу 100 нг/мл форбол 12-мірістат 13-ацетату (РМА); * $p < 0,05$ U-937+PMA в порівнянні з U-937

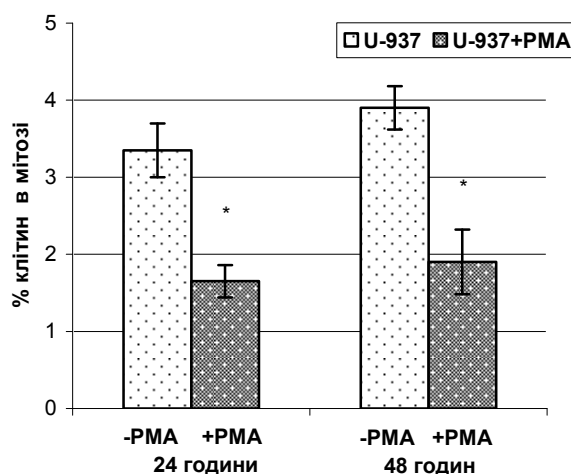


Рис.2. Відносний вміст клітин U-937 у стадії мітозу після 24 та 48 годин впливу 100 нг/мл форбол 12-мірістат 13-ацетату (РМА); * $p < 0,05$ U-937+PMA в порівнянні з U-937

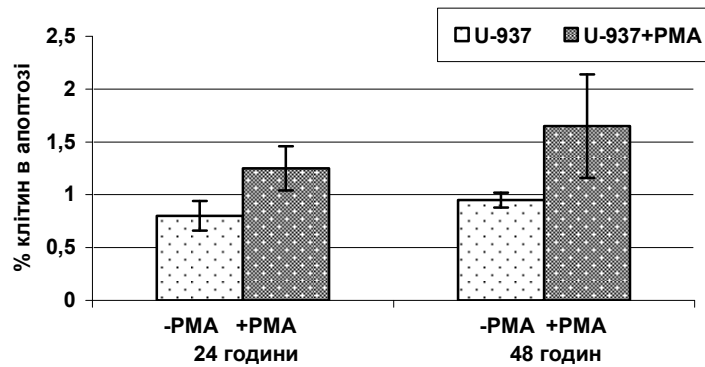


Рис.3. Відносний вміст клітин U-937 у стадії апоптозу після 24 та 48 годин впливу 100 нг/мл форбол 12-мірістат 13-ацетату (PMA)

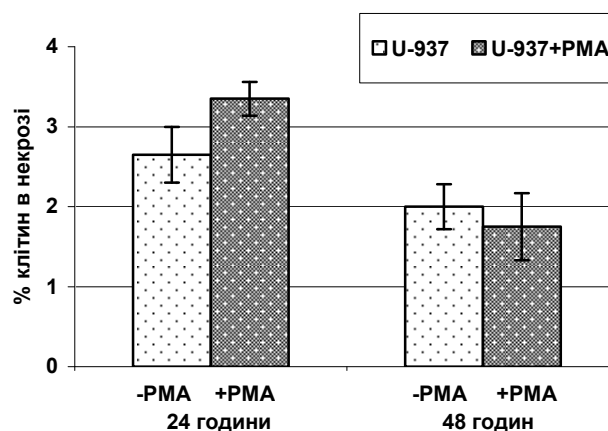


Рис.4. Відносний вміст клітин U-937 у стадії некрозу після 24 та 48 годин впливу 100 нг/мл форбол 12-мірістат 13-ацетату (PMA)

З іншого боку, PMA вважається промотором пухлин, оскільки в багатьох пухлинах протеїнкіназа C гіперактивована [29-31], але по відношенню до гемопоетичних клітин PMA розглядається як фактор, який запускає диференціювання, тому проводяться дослідження щодо використання даної сполуки в лікуванні різних варіантів лейкозів [32]. Крім цього, дослідження U-937 за умов впливу PMA можуть бути використані як модельні для досліджень різних видів лейкозів, в яких моноцитарні гемопоетичні попередники знаходяться на різному ступені диференціювання, наприклад, варіантів гострої монобластної лейкозії з та без диференціювання (M5a та M5b), гострої та хронічної мієломоноцитарної лейкозії. Так, при гострій монобластній лейкозії з диференціюванням (M5b) бластні клітини морфологічно мають характерні риси промоноцитів та моноцитів: невисоке ядерно/цитоплазматичне співвідношення, неправильна форма клітини та ядра (часто бобовидна), наявність азурофільної зернистості [1]. На відміну від цього, за умов M5a лейкозії бластні клітини з ознаками мінімального диференціювання: високим ядерно/цитоплазматичним співвідношенням, клітини і

ядра округлої форми, цитоплазма базофільна без азурофільної зернистості. При цих двох видах монобластної лейкозії гіперекспресуються різні ізоформи РКС: цитозольна фракція РКС- α і РКС- γ експресується при M5a лейкозії, РКС- β при M5b, а РКС- γ – взагалі не експресується [33]. Високий рівень експресії РКС виявлено при гострій мієло-моноцитарній лейкозії, а інгібування експресії РКС істотно пригнічує проліферацію лейкоцичних клітин і ініціює апоптоз [34, 35]. Протилежні дані одержані в роботах [36, 37]. Автори доводять, що активація РКС теж пригнічує проліферацію лейкоцичних клітин та запускає апоптоз і цей ефект підсилюється за умов впливу PMA. Такі протилежні дані щодо активації і інгібування РКС, які призводять до зниження проліферативного потенціалу клітини і активації програми фізіологічно запрограмованої смерті, ймовірно, пов'язані із активацією і пригніченням різних ізоформ цього ферменту. Про значну роль РКС у виживанні лейкоцичних клітин свідчать результати її гіперекспресії і резистентності до терапії за умов гострої та хронічної мієломоноцитарної і моноцитарної лейкозії [10, 11].

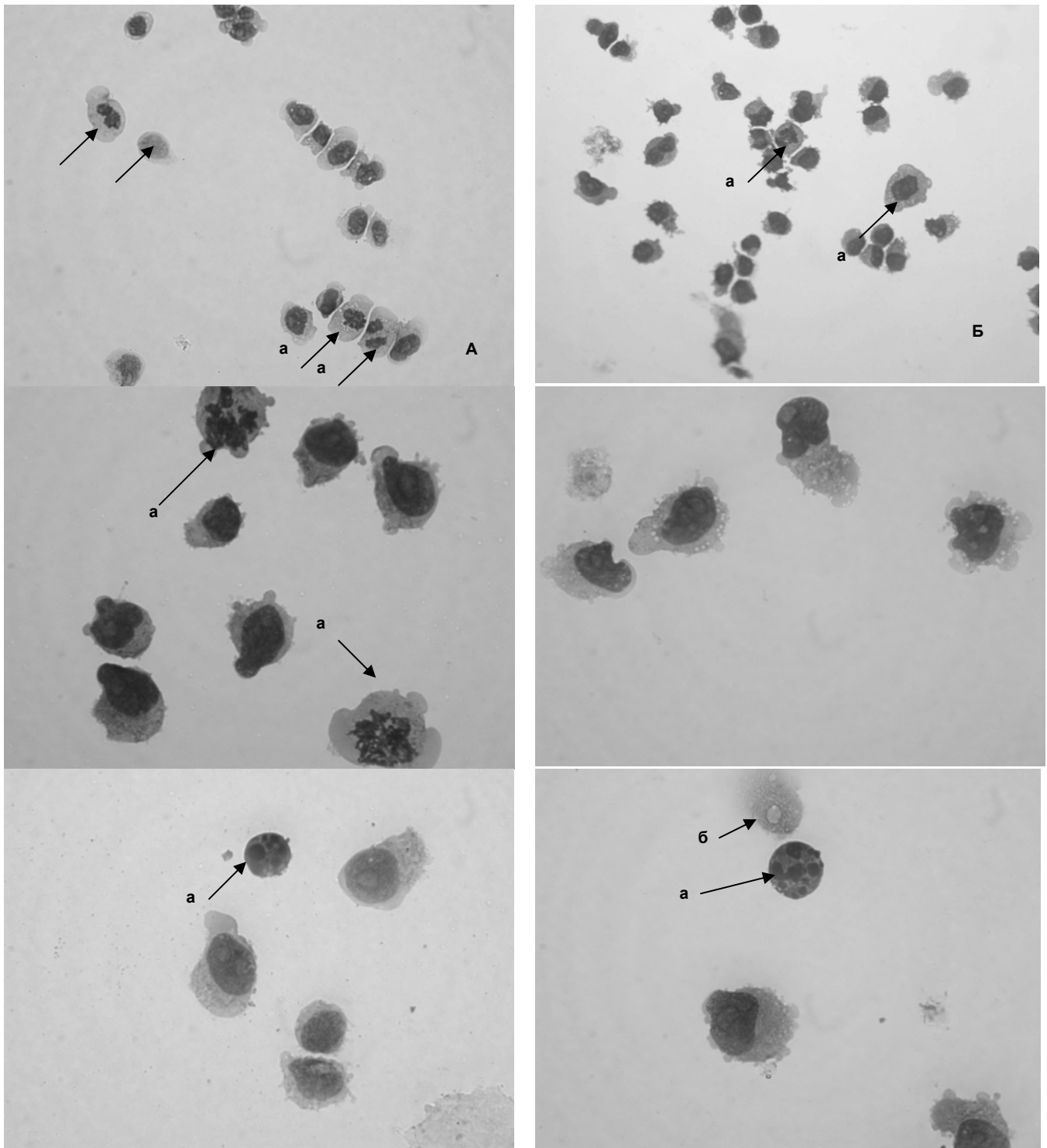


Рис. 5 Мікрофотографії цитологічних препаратів U-937, забарвлення за Паппенгеймом: А-U-937 24 години; Б – U-937 за умов впливу 100 нг/мл РМА, 24 години (А,Б x400); В, Д – U-937 48 годин; Г, Е – U-937 за умов впливу 100 нг/мл РМА, 48 годин (В-Е x1000); а – клітини у стадії мітозу, б – клітини у стадії апоптозу, в – клітини у стадії некрозу

Таким чином, із представлених результатів видно, що РКС відіграє важливу роль у виживанні, проліферації, диференціюванні і апоптозі гемопоетичних клітин, в тому числі і моноцитарного напрямку диференціювання. Ця протеїнкіназа є мішенню для антипроліферативних ефектів нових антилейкемічних сполук, а використання лінії клітин U-937 за умов впливу РМА та без нього є модельними для таких досліджень.

Висновки. Показано, що активатор протеїнкінази С форбол-12-мірістат-13-ацетату (РМА) зменшує про-

ліферативну активність U-937, про що свідчать зменшення загальної кількості клітин та мітотичного індексу. Кількість некротичних клітин за дії РМА не змінюється, тоді як рівень апоптозу зростає в 1,5 рази.

Список використаних джерел

1. Williams Hematology, eight edition / K. Kaushansky, M.A. Lichtman et al. – USA: The McGraw-Hill Companies, 2010. – 2440 p.
2. Домнинский Д.А. Молекулярные механизмы лейкозогенеза. // Онкогематология. – 2010. – №4. – С. 49-56.
3. Домнинский Д.А. Молекулярные механизмы лейкозогенеза. Основы таргетной терапии // Онкогематология. – 2012. – №1. – С. 54.

4. Goldman J.M., Melo J.V. BCR-ABL in chronic myelogenous leukemia – how does it work? // *Acta Haematol.* – 2008. – V.119, N4. – P. 212-217.
5. Wtefferi A., Elliott M., Shpardanani A. Atypical Myeloproliferative Disorders: Diagnosis and Management // *Mayo. Clin. Proc.* – 2006. – V.81, N4. – P.553-563.
6. Stirewalt D.L., Meshinchi S. Receptor tyrosine kinase alterations in AML – biology and therapy // *Cancer Treat. Res.* – 2010 – V.145. – P. 85-108.
7. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition / Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., Jaffe E.S. et al. – WHO, 2008. – 439 p.
8. Barreda D.R., Hanington P.C., Belosevic M. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors // *Dev. Comp. Immunol.* – 2004. – V.28, N5. – P.509-554.
9. Wang Y., Chen A-D., MeiLei Y. et al. Mannose-Binding Lectin Inhibits Monocyte Proliferation through Transforming Growth Factor- β 1 and p38 Signaling Pathways // *PLOS ONE.* – 2013. – V.8, Is.9. – e72505. – 12 P.
10. Zabkiewicz J., Peam L., Hills R. K. et al. The PDK1 master kinase is overexpressed in acute myeloid leukemia and promotes PKC-mediated survival of leukemic blasts // *Haematologica.* – 2013. – [Epub ahead of print] – doi:10.3324/haematol.2013.096487.
11. Peam L., Fisher J., Burnett A.K., Darley R.L. The role of PKC and PDK1 in monocyte lineage specification by Ras // *Blood.* – 2007. – V.109, N10. – P.4461-4469.
12. Blumberg P.M. Protein kinase C as the receptor for the phorbol ester tumor promoters: Sixth Rhoads. Memorial Award Lecture // *Cancer. Res.* – 1988. – V.48. – P. 1-8.
13. Edling C. Receptor tyrosine kinase C-Ki signalling in hematopoietic progenitor cells. – Umea-Universitet, Umea Shweden, 2006. – 62 p.
14. Tahara E., Kadara H., Lacroix L. et al. Activation of protein kinase C by phorbol 12-myristate 13-acetate suppresses the growth of lung cancer cells through KLF6 induction // *Cancer Biol. Ther.* – 2009. – V.8, N9. – P. 801-807.
15. Nomura N., Nomura M., Sugiyama K., Hamada J.-I. Src regulates phorbol 12-myristate 13-acetate-activated PKC-induced migration via Cas/Crk/Rac1 signaling pathway in glioblastoma cells // *Int. J. of Molec. Med.* – 2007. – V. 20, Is. 4. – P. 511-519.
16. Pagliara P., Lanubile R., Dwikat M. et al. Differentiation of monocytic U937 cells under static magnetic field // *European Journal of Histochemistry.* – 2005. – V.49, Is.1. – P. 75 – 86.
17. Matheson L.A., Maksym G.N., Santerre J.P., Labow R.S. Cyclic biaxial strain affects U937 macrophage-like morphology and enzymatic activities // *J. Biomed. Mater. Res. A.* – 2006. – V.76, N1. – P. 52-62.
18. Jin J., Sundararaj K.P., Samuvel D.J. et al. Different signaling mechanisms regulating IL-6 expression by LPS between gingival fibroblasts and mononuclear cells: seeking the common target // *Clin. Immunol.* – 2012. – V.143, N2. – P.188-99.
19. Li Y., Samuvel D.J., Sundararaj K.P. et al. IL-6 and high glucose synergistically upregulate MMP-1 expression by U937 mononuclear phagocytes via ERK1/2 and JNK pathways and c-Jun // *J. Cell. Biochem.* – 2010. – V.110, N1. – P.248-59.
20. Meerovich I., Koshkaryev A., Thekkedath R., Torchilin V.P. Screening and optimization of ligand conjugates for lysosomal targeting // *Bioconjug. Chem.* – 2011. – V.22, N11. – P. 2271-2282.
21. Tanaka M., Kano Y., Akutsu M. et al. The Cytotoxic Effects of Gemtuzumab Ozogamicin (Mylotarg) in Combination with Conventional Antileukemic Agents by Isobologram Analysis In Vitro // *Anticancer Res.* – 2009. – V.29, N11. – P.4589-4596.
22. Virok D., Loboda A., Kari L. et al. Infection of U937 Monocytic Cells with Chlamydia pneumoniae Induces Extensive Changes in Host Cell Gene Expression // *The Journal of Infectious Diseases.* – 2003. – V.188, N.9. – P. 1310-1321.
23. Vogel C.F.A., Garcia J., Wu D. et al. Activation of inflammatory responses in human U937 macrophages by particulate matter collected from dairy farms: an in vitro expression analysis of pro-inflammatory markers // *Environmental Health.* – 2012. – V.11, N17 – 9 p.
24. Nareika A., Im Y.B., Game B.A. et al. High glucose enhances lipopolysaccharide-stimulated CD14 expression in U937 mononuclear cells by increasing nuclear factor kappa B and AP-1 activities // *J. Endocrinol.* – 2008. – V.196, N1. – P. 45-55.
25. Sundstrom C., Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937) // *Int. J. Cancer.* – 1976. – V.17. – P. 565-577.
26. Shelley C.S., Teodoridis J.M., Park H. et al. During differentiation of the monocytic cell line U937, Pur alpha mediates induction of the CD11c beta 2 integrin gene promoter // *J. Immunol.* – 2002. – V.168, N8. – P. 3887-3893.
27. McIntire R.H., Morales P.J., Petroff M.G. et al. Recombinant HLA-G5 and -G6 drive U937 myelomonocytic cell production of TGF- β 1 // *J. of Leukocyte Biology.* – 2004. – V.76, N.6. – P.1220-1228.
28. Grkovich A., Johnson C.A., Buczynski M.W., Dennis E.A. Lipopolysaccharide-induced Cyclooxygenase-2 Expression in Human U937 Macrophages Is Phosphatidic Acid Phosphohydrolase-1-dependent // *J. Biol. Chem.* – 2006. – V.281. – P. 32978-32987.
29. Lebkowski J.S., McNally M.A., Okarma T.B., Lerch L.B. Inducible gene expression from multiple promoters by the tumor-promoting agent, PMA // *Nucl. Acids Res.* – 1987. – V.15, N21. – P. 9043-9055.
30. Filler R.B., Roberts S.J., Girardi M.I. Cutaneous Two-Stage Chemical Carcinogenesis // *Cold Spring Harb Protoc.* – 2007. – doi:10.1101/pdb.prot4837.
31. Hwang Y.P., Yun H.J., Kim H.G. et al. Suppression of PMA-induced tumor cell invasion by dihydroartemisinin via inhibition of PKC/Raf/MAPKs and NF- κ B/AP-1-dependent mechanisms // *Biochem. Pharm.* – 2010. – V.79. – P.1714-1726.
32. Strair R.K., Schaar D., Goodell L. et al. Administration of a Phorbol Ester to Patients with Hematological Malignancies: Preliminary Results from a Phase I Clinical Trial of 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate // *Clin Cancer Res.* – 2002. – V.8, N8. – P.2512-2518.
33. Komada F., Nishikawa M., Uemura Y. et al. Expression of Three Major Protein Kinase C Isozymes in Various Types of Human Leukemic Cells // *Cancer Res.* – 1991. – V.51. – P. 4271-4278.
34. Ruvo P.P., Zhou L., Watt J.C. et al. Targeting PKC-Mediated Signal Transduction Pathways Using Enzastaurin to Promote Apoptosis in Acute Myeloid Leukemia-Derived Cell Lines and Blast Cells // *J. Cell Biochem.* – 2011. – V.112, N6. – P. 1696-1707.
35. Mischiati C., Melloni E., Corallini F. et al. Potential role of PKC inhibitors in the treatment of hematological malignancies // *Current Pharm. Design.* – 2008. – V.14, N21. – P. 2075-2084.
36. Schmidmaier R., Oellerich M., Baumgart J. et al. Treosulfan-induced apoptosis in acute myeloid leukemia cells is accompanied by translocation of protein kinase C delta and enhanced by bryostatin-1 // *Exp. Hematol.* – 2004. – V.32, N1. – P.76-86.
37. Hampson P., Chahal H., Khanim F. et al. PEP005, a selective small-molecule activator of protein kinase C, has potent antileukemic activity mediated via the delta isoform of PKC // *Blood.* – 2005. – V.106. – P.1362-1368.

Надійшла до редколегії 17.01.14

И. Белинская, канд. биол. наук, Л. Гарманчук д-р биол. наук, А. Андрущенко, студ., А. Калмыкова, студ., В. Рыбальченко, д-р биол. наук КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КЛЕТОК ЛИНИИ U-937 В УСЛОВИЯХ ВЛИЯНИЯ АКТИВАТОРА ПРОТЕИНКИНАЗЫ С ФОРБОЛ-12-МИРИСТАТ-13-АЦЕТАТА

Исследовано морфофункциональное состояние клеток линии U-937 в условиях воздействия активатора протеинкиназы C форбол-12-миристат-13-ацетата (PMA). Показано уменьшение пролиферативной активности U-937 в условиях воздействия PMA, о чем свидетельствуют данные уменьшения общего количества клеток и митотического индекса. Количество некротических клеток в условиях PMA не отличается от таковой в контроле, тогда как уровень апоптоза возрос в 1,5 раза.

Ключевые слова: клетки линии U-937, митотический индекс.

I. Byelinska, PhD., L. Garmanchuk, DSc., A. Andruschenko, Stud., A. Kalmukova, Stud., V. Rubalchenko, DSc. Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS U-937 CELL LINE UNDER THE INFLUENCE ACTIVATOR PROTEIN KINASE C PHORBOL-12-MIRISTAT-13-ACETATE

Morphofunctional parameters of the U-937 cell line under the influence of protein kinase C activator forbol-12-miristat-13-acetate (PMA) have been studied. It has been shown PMA decreases proliferative activity of U-937, that is confirmed a decrease in the number of cells and mitotic index. The number of necrotic cells is not different from that in control. At the same time the level of apoptosis increased 1.5 times.

Key words: U-937 cell, mitotic index.

УДК 576.32/36:612.346

Л. Слободяник, асп.,
Є. Решетнік, канд. біол. наук, П. Янчук, д-р біол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

УЧАСТЬ МОНООКСИДУ АЗОТУ В РЕГУЛЯЦІЇ ДЕПОНУВАННЯ КРОВІ ПЕЧІНКОЮ

В гострих дослідях на щурах, внутрішньопортальне введення L-аргініну у дозах близьких до фізіологічної концентрації в крові, зумовлює розширення ємнісних судин печінки, внаслідок чого об'єм депонованої в них крові збільшується. Блокада NO-синтаз за допомогою L-NAME не тільки повністю усуває ефекти L-аргініну, але і зумовлює пригнічення ендогенного синтезу NO, що призводить до звуження внутрішньопечінкових ємнісних судин і, як наслідок, зменшення кровонаповнення органу.

Ключові слова: печінка, кровонаповнення, монооксид азоту, L-аргінін, L-NAME.

Вступ. Реалізація різноманітних функцій печінки та підтримання їх на оптимальному рівні відбувається лише за умов достатнього надходження крові до органу, яке здійснюється по печінковій артерії та ворітній вені [8, 9]. Однією з важливих функцій печінки є депонування нею крові. Попередник синтезу монооксиду азоту (NO) L-аргінін широко використовується в клінічній практиці [12, 23] і впливає на функціонування печінки, зокрема, здатний змінювати інтенсивність тканинного дихання у ній [32], впливати на білковий, ліпідний і вуглеводний обмін у залозі [6], діяти на її жовчосекреторну функцію [1, 20]. Незважаючи на те, що в літературі є роботи стосовно дії монооксиду азоту на функціонування печінки та тонус її артеріальних і ворітних судин [10, 15, 18, 27], вплив NO на ємнісні судини цього органа залишається недослідженим. Необхідність з'ясування ролі NO у регуляції депонуючої функції печінки обумовлена також особливостями її венозних судин, які можуть досить специфічно та нетипово реагувати на дію відомих судинорозширювальних речовин, зокрема ацетилхоліну [13, 17, 30, 33]. Метою нашої роботи було дослідити участь монооксиду азоту у регуляції депонування крові печінкою.

Матеріали і методи. Робота виконана в гострих дослідях на 56 білих нелінійних лабораторних щурах обох статей (29 – самок, 27 – самців) масою 200–350 г. Тварин наркотизували шляхом внутрішньоочеревинного введення розчину уретану (1 г/кг).

Під час експерименту у тварин реєстрували системний артеріальний тиск (САТ) та тиск у ворітній вені (ТВВ). Для цього здійснювали катетеризацію однієї із загальних сонних артерій та ворітної вени (ВВ). Вільні кінці катетерів під'єднували до датчиків електроманометра ЕМТ-31 (Швеція). Реєстрацію змін кровонапов-

нення печінки (КНП) здійснювали методом імпульсної плетизмографії у модифікації Цибенка та Янчука [29], використовуючи реограф РГ-4-01. Досліджувані показники записували на шлейфному осцилографі Н.071.6М.

Впродовж дослідів у щурів за допомогою електротермометра ТПЕМ-1 внутрішньоректально вимірювали температуру тіла і підтримували її на рівні $38 \pm 0,5^\circ\text{C}$ за допомогою електрообігрівача.

Використані у дослідженнях речовини вводили у ворітну вену безпосередньо або через гілку однієї із брижових вен. Використовували L-аргінін у дозах 2,5 та 5 мг/кг. Для з'ясування участі NO у впливах амінокислоти на досліджувані показники кровообігу використовували неселективний блокатор NO-синтаз L-NAME у дозі 20 мг/кг.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою аналітичного пакета STATISTICA 8.0 (StatSoft, USA). Оскільки при перевірці на нормальність тестом Шапіро-Вілکا всі наші результати мали нормальний розподіл, то вірогідність між залежними вибірками визначали з використанням t-критерію Стюдента. Результати, отримані у дослідженнях, представляли у вигляді $M \pm SD$ (середнє значення $\pm$ середньоквадратичне відхилення). Відмінності між групами вважали вірогідними при рівні значущості $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Внутрішньопортальне введення L-аргініну як у дозі 2,5 мг/кг, так і у дозі 5 мг/кг призводить до зниження системного артеріального тиску (САТ), тиску у ворітній вені (ТВВ) та збільшення КНП, що свідчить про судинорозширювальний ефект цієї амінокислоти в печінці (рис. 1; табл. 1).

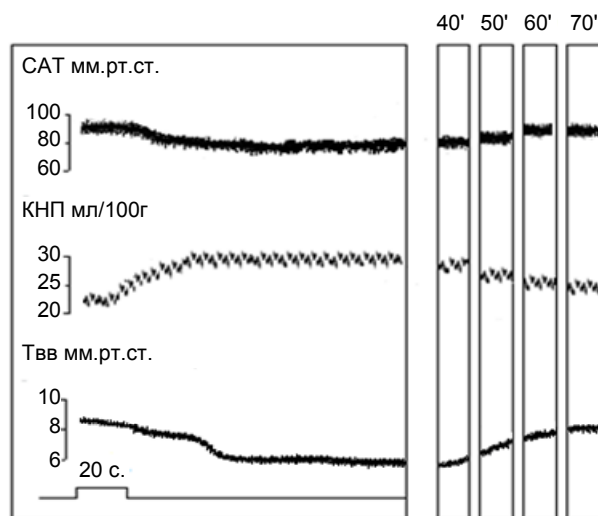


Рис. 1. Реакції системного артеріального тиску (САТ), кровонаповнення печінки (КНП) та тиску у ворітній вені (ТВВ), у відповідь на внутрішньопортальне введення L-аргініну (5 мг/кг)

Так, L-аргінін у дозі 2,5 мг/кг зумовлював зниження САТ на 19,8% ($p<0,05$), Твв на 27% ($p<0,05$) та збільшення КНП на 20% ($p<0,001$) порівняно з вихідними рівнями цих показників. У більшій дозі (5 мг/кг) амінокис-

лота викликала зниження САТ на 10,5% ($p<0,05$), Твв на 20,5% ($p<0,05$) та зростання КНП на 33% ($p<0,001$) щодо вихідного рівня.

Таблиця 1. Зміни системного артеріального тиску (САТ), тиску у ворітній вені (Твв) та кровонаповнення печінки (КНП) при внутрішньопортальному введенні L-аргініну в дозі 2,5 мг/кг ($n=13$, $M\pm SD$) і 5 мг/кг ($n=15$, $M\pm SD$)

Показники	Доза L-аргініну	Вихідний рівень	Максимум реакції	% реакції
САТ, мм.рт.ст.	2,5 мг/кг	85,0 $\pm$ 19,4	68,2 $\pm$ 9,0 $p<0,05$	80,2
	5 мг/кг	91,1 $\pm$ 12,4	81,6 $\pm$ 13,0 $p<0,05$	89,5
Твв, мм.рт.ст.	2,5 мг/кг	7,8 $\pm$ 2,2	5,7 $\pm$ 2,4 $p<0,05$	73,0
	5 мг/кг	8,3 $\pm$ 1,4	6,6 $\pm$ 1,6 $p<0,01$	79,5
КНП, мл/100 г	2,5 мг/кг	22,5 $\pm$ 1,4	27,0 $\pm$ 1,83 $p<0,001$	120,0
	5 мг/кг	21,8 $\pm$ 1,2	29,0 $\pm$ 2,2 $p<0,001$	133,0

Отже, отримані нами результати свідчать про те, що попередник синтезу монооксиду азоту L-аргінін у дозах, близьких до його фізіологічної концентрації у крові, зумовлює розширення кровеносних судин печінки (як судин опору, так і ємнісних), внаслідок чого кровонаповнення залози збільшується, а тиск у ворітній вені знижується.

Монооксид азоту відноситься до групи газоподібних медіаторів або газотрансмітерів. NO хімічно нестабільний та існує всього декілька секунд [25, 28]. На відміну від відомих медіаторів він не запасається в синаптичних везикулах, а виділяється відразу після синтезу. NO не має специфічних рецепторів на постсинаптичній мембрані, а проникає до клітин за рахунок дифузії, де діє на внутрішньоклітинні ферменти та йонні канали в різних системах організму, в тому числі і серцево-судинній. Він дифундує всередину судинної стінки і в тромбоцити, які знаходяться в тісному контакті з ендотелієм. В просвіті судини NO швидко інактивується розчинним киснем, супероксидними аніонами та гемоглобіном. Це, в свою чергу, попереджує дію NO на відстані від місця його секреції. Тому, монооксид азоту діє як локальний регулятор судинного тону [25]. В судинному руслі монооксид азоту виявляє вазодилаторні властивості [4, 18, 24, 26].

L-аргінін, будучи попередником синтезу NO, використовується в експериментальних роботах для дослідження впливу цієї молекули на функціонування різних систем та органів. Показана захисна роль L-аргініну в печінці, що проявляється у покращенні її кровопостачання та поліпшенні умов циркуляції крові в судинах залози [5, 22]. Проте відомо, що доза амінокислоти, більша за 200 мг/кг спричиняє розвиток патологічних процесів у підшлунковій залозі та печінці [16]. В нашій роботі ми використовували амінокислоту L-аргінін у дозах, близьких до його фізіологічної концентрації в крові [32].

Для перевірки залучення монооксиду азоту в дослідженні ефекти амінокислоти був використаний блокатор NO-синтази L-NAME [2, 3, 21]. У відповідь на болюсне внутрішньопортальне введення L-NAME (20 мг/кг) спостерігалось підвищення САТ на 33,8% ($p<0,01$) і Твв на 29,6% ($p<0,01$), а також зниження КНП на 20% ($p<0,001$) відносно вихідного рівня. Ці результати свідчать про те, що L-NAME заблокував роботу NO-синтази, завдяки чому відбувалось пригнічення ендогенного синтезу монооксиду азоту. Внаслідок цього, внутрішньопечінкові судини звужились, що і призвело до підвищення в них тиску та зменшення об'єму депонованої в печінці крові (табл.2).

Таблиця 2. Вплив внутрішньопортального введення L-NAME в дозі 20 мг/кг на системний артеріальний тиск (САТ), тиск у ворітній вені (Твв) та кровонаповнення печінки (КНП) ($n=11$, $M\pm SD$)

Показники	Доза L-NAME	Вихідний рівень	Максимум реакції	% реакції
САТ мм.рт.ст.	20 мг/кг	80,7 $\pm$ 2,8	108 $\pm$ 3,3 $p<0,01$	133,8
Твв мм.рт.ст.	20 мг/кг	5,86 $\pm$ 1,7	7,6 $\pm$ 2,8 $p<0,01$	129,6
КНП мл/100 г	20 мг/кг	23,1 $\pm$ 1,5	18,5 $\pm$ 2,1 $p<0,001$	80,0

Як свідчать наші подальші дослідження, L-NAME усував судинорозширювальні ефекти в печінці, зумовлені L-аргініном. Спостерігались протилежні зміни досліджуваних показників. Так, САТ при дозі амінокислоти 2,5 мг/кг підвищувався на 14,8% ($p<0,05$), Твв – на 36% ($p<0,01$), а КНП зменшувалось на 22,2% ($p<0,001$) порівняно з вихідним рівнем. Більша доза L-аргініну (5 мг/кг) спричиняла на фоні дії блокатора NO-синтази аналогічний вплив на показники кровообігу: підвищення САТ – на 37,6% ($p<0,01$) та Твв – на 20,8% ($p<0,05$), зменшення КНП – на 20,3% ($p<0,05$) відносно вихідного рівня (табл.3).

Під депонуючою функцією будь-якого органу, в тому числі й печінки, вважають здатність накопичувати їхніми ємнісними кровеносними судинами та зберігати в них великі об'єми крові, тоді як зворотною функцією є мобі-

лізація крові – викид її із депо до системного кровеносного русла. До відносно недавнього часу не було остаточно з'ясовано, які саме судини печінки і в якій мірі беруть участь у депонуванні крові органом під впливом різних чинників. Більшість дослідників вважала, що до реалізації цієї функції залучені ворітні вени, синусоїди та печінкові вени. Особлива увага зверталась на останні судини, які чинять малий опір току крові та в невеликій мірі фіксуються оточуючими тканинами, що полегшує їхнє пасивно-еластичне розширення і накопичення в них значних об'ємів крові [9, 31].

Деякі автори відводять істотну роль у формуванні печінкової гемодинаміки її синусоїдам [7, 14, 19]. Однак, на перший погляд, важко уявити, яким чином печінкові синусоїди змінюють свій просвіт, адже у їхньому складі

відсутні м'язові волокна. Вважається, що такі судинорухові реакції відбуваються завдяки скоротливій активності зірчастих клітин. Як відомо, крім ендотеліальних клітин до складу синусоїдної стінки входять зірчасті ретикулоендотеліоцити, клітини Купфера та ямочні клітини. До зірчастих ретикулоендотеліоцитів відносять клітини Іто, перицити та ліпоцити печінки [11]. Саме клітини Іто відіграють основну роль у регуляції діаметру синусоїдів. Вони розташовані навколо синусоїдів та містять у своєму складі скоротливий білок десмін та α -актин гладеньких м'язів. Тому вплив на ці клітини вазоактивних речовин призводить до їхнього скорочення або розслаблення. Завдяки особливостям свого розташування клітини Іто, скорочуючись, стискають синусої-

ди і навпаки, розслаблюючись, збільшують їх просвіт [11]. Крім того, просвіт синусоїдів регулюється також сфінктерами та клітинами Купфера. Але роль останніх, ймовірно, опосередкована. Роль пресинусоїдних сфінктерів можуть виконувати також ворітні венули, які здатні змінювати свій діаметр, тим самим регулюючи надходження крові у синусоїди. Результати проведених нами раніше досліджень [17] свідчать про те, що реакції мобілізації крові із печінки у відповідь на ацетилхолін здійснюються за участю печінкових вен і, ймовірно, синусоїдів, але, без залучення внутрішньопечінкових ворітних вен. Тому у реакціях збільшення кровонаповнення печінки під впливом NO беруть участь, як ми вважаємо, істинно ємнісні судини органа – печінкові вени та синусоїди.

Таблиця 3. Зміни системного артеріального тиску (САТ), тиску у ворітній вені (Твв) та кровонаповнення печінки (КНП) у відповідь на внутрішньопортальне введення L-аргініну в дозах 2,5 мг/кг (n=13, M $\pm$ SD) та 5 мг/кг (n=14, M $\pm$ SD) на фоні дії L-NAME 20 мг/кг

Показники	Доза L-аргініну	Вихідний рівень	Максимум реакції	% реакції
САТ мм.рт.ст.	2,5 мг/кг	81,9 $\pm$ 13,8	94,1 $\pm$ 21,8 p<0,05	114,8
	5 мг/кг	71,5 $\pm$ 18,2	98,4 $\pm$ 24,8 p<0,01	137,6
Твв мм.рт.ст.	2,5 мг/кг	5,35 $\pm$ 1,6	7,28 $\pm$ 2,9 p<0,01	136
	5 мг/кг	6,7 $\pm$ 2,4	8,1 $\pm$ 2,7 p<0,05	120,8
КНП мл/100 г	2,5 мг/кг	23,5 $\pm$ 1,3	18,3 $\pm$ 1,4 p<0,001	77,8
	5 мг/кг	22,2 $\pm$ 1,5	17,7 $\pm$ 2,0 p<0,05	79,7

Зареєстроване нами збільшення кровонаповнення печінки у відповідь на введення L-аргініну, в першу чергу, зумовлене розширенням істинно ємнісних судин: печінкових венул та вен малого і середнього діаметру, а також може бути результатом як розширення пресинусоїдних сфінктерів, так і розслаблення клітин Іто, які ініціюють збільшення просвіту печінкових синусоїдів. Усунення змін кровонаповнення печінки блокадою NO-синтаз за допомогою L-NAME вказує на те, що ініціюються ці вазодилаторні ефекти монооксидом азоту, який синтезується ендотеліоцитами ємнісних судин.

Отримані нами експериментальні дані в певній мірі узгоджуються з результатами досліджень інших авторів, які також вивчали участь NO у регуляції печінкової гемодинаміки [18, 27]. Але вони досліджували при цьому тонус внутрішньопечінкових судин опору (печінкової артерії та ворітної вени). Ми поряд з тиском у ворітній вені, який характеризує опір портальних судин, реєстрували й реакції кровонаповнення печінки, що свідчать про зміни тонусу ємнісних судин органа. Наші експерименти підтверджують той факт, що NO знижує тонус внутрішньопечінкових ворітних судин. Поряд з цим нами встановлено, що монооксид азоту зменшує тонус і ємнісних судин печінки, збільшуючи тим самим депонування нею крові.

Висновки. Результати наших досліджень свідчать про те, що монооксид азоту відіграє важливу роль у регуляції депонування крові печінкою. Свідченням тому є розширення ємнісних судин залози, зумовлене внутрішньопортальним введенням попередника синтезу NO L-аргініну, внаслідок чого об'єм депонованої в печінці крові збільшується. Блокада NO-синтаз за допомогою L-NAME не тільки повністю усуває ефекти L-аргініну, але й зумовлює пригнічення ендогенного синтезу NO, що призводить до звуження внутрішньопечінкових ємнісних судин і, як наслідок, зменшення кровонаповнення органа.

Список використаних джерел

- Arrese M., Trauner M. Molecular aspects of bile formation and cholestasis // Trends. Mol. Med. – 2003. – Vol. 9 (12) – P.558-564.
- Bai Y., Sun L., Yang T. et al. Increase in fasting vascular endothelial function after short termoral L-arginine is effective when baseline flow-mediated dilation is low: a meta-analysis of randomized controlled trials // Am. J. Clin. Nutr. – 2009. – Vol. 89 (1) – P. 77 – 84.
- Boger G.I., Rudolph T.K., Maas R. et al. Asymmetric dimethylarginine determines the improvement of endothelium-dependent vasodilation by simvastatin: effect of combination with oral L-arginine // J. Am. Coll. Cardiol. – 2007. – Vol. 49 (23) – P. 2274–2282.
- Costa D. C. L-arginine attenuates acute pulmonary embolism-induced increases in lung matrix metalloproteinase // Chest. – 2005. –Vol. 128, № 5. – P. 3705 – 3710.
- Diesen D. L. Nitric oxide and redox regulation in the liver: part II. Redox biology in pathologic hepatocytes and implications for intervention. // J. Surg. Res. – 2011. – Vol. 167. – P. 96 – 112.
- Hismiogullari A.A., Bozdai A.M., Rahman K. Biliary lipid secretion // Turk. J. Gastroenterol. – 2007. – Vol. 18, № 2. – P. 65-70.
- Ishikawa, Sperelakis, McCuskey R. S. Morphological mechanisms for regulating blood flow through hepatic sinusoids // Liver – 2000. – Vol. 20. – P. 13 – 17.
- Lautt W., Macedo M. Nitric oxide and the hepatic circulation // J. Physiol. – 2000. – P. 243 – 258.
- Lautt W.W., Legare D.J., Greenway C.V. Effect of hepatic venous sphincter contraction on transmission of central venous pressure to lobar and portal pressure // Can. J. Physiol. Pharmacol. – 1987. – Vol. 65 (11) – P. 2235-2243.
- Macedo M.P., Lautt W.W. Shear -induced modulation by nitric oxide of sympathetic nerves in the superior mesenteric artery // Can. J. Physiol. Pharmacol. – 1996. – Vol. 74. – P. 692 – 700.
- McCuskey R.S. Morphological mechanisms for regulating blood flow through hepatic sinusoids // Liver. – 2000. – 20. – P.13–17.
- Ozsoy Y., Ozsoy M., Coskun T. et al. The effects of L-Arginine on liver damage in experimental acute cholestasis an immunohistochemical study // HPB Surgery. – 2011. – Vol. 11. – P.306069 – 306074.
- Reilly F.D., Dimlich R.V.W., Cilento E.V., McCuskey R.S. Hepatic microvascular regulatory mechanisms. II. cholinergic mechanisms // Hepatology – 1982. – Vol. 2, № 2. – P. 230 – 235.
- Shibamoto T., Narushima M., Ling Y.O., Shimo T., Tsuchida H., Kurata Y. Different hepatic vascular response to noradrenaline and histamine between uinea pig and rats // Acta. Physiol. Scand. – 2004. – 180. – P.255–263.
- Shimamura K., Zhou M., Toba M., Kimura S. Effects of L-arginine on spontaneous contraction of the rat portal vein // Pflugers Arch. – 2003. – Vol. 446 – № 1 – P. 30-35.
- Tashiro M.1., Schäfer C., Yao H., Ernst S.A., Williams J.A. Arginine induced acute pancreatitis alters the actin cytoskeleton and increases heat

shock protein expression in rat pancreatic acinar cells // Gut. – 2001. – Vol. 49, №2. – P. 241-50.

17. Yanchuk P., Prikhodko T., Pasichnichenko O. Mechanisms of contractile action of acetylcholine on hepatic vein // Intern. J. Physiology and Pathophysiology – 2011. – Vol. 2, № 4. – P. 379-387.

18. Yang W., Benjamin I.S., Alexander B. Nitric oxide modulates acetylcholine-induced vasodilation in the hepatic arterial vasculature of the dual-perfused rat liver // Acta. Physiol. Scand. – 2001. – Vol. 171 – 413p.

19. Oda M., Yokomori H., Han J.Y. Regulator mechanism of hepatic microcirculation // Clin. Hemorheol. Microcirc. – 2003. – Vol 29, № 3-4 – P. 167 – 182.

20. Бондзик О.В., Решетник Є.М., Весельський С.П., Янчук П.І. Вплив L-аргініну на спектр холатів у жовчі щурів // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского – 2012. – Т. 25 (64), № 2. – С. 37-43.

21. Ивашкин В. Т., Драпкина О. М. Оксид азота в регуляции функциональной активности физиологических систем // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии – 2000. – № 4. – С. 16–21.

22. Киричук В.Ф. Оксид азота и микроциркуляторное звено системы гемостаза (обзор литературы) // Успехи физиол. наук. – 2008. – Т. 32, № 4. – С. 83 – 91.

23. Максимович Н.Е., Маслаков Д.А. Аминокислота L-аргинин и перспективы её использования в клинике // Здравоохранение – 2003. – № 5. – С. 35-37.

24. Мойбенко О.О., Сагач В.Ф., Ткаченко М.М. та ін. Фундаментальні механізми дії оксиду азоту на серцево-судинну систему як основи патогенетичного лікування її захворювань // Фізіолог. журн. – 2004. – Т. 50, № 1. – С. 11–30.

25. Романовская Г. А. Перспективы медикаментозного лечения эндотелиальной дисфункции // Фарматека. – 2005. – № 9. – С. 31 – 37.

26. Сагач В.Ф. Роль оксида азота в регуляции кровообращения // В кн.: Пурины и монооксид азота. Регуляторная функция в организме. Минск: Технопринт, 2003. – С. 110–113.

27. Салей А.П., О. И. Болтенкова, М. Ю. Мещерякова, М. П. Зарубина Вазодилатация сосудов изолированной печени в условиях стимуляции L-аргинином // Физиология и психофизиология мотиваций: меж-регион. сб. науч. работ – 2007. – Вып. 8. – С. 32 – 37.

28. Тейлор Б. С. Индуцибельная синтаза оксида азота в печени: регуляция и функции // Биохимия. –1998. –Т.63 – Вып.7. – С. 905 – 923.

29. Цыбенко В.А., Янчук П.И., Симоненко П.Н. Применение импедансной плетизмографии для изучения депонирующей функции печени в остром опыте // Физиол. журн. АН УССР. – 1984. – Т. 30, № 6. – С. 756-758.

30. Янчук П.И., Приходько Т.П., Пасичніченко О.М. та ін. Механізм скоротливої дії ацетилхоліну на печінкові вени // Фізіол. ж. – 2011. – Т.57, № 1. – С.21-26.

31. Янчук П.І. Нейрогуморальна регуляція кровообігу і дихання печінки : Автореф. дис. доктора біол. наук: 03.00.13/ Київський національний університет – К., 2003. – 40 с.

32. Янчук П.І., Бондзик О.В., Решетник Є.М., Весельський С.П. Вплив L-аргініну на показники кисневого балансу печінки та її жовчосекреторну функцію // Фізіол. журн. – 2013. – Т. 59, № 2. – С. 31-38.

33. Янчук П.І., Пасичніченко О.М., Комаренко В.І., Приходько Т.П., Цыбенко В.О. Механізми судинозвужувальної дії ацетилхоліну у ворітному руслі печінки //Фізіол. журн. – 2006. – Т. 52, № 5 – С. 23-28.

Надійшла до редколегії 15.04.14

Л. Слободяник, асп., Е. Решетник, канд. біол. наук, П. Янчук, д-р біол. наук КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

УЧАСТИЕ МОНООКСИДА АЗОТА В РЕГУЛЯЦИИ ДЕПОНИРОВАНИЯ КРОВИ ПЕЧЕНЬЮ

В острых опытах на крысах, интратрипортальное введение L-аргинина в дозах близких к физиологической концентрации в крови, стимулирует расширение емкостных сосудов печени, в результате чего объем депонированной в них крови увеличивается. Блокирование NO-синтазы с помощью L-NAME не только полностью устраняет эффекты L-аргинина, но и снижает эндогенный синтез NO, что приводит к сужению интрапеченочных емкостных сосудов и, как следствие, уменьшению кровенаполнения органа.

Ключевые слова: печень, кровенаполнение, монооксид азота, L-аргинин, L-NAME.

L. Slobodjanyk, PhD stud, E. Reshetnik, PhD, P. Yanchuk, DSc
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

NITRIGEN MONOXIDE PARTICIPATION IN THE REGULATION OF DEPOSIT OF BLOOD LIVER

In acute experiments on rats, intravenous introduction of L-arginine at doses close to physiological concentrations in the blood, causes liver enlargement capacitance vessels, thus volume of deposited the blood are increased. Blockade of NO synthase using L-NAME not only eliminates the effects of L-arginine, but also leads to inhibition of endogenous NO synthesis, which leads to a narrowing of the intrahepatic blood vessels and the consequent reduction in blood supply authority.

Key words: liver, deposited blood in liver, nitric oxide, L-arginine, L-NAME.

УДК 591.526.598.265.1

Т. Шупова, канд. біол. наук
Інститут еволюційної екології НАН України, Київ

УТВОРЕННЯ МІСЬКОЇ ПОПУЛЯЦІЇ ПРИПУТНЯ (*COLUMBA PALUMBUS* L.) В КИСВІ

*Стартовими ділянками для утворення міських популяцій припутня (*Columba palumbus* L.) є території, які включають як змінені, так і природні біотопи з деревними насадженнями. В Києві такою ділянкою є парк "Феофанія", де припутні завжди гніздилися на лісових ділянках. З 2008 р. птахи почали селитись і в центральній забудованій частині парку. Після першого вдалого гніздування припутня в урбанізованих умовах існування, птахи швидко опановують територію міста і заселяють квартали житлової багатоповерхової забудови.*

Ключові слова: популяції припутня, природні біотопи.

Вступ. Збільшення площ населених пунктів, призводить до зникнення природних біотопів і посилення впливу фактору турбування на птахів. Це спонукає птахів, до певних змін у їх біології та поведінці. Все більша кількість видів пристосовується до існування в урбанізованому середовищі. Близько 75 % ареалу припутня знаходиться в Європі [2]. В межах території колишнього РСРС припутень завжди вважався типово лісовим птахом [13]. Протягом останніх 20 років спостерігалось зростання чисельності виду [5; 7; 17] та розширення ареалу його гніздування [7; 9; 10]. Перші випадки синантропного гніздування припутня та заселення ним урбанізованого середовища спостерігались в країнах Західної Європи, що детально описано Є.Л. Ликовим [12]. На території Західної Європи припутень гніздився в трьох типах ландшафтів. Він є звичайним гніздовим

видом лісів, оселяється в деревних насадженнях агроландшафтів і формує особливі міські популяції [3; 4; 12; 21]. До недавнього часу на території України припутні населяли лише ліси та лісові ділянки на сільськогосподарських землях. К. Кесслер у 1851 р. [11] описує припутня як не чисельного птаха, широко розповсюдженого, такого, що гніздиться у великих глухих лісах окремими парами та відвідує невеликими групами відкриті біотопи для годівлі. М.В. Шарлемань у 1938 р. [20] вже характеризує цих птахів як звичайних, а місцями і чисельних, але таких, що гніздяться в лісах. Наприкінці ХХ сторіччя окремі популяції припутня почали опановувати змінені ландшафти України. На заході країни з'явилися птахи, що ведуть синантропний спосіб гніздування. В Україні вперше такі гнізда припутня зареєстровані в невеликих населених пунктах Хмельницької області у

1986 р. [8]. З 1994 р. описано регулярне гніздування виду у м. Чернівці [18], а з 1998 р. у Львові [17]. В той же час, у центральній і східній частині країни припутень залишається птахом, який уникає таких ділянок, що активно відвідуються людьми. Гніздиться він виключно поза населеними пунктами. На початку XXI сторіччя Г.В. Фесенко відмічає, що для парків і скверів центральної частини Києва припутень ще не є характерним птахом [19]. Лише на Південному березі Криму відомі поселення цього голуба в старих парках [6].

В інших регіонах припутні також адаптуються до урбанізованих умов існування. На початку XXI сторіччя птахи вдало опанували в якості гніздових біотопів штучні лісонасадження, а потім і урбанізовані ландшафти Ставропольського краю [7]. Не чисельні синантропні пари гніздяться в парках в деяких містах Литви [3].

Метою роботи є з'ясування шляхів заселення припутнем (*Columba palumbus* L.) м. Києва, та адаптації його, як представника лісової фауни, до урбанізованих ландшафтів Центральної України. Перші знахідки припутнів у гніздовий період були випадковими. Але вони спонукали нас до цілеспрямованого дослідження цього виду в урбанізованому ландшафті. Нас цікавлять саме шляхи заселення припутнем крупних населених пунктів. В разі реалізації цього процесу в Києві, ми будемо мати можливість в подальшому дослідити урбанізовану популяцію припутня, яка має найбільш східне розташування в межах України.

Матеріали і методи дослідження. У роботі надано матеріал, зібраний нами в межах міста Києва протягом 2008–2013 рр. Гніздування припутня досліджували шляхом пошуку максимально можливої кількості гнізд і гніздових ділянок. Знайдені гнізда і гніздові ділянки описували: відзначали біотоп, вид дерева, на якому знаходилось гніздо, висоту його розташування. Жилі гнізда контролювали. Дослідження вмісту гнізд на даному етапі роботи за мету не ставилось у зв'язку з низькою чисельністю припутня, що гніздиться в Києві. На сучасному етапі колонізації Києва припутнем, гнізда його у межах міста одиничні і будь-яке втручання в процес гніздування може порушити хід утворення урбанізованої популяції цього голуба. Обсяг обстеженої нами території Києва та його околиць близько 48 км². Для регіону характерний різноманітний рельєф, густа річкова мережа з широкими річковими долинами. У багатьох долинах проведено меліоративні заходи, інші зайняті заплавно-лучними ландшафтами. Лісові ділянки невеликі [14]. Поступова розбудова Києва призвела до того, що лісові урочища, які раніше належали до його зеленої зони, опинилися в межах міста і перетворилися в лісопарки з постійно зростаючим рекреаційним навантаженням [1].

Результати та їх обговорення. Дослідженням встановлено, що стартовою ділянкою для заселення міста припутнем виявився парк-пам'ятка садово-паркового мистецтва "Феофанія". Саме тут знайдені перші гнізда цього виду, влаштовані таким чином, що їх можна віднести до урбанізованого типу поселення, а саме в місцях суттєвого антропогенного впливу – поряд зі службовими будинками в центрі парку.

Парк-пам'ятка садово-паркового мистецтва "Феофанія" є своєрідним комплексом природних і трансформованих біотопів. До складу парку входить окультурена центральна частина і розташований на периферії ліс. Знаходиться парк на південній межі Києва, на кордоні з селом Хотів. Загальна площа його 150 га. Ліс "Феофанія" – ізольована ділянка системи Голосіївського Лісу. Рослинність представлена, в основному, угрупованнями корінної діброви з високою концентрацією вікових дерев [16]. Для території урочища характерним є до-

линно-балочний рельєф. Є ділянки дубово-грабових лісів, вторинного грабового лісу, штучних лісових насаджень. В типових для урочища "Феофанія" лісах, дуб звичайний (*Quercus robur* L.) створює перший ярус, висотою до 30 м. Граб (*Carpinus betulus* L.) з липою серцелистою (*Tilia cordata* Mill.) та кленом гостролистим (*Acer platanoides* L.) – другий, висотою 14–16 м. Доповнюють деревну рослинність ясені (*Fraxinus excelsior* L.), береза бородавчаста (*Betula verrucosa* Ehrh.), дика груша (*Pyrus communis* L.) [15]. Центральна частина парку засаджена декоративними культурами. Тут створена мережа доріжок, що вкриті плиткою, влаштовані лавочки та інші споруди для відпочинку людей. У "Феофанії" ми регулярно відмічали припутня в гніздовий період з 2008 р. Детальні дослідження парку-пам'ятки садово-паркового мистецтва "Феофанія" у 2009–2013 роках, виявили постійну наявність припутня в гніздовий сезон: спостерігалась його вокалізація та збір матеріалу для облаштування гнізд. На лісових ділянках парку "Феофанія" протягом 2008–2011 рр. знайдено по 2 пари припутня, що гніздилися, 3 пари 2012 року, і 4 пари 2013 року. В окультуреній частині парку з 2010 р. постійно гніздиться 1 пара цих голубів. Найбільш рання реєстрація птахів в парку – 5 квітня. На гніздових ділянках голуби з'являються вже парами. За 1–2 дні після прильоту птахи активно оглядали гніздові ділянки. При цьому, птахів не можна було характеризувати як скритних та обережних. Першу шлюбну вокалізацію птахів нами зафіксовано 2012 р. 11 квітня, а 2013 р. – 7 квітня. В шлюбний період голуби під час усього світлового періоду доби облітали гніздову ділянку, виконували токові польоти, вокалізували, збирали будівельний матеріал для гнізд. Під час виконання цих ритуалів птахи не звертали уваги на людей, що відпочивають та працюють. В центральній окультуреній частині парку "Феофанія", в якості присади птахи використовували старі дерева ялини звичайної (*Picea abies* L.) і берези бородавчастої, що розташовані поряд з будівлями. Протягом квітня і травня припутні опановували центр парку і лісопаркову ділянку біля озер. Наприкінці травня голуби стали обережними і, у випадку зустрічі зі спостерігачем, відлітали з поля зору. Протягом дня вони були особливо скритними, але постійно відвідували центральну частину парку. Вечері, після залишення парку відпочиваючими, птахи підвищували активність: поновлювали вокалізацію і шлюбні польоти. У 2012 р. припутень гніздився на одній з ялин, що зростають поряд зі службовим входом до Інституту еволюційної екології НАН України на висоті 6 м. Гніздо розташоване біля стовбура. На цьому ж дереві на висоті близько 4 і 5 м. знаходились аналогічно розташовані гнізда минулих років. У 2013 р. на початку гніздового сезону припутні активно вокалізували на старому місці гніздування. Але гніздо було обласшоване в іншому місці – у центрі парку, на одній з алей. Для гніздування птахи також використовували ялину. Гніздо розташовувалось в густині однієї з бокових гілок. Висота розташування гнізда 2,5 м.

Інші пари припутня гніздували на лісових ділянках парку. Одне з гнізд у 2011 р. розташовувалось на боковій гілці граба звичайного біля стовбура на висоті близько 8 м. Граб розташовувався в 6 м. від доріжки, і гніздо було достатньо примітним. Необхідно звернути увагу на те, що, 2012 р. птахи на цій ділянці не гніздилися. Територія її не належить до парку і навесні, саме під час гніздового сезону, там проводились будівельні роботи. Для птахів така розбудова стала надлишковим стресовим фактором і, хоча – після завершення будівництва, голуби все ж відвідували ділянку, гніздовий сезон закінчився невдало. У 2013 р. птахи поновили

гніздування. На інших ділянках лісу гнізда не були знайдені, але спостерігались птахи, що проявляють активну гніздову поведінку навесні і влітку, а також молоді наприкінці гніздового сезону. Вокалізація припутня реєструвалась нами протягом всього літа. Така вокалізація описана в якості зв'язку поміж птахами сусідніх гніздових територій [13]. На лісових ділянках ми неодноразово відмічали саме почергову вокалізацію голубів з різних гніздових ділянок. Годуватись припутні літали на колишні сільськогосподарські угіддя, які поросли бур'янами, і на луг, що розташовані поряд з парком. Дорослі особини відвідували поля протягом всього гніздового сезону, а з 4 липня на годівлі були відмічені і молоді птахи. Дорослі птахи годувались одноосібно, а молоді птахи тримались разом. По закінченні гніздового сезону птахи відвідували масив багатоповерхових будівель службового та житлового призначення що знахо-

диться поряд з парком. Поступово кількість пар припутня урбанізованого типу гніздування в даному районі збільшилось (рис. 1). Птахи гніздилися недалеко від парку "Феофанія" – у дворі Інституту теоретичної фізики. Для влаштування гнізда пара обрала ялину звичайну. У 2012 р. гніздо знаходилося на висоті 4 м на боковій гілці, а у 2013 р. – на висоті 8 м. у місці накладу бокових гілок двох ялин, що зростають поряд. Також з 2010 р. ми реєстрували припутня в гніздовий період на території Байкового кладовища (по 2 пари на рік), а з 2012 р. і в районі парку виставкового центру "Експоцентр". Крім того, гніздування припутня (за усним повідомленням Пашкевич Н.А.) відмічено у 2011 рр. на старій вербі білій (*Salix alba* L.) у дворі багатоповерхової забудови в с. Чабани. У 2012 р. вербу зрізали і птахи тут не гніздилися. У 2013 р. голуби повернулись в мікрорайон, але достовірно гніздування встановлене не було.

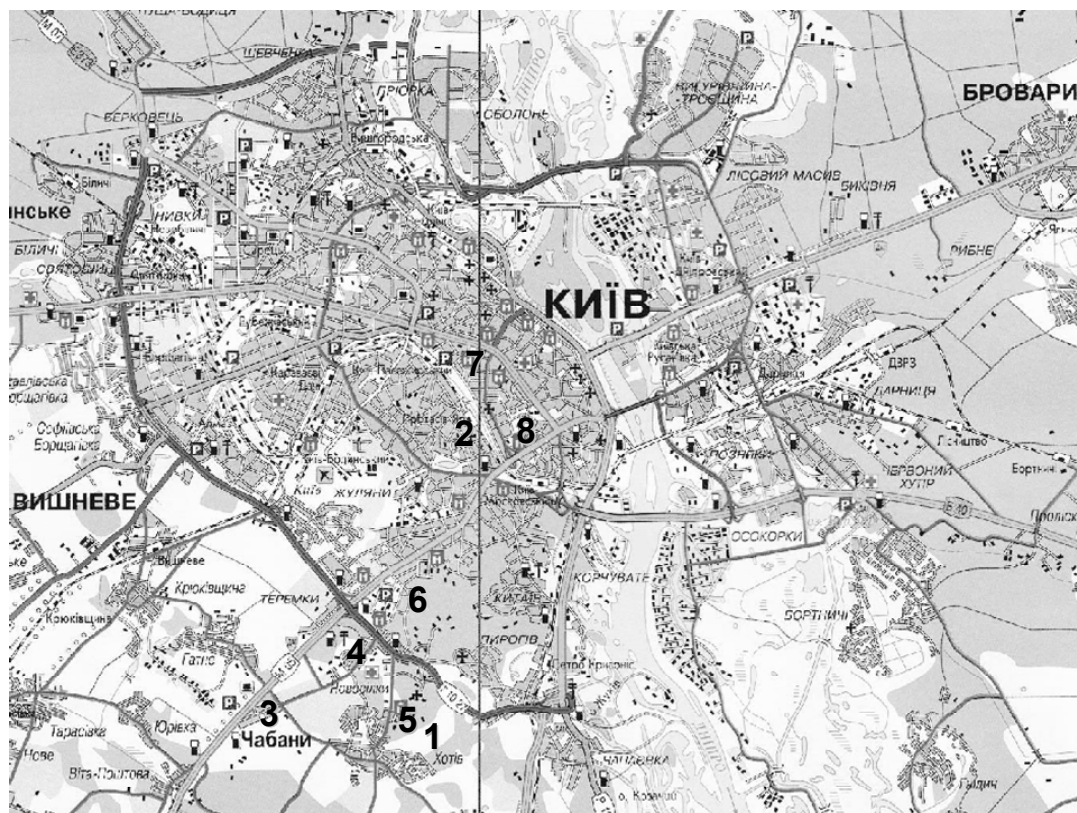


Рис.1. Гніздові ділянки припутня на території м. Києва:

- 1 – Парк-пам'ятка садово-паркового мистецтва "Феофанія" (2010–2013 рр.);
- 2 – Байкове кладовище (2010–2013 рр.);
- 3 – Двори багатоповерхової забудови в с. Чабани (2011 рр.);
- 4 – Житловий масив по вул. Заболотного (2012 р.);
- 5 – Територія Інституту теоретичної фізики (2012–2013 рр.);
- 6 – Парк виставкового центру "Експоцентр" (2012 р.);
- 7 – Двори 5-ти поверхової житлової забудови по вул. Боженко (2013 р.);
- 8 – Двори 5-ти поверхової житлової забудови на проспекті Дружби народів (2013 р.)

На території парку "Експоцентру" 2012 р. припутні тримались весь гніздовий сезон. В серпні птахи стали відвідувати і територію Київського національного університету, яка відокремлена від Виставкового центру автомобільною трасою, що активно експлуатується. Влітку 2012 р. ми неодноразово спостерігали гніздову поведінку припутнів в житловому масиві по вул. Заболотного, а наприкінці гніздового сезону тут тримались дорослі птахи разом з двома молодими. У 2013 р. нами знайдено гніздо припутня у дворі 5-типоверхової забудови по вул. Боженко. Гніздо розташовувалося на боковій гілці клена гостролистого на висоті 8 м. В червні 2013 р. молоді припутні разом з дорослими тримались в кварталах багатоповерхової забудови в центрі м. Києва: на проспекті Дружби народів. Таким чином, від

першої спроби гніздування на урбанізованій території (достовірне гніздування у 2010 р., а можливе у 2009 р.) до заселення кварталів житлової забудови м. Києва припутню знадобилось не більше 4-х років. Але подолання 300–400 км від двох найближче розташованих стійких синантропних популяцій припутня – чернівецької та хмельницької [8; 18], продовжувалося 20–30 років. Оскільки колонізація припутнем Києва відбувається з південної частини міста, можливо, що засновниками міської популяції цих голубів в Києві є птахи саме з чернівецької або хмельницької. Загалом процес заселення припутнем урбанізованих ландшафтів триває біля 200 років [3], але ареал його синантропної популяції невеликий і розширюється повільно. Причини опанування припутнем населених територій, також як і фак-

тори, що стримують цей процес, не з'ясовані. В урбанізованих і сільськогосподарських ценозах голубоподібні птахи мають достатньо кормових ресурсів. У виборі гніздових стацій дендрофільні види також практично не обмежені. Крім того, птахи, що живуть в населених пунктах, захищені від мисливців. Але не всі вони адаптуються до урбанізованих умов існування. В.І. Гулай [8] припускає, що гніздування припутня в містах України, є результатом розселення європейської популяції птахів, особини якої знайомі з "позитивними аспектами" існування в місті і віддають перевагу гніздуванню саме тут. Скоріше за все, процес, який ми спостерігаємо в Києві, певним чином підтверджує це припущення. Проте, на нашу думку – зважаючи на надто низький темп розселення припутня, а також той факт, що більшість європейських популяцій припутня урбанізованого типу поселення ведуть осілий спосіб життя, розселення птахів можливе лише в разі нерегулярних їх розльотів. Ми вважаємо, що у піонерних парах припутня, які гніздяться, на території міста, лише один з партнерів є представником якоїсь із синантропних популяцій, а інший – ні. Партнер, що має досвід синантропного способу існування займає гніздову ділянку в населеному пункті і надає приклад безпечного існування тут. Таким чином він приваблює обережну особину місцевих популяцій. Ця особина поступово адаптується до умов гніздування в місті, а потомство комбінованої пари, що виросло в урбанізованому середовищі, сприймає умови такого середовища як норму. Після декількох вдалих гніздових сезонів чисельність даної міської популяції швидко зростає.

Висновки. Стартовими ділянками для утворення нових популяцій припутня в урбанізованому ландшафті є міські території, які включають як змінені, так і природні біотопи з деревними насадженнями. Після першого вдалого гніздування в урбанізованих умовах існування, птахи швидко та активно опановують територію міста. Розбудова Києва, що призводить до включення до меж міста лісів зеленої зони, сприяє поступовій адаптації птахів до зростаючого антропогенного тиску і заселенню змінених біотопів. Скоріше за все, в Києві, вже найближчим часом, припутень увійде до категорії птахів-синурбаністів.

Список використаних джерел

1. Андрієвська О. Л., Цвеліх О. М. Значення національного природного парку "Голосіївський" у збереженні видового різноманіття хребетних тварин м. Києва // Екологічний вісник. – 2011. – С. 29–30.
2. Астафьева Т. В. Экология вяхира *Columba palumbus* L. в урбанизированных и природных ландшафтах на юго-востоке Балтийского региона: автореф. дис.канд. биол. наук. – Калининград, 2013.
3. Астафьева Т. В., Гришанов Г. В., Ликов Е. Л. История формирования и современное состояние городской популяции вяхира *Columba palumbus* L. в Калининграде // Вестник Балтийского федерального университета им. И.Канта. Вып. 7. Сер. Естественные науки. – 2011. – С. 51–58.
4. Астафьева Т. В., Гришанов Г. В. Вяхирь *Columba palumbus* L. в городах Калининградской области // Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта. Вып. 7. Сер. Естественные науки. – 2012. – С.52–59.
5. Белик В. П. Проникновение северных дендрофильных видов птиц вглубь пустынь Казахстана // Беркут. Т. 6. – Вып. 1–2. 1997. С. 19–22.
6. Бескаравайный М. М. Птицы Крымского полуострова. – Симферополь, 2012.
7. Бобенко О. А. Экология вяхира (*Columba palumbus* L.) в Ставропольском крае // Вестник ОГУ. – 2009. – № 2. – С. 111 – 116.
8. Гулай В. І. Новий екологічний тип припутнів на Поділлі // Матер. 1-ї конф. Молодих орнітологів України. Луцьк 4–6 березня 1994 р. – Чернівці, 1994.
9. Джусупов Т. К. К распространению вяхира в Западной Сибири // Беркут. – 1997. – Т. 6. – Вып. 1–2. – С. 104–105.
10. Завьялов Е. В., Шляхтин В. Г., Табачишин В. Г. и др. Птицы севера Нижнего Поволжья. Кн. 3. Состав орнитофауны – Саратов, 2007.
11. Кесслер К. О. Естественная история губерний Киевского учебного округа. Зоология. – К., 1951.
12. Лыков Е. Л. Биология гнездования Вяхира в условиях города (на примере Калининграда) // Беркут. – 2009. – Т. 18. – Вып. 1–2. – С. 54–68.
13. Мальчевский А. С., Пукинский Ю. Б. Птицы ленинградской области и сопредельных территорий. – Л., 1983. – Т. 1.
14. Маринич О. М., Шищенко П. Г. Фізична географія України: підручник. – К., 2005.
15. Феопанія // Природно-заповідний фонд м. Києва. – Київ, 2007.
16. Радченко В. Г., Байрак О. М. Парк-пам'ятка садово-паркового мистецтва "Феопанія". Історія створення, соціально-екологічна роль, шляхи збереження // Жива Україна. – 2009. – № 1. – С. 2–4.
17. Сеник М. А., Хорняк М. М. Сучасні зміни в орнітофауні Львова // Беркут. – 2003. – Т. 12. – Вип. 1–2. – С. 3–13.
18. Скильський І. В., Бучко, В. В., Годованец Б. І. О формировании нового экологического типа вяхира в Северной Буковине // Беркут. – 1997. – Т. 6. – Вып. 1–2. – С. 49–51.
19. Фесенко Г. В. Птахи садів і парків Києва– Кривий Ріг, 2010.
20. Шарлемань М. Птахи УРСР (матеріали до фауни). – К., 1938.
21. Tomialojc L. The urban population of the Woodpigeon *Columba palumbus* Linnaeus, 1758, in Europe – its origin, increase and distribution // Acta Zool. – 1976. – V. 21 (18). – P. 585–632.

Надійшла до редколегії 14.02.14

Т. Шупова, канд. биол. наук

Институт эволюционной экологии НАН Украины, г. Киев

ОБРАЗОВАНИЕ ГОРОДСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ПРИПУТНЯ (*COLUMBA PALUMBUS* L.) В КИЕВЕ

*Стартовыми участками для образования городских популяций припутня (*Columba palumbus* L.) есть территории, которые включают как измененные, так и природные биотопы с древесными насаждениями. В Киеве таким участком является парк "Феопанія", где Припутни всегда гнездились на лесных участках. С 2008 г. птицы начали селиться и в центральной застроенной части парка. После первого удачного гнездования припутня в урбанизированных условиях существования, птицы быстро овладевают территорией города и заселяют кварталы жилых многоэтажных застроек.*

Ключевые слова: популяции припутня, природные биотопы.

T. Shupova, PhD.

Institute for evolutionary ecology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

EDUCATION CITY POPULATION PRIPUTNYA (*COLUMBA PALUMBUS* L.) IN KIEV

*Urbanized population of wood pigeon (*Columba palumbus* L.) formed in territory which including natural and transformed habitats. Park "Feofaniya" is the starting point for settlement on the territory of Kyiv *Columba palumbus*. Here, birds have always lived in forest parcels. From 2008 birds are nesting in the cultural center of the park. The birds began to settlement in residential districts of the city in 4 years after the first successful nesting in the urbanized landscape.*

Key words: population priputnya, natural habitats.

УДК 576.539.1

О. Сенюк, канд. мед. наук, В. Ковальов, пров. інж., Л. Паламар, мол. наук. співроб.
Інститут проблем безпеки атомних електростанцій Національної академії наук України, Чорнобиль

ВНЕСОК "ЕФЕКТУ СВИДКА" В УШКОДЖЕННЯ КЛІТИННОЇ ДНК У ОПРОМІНЕНИХ МИШЕЙ *BALB/C*

На моделі Balb/c мишей виявлено можливість передачі сигналів через живильне середовище від опромінених in vivo клітин, що збільшують рівні одностранных розривів ДНК в неопромінені клітинах, за умов гострого і хронічного зовнішнього опромінення, а також одночасний нормалізуючий вплив на опромінені клітини інтактних клітин і грибних меланінів.

Ключові слова: опромінення in vivo, моделі Balb/c, "бістандерний" ефект.

Вступ. Під "ефектом" свідка (ЕфСв), який ще називають "бістандерним" ефектом (від англ. "bystandereffect"), розуміють передачу зміненого стану від модифікованої клітини до незміненої. Вперше цей феномен було описано на клітинах китайського хомячка [1] і пізніше виявлено в різних типах клітин після дії факторів різної природи [2-6]. Важлива роль в механізмах передачі сигналів, що уражують клітини-"свідки", належить активним формам кисню (АФК) [7]. Раніше було описано посилену продукцію АФК неопроміненіми клітинами за умов інкубації у середовищі, яке містило опромінену α -частинками сироватку чи супернатант опромінених клітин [8], чи після контакту з опроміненіми клітинами [9]. Спектр уражуючих сигналів є широким: від АФК до цитокінів і фрагментів ДНК. Під їх впливом в неопроміненіх клітинах змінюється профіль експресії генів, окисний метаболізм і посилюється продукція надзвичайно активних форм кисню [10,11]. Найефективнішим є результат взаємодії ДНК з ОН-радикалом і супероксидним аніоном O_2^- . Так, ОН-радикал реагує з основами нуклеїнових кислот, руйнує вуглецеві містки між нуклеотидами з наступним розривом ниток ДНК та РНК, сприяючи виникненню мутацій та загибелі клітин, а також модифікує об'ємну структуру нуклеїнових кислот [12, 13]. Вважається, що АФК реалізують ЕфСв внаслідок дії на клітини іонізуючих випромінювань з низькою лінійною передачею енергії [14]. ЕфСв може здійснюватись також через прямі міжклітинні "щільноподібні" контакти між мембранами сусідніх клітин, крізь які дифундують іони невеликих молекул. В клітинах людини посередником дифузії є білок конексин 43 із залученням білка р53 [9,15]. Очевидно, що в реальних умовах обидва механізми ЕфСв запускаються одночасно і функціонують паралельно. Домінування процесів загибелі значної частини клітин за умов дії високих доз опромінення різко знижує роль ЕфСв в розвитку радіобіологічного ефекту. Вважається, що в області малих доз іонізуючих випромінювань ЕфСв є більш характерним для дії щільно-іонізуючих випромінювань [8,16]. Існують повідомлення про можливість виявлення ЕфСв і в системах in vivo [11]. У нащадків неопромінених клітин кісткового мозку мишей-реципієнтів виявили індукцію хромосомної нестабільності після трансплантації їм клітин, опромінених нейтронами поза організмом [19]. ЕфСв, зумовлений радіоактивним розпадом, описано у мишей з імплантованою сумішшю немічених і мічених смертельною дозою радіоактивного ізотопу [17]. В роботі [18] встановлено, що локальне опромінення мозку збільшує рівні пошкоджень ДНК і р53 експресію, змінює клітинну проліферацію і апоптоз у клітинах селезінки. Опромінення основи щурчої легені асоціювалось із збільшенням частоти мікро ядер в неопроміненому сегменті легені і з ослабленням цього ефекту після попередньої обробки тканин супероксиддисмутазою [12]. Схожі радіаційні ефекти описано також у хворих на хронічні лейкози [12, 19].

Мета роботи – виявлення феномену передачі уражуючих сигналів клітинами опромінених мишей, залеж-

но від виду впливу режиму опромінення (гострого і хронічного), рівня генетично детермінованої радіочутливості опромінюється організму, а також підтвердження участі в ньому молекул вільно-радикальної природи.

Матеріали і методи.

Balb/смишей опромінювали дозами, за яких кожна клітина опромінюваного організму в середньому отримує завідомо більше, ніж одне попадання фотону чи γ -квантів. Згідно розрахунків авторів [20-22] ця вимога для γ - і X-випромінювань виконується вже в діапазоні від 4,0 мГр. За коректну верхню межу дози опромінення обрали дозу, близьку до $LD_{50/30}$, а саме біля 5,0 Гр, за якої ще є незначні (до 10 %) втрати поголів'я, зіставні з природними.

Паралельно були опромінені 4 – 6-місячні самки Balb/с мишей, з масою тіла від 24 до 29 г, які характеризуються високою чутливістю до радіації, $LD_{50/30} = 5,85$ Гр, [23]. Дослідні тварини утримувались в зоотехнічних умовах згідно рекомендацій [24] у віварії Інституту проблем безпеки атомних електростанцій НАН України у м. Чорнобилі. Мишей умертвляли шляхом черв'ячної дислокації з дотриманням рекомендацій щодо виконання медико-біологічних досліджень згідно Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідів чи в інших наукових цілях від 18 березня 1986 р.

Загальне разове 16-годинне опромінення 30 Balb/смишей здійснювали в рівномірному горизонтальному γ -полі з потужністю експозиційної дози (ПЕД) 0,31 Гр/год і накопиченням загальної дози опромінення біля 5,0 Гр (~ 85 % $LD_{50/30}$), яке формувалось дрібними зразками ядерного палива 4-го енергоблоку ЧАЕС, рівномірно розкладеними під клітками з тваринами. Матеріал для дослідження брали у 1-добу, після 1-й і 3-й тижня експозиції.

Хронічне опромінення 34 Balb/смишей впродовж 231 доби з накопиченням дози біля 0,29 Гр було реалізоване на плоских бетонних плитках (БП), заповнених ґрунтом з "Рудого лісу", який містив "гарячі" частинки з ядерного палива 4-го блоку ЧАЕС, викинуті у вигляді аерозолів під час графітової пожежі в травні 1986 р. Усереднена ПЕД, створювана цими БП, була на рівні 52,2 мкГр/год. Біологічний матеріал забирали перед відсадкою на з БПта біля завершення експозиції. У модельованих радіаційних умовах досліди відтворили по 4рази.

Клітинні суспензії з селезінки, печінки та головного мозку дослідних тварин готували в умовах льодяної бані, попередньо механічно їх подрібнивши і тричі промивши фізіологічним розчином. Такі зразки біологічного матеріалу дві години обробляли на магнітному перемішувачі; а з отриманого у такий спосіб клітинного матеріалу центрифугуванням на градієнтах густини гістопаку (1,076-1,078) виділяли клітини для тестування, доводячи їх концентрацію середовищі RPMI 1640 до 150000 кл/мл. При цьому частка живих клітин, оцінена при допомозі барвника трипанового синього, становила не менше 97%. Клітини кісткового мозку використовув-

вали у вигляді цілісного пулу. В вилучених в такий спосіб з різних органів клітинах контрольних (неопромінених) і опромінених мишей визначали рівні однострочних розривів ДНК (ОНР ДНК) за методом розкручування ДНК у лужному середовищі з одночасним міченням її флюоресцентним барвником пікогіном (Leiden, Netherlands) [29]. Метод відтворювали у 96-лункових планшетах. Для виявлення ЕфСв зразки неопромінених клітин переносили у 3-годинне середовище життєдіяльності опромінених *in vivo* клітин, і навпаки, опромінені клітини занурювали у середовище життєдіяльності неопромінених клітин. Цей показник був використаний в якості інтегрального маркера ушкодження структури ДНК. Величину флюоресценції оцінювали впродовж однієї години при 480 нм ексітації і 520 нм емісії за допомогою спеціального рідера (FluoroskanTecan, Austria). Результати надавали у вигляді коефіцієнта розчеплення подвійної спіралі (КРС), який розраховували на 20 хвилин розкручування цієї спіралі (сДНК) за формулою:

$$КРС = \log (\% \text{ cDNA в пробі} / \% \text{ cDNA в контролі}).$$

Результати опрацьовували методами варіаційної статистики, за достовірні приймали відмінності при $P < 0.05$ [30].

Для спростування припущення про можливу вільно радикальну природу певної частки сигнальних молекул, задіяних в реалізації ЕфСв, одній групі мишей перед опроміненням в червну порожнину вводили 0,5 мл ізотонічного розчину з концентрацією меланіну (у складі меланін-глюканового комплексу з трутовика *Fomesfomentarius*, потужного антиоксиданту [6]) 1,5 г/л, для досягнення в крові концентрації речовини 1×10^2 мкг/мл),

Результати і обговорення.

На рис.1. наведено дані про здатність живильного середовища, в якому культивували клітини з різних тканин опромінених мишей Balb/c, викликати додаткове утворення ОНР в ДНК клітин відповідних типів, вилучених з неопромінених мишей цієї ж лінії. Порівняння цих даних дозволяє припустити, що вже впродовж першої доби після опромінення мишей клітини їхніх тканин набувають здатності продукувати у живильне середовище не ідентифіковані фактори, які можуть потенційно ушкоджувати структуру клітинної ДНК, підвищуючи вихідний рівень ОНР в цій макромолекулі. Попри те, що ОНР ДНК в усіх типах аналізованих не опромінених клітин після занурення їх у живильне середовище, в якому культивувались аналогічні клітини з опромінених

мишей, зростали не достовірно, загальна закономірність до збільшення їх рівня чітко фіксувалась. Отже, у різних видах клітин, що не були без посередньо уражені опроміненням, після інкубації у середовищі життєдіяльності опромінених клітин було зареєстровано додаткову індукцію ОНР ДНК, пов'язану найімовірніше із збільшенням у ньому вмісту ДНК-токсичних субстанцій. Наведені дані є підтвердженням того, що вживому організмі між клітинними популяціями існує активний обмін інформаційними сигналами через міжклітинні біологічні середовища. Реакція організму як цілісної системи, передбачає функціонування у його внутрішніх середовищах зустрічних потоків сигналів—від уражених клітин до інтактних і, навпаки, від інтактних клітин до уражених. Тому у використаній моделі доцільно розглянути можливість впливу продуктів життєдіяльності неопромінених клітин на опромінені. Порівняльні дані про флуктуації рівнів ОНР в ДНК клітин, отриманих від опромінених і інтактних мишей Balb/c, у зв'язку із взаємною заміною 3-годинного живильного середовища наведено на рис.2. В нормі в організмі діє потужна система гуморальних радіозахисних чинників, а саме: ендogenous стресорні білки HSP70, HSP72, металотіонеїни, антиоксиданти (глутатіон, супероксиддисмутаза, каталаза і інш.), активація яких призводить до підвищення рівня радіорезистентності. Якщо в першому випадку серед імовірних індукторів підвищення рівнів ОНР ДНК цілком обґрунтовано було б розглядати активні форми кисню, азоту і інші вільно радикальні сполуки, то у другому—зниження ОНР в ДНК опромінених клітин може бути пов'язане зі здатністю неопромінених клітин у певній мірі зменшувати надлишок цих токсичних для ДНК сполук, однак механізми цієї дії нам поки що невідомі. Проте саме можливість контролювати дієвість цих механізмів може бути однією з тих численних передумов, що в цілому сприяють посиленню ендogenousного фону радіорезистентності. Як свідчать дані, наведені на рис.3., "ефект свідка" після опромінення Balb/c мишей можна зареєструвати в різних видах клітин впродовж тривалого часу — першого місяця після експозиції. Отримані результати закономірно примушують поставити питання про можливий його внесок в розвиток радіобіологічних ефектів за умов тривалого опромінення малим дозами.

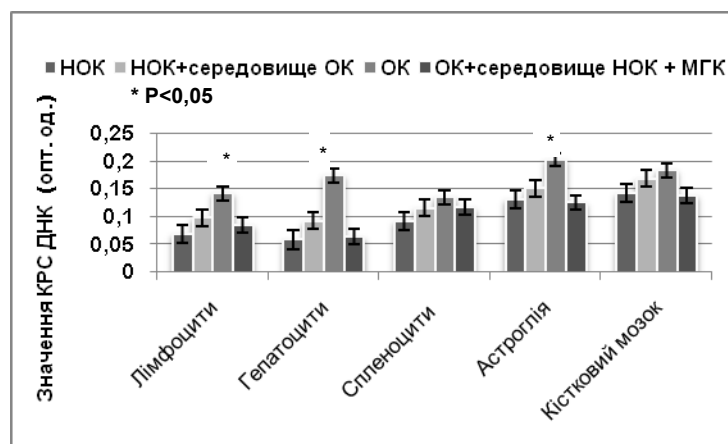


Рис. 1. Вплив заміни живильного середовища 3-годинної інкубації клітин опромінених мишей Balb/c (OK), на неопромінені клітини (HOK); 1-а доба після опромінення дозою ~ 5,0 Гр/16 год, модифікуючий ефект грибного МГК

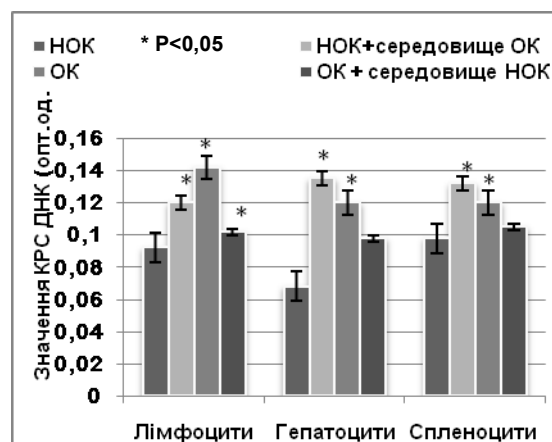


Рис. 2. Вплив взаємної заміни живильних середовищ клітин 3-годинного інкубування після вилучення останніх з інтактних і опромінених мишей Balb/c (28-а доба після опромінення дозою ~ 5,0 Гр/16 год)

Представлені на рис. 4. дані свідчать про порушення структури клітинної ДНК внаслідок передачі сигналів з опромінених на інтактні неопромінені клітини-сусіди за умов довготривалої експозиції мишей в слабких γ -полях. Живильне середовище різних клітин, вилучених з органів мишей, що були опромінені малими дозами радіації в продовж тривалого часу, демонструє здатність індукувати додаткові рівні ОНР в ДНК відповідних

клітин неопромінених мишей тієї ж лінії. При цьому у певних випадках ефект досягає достовірної різниці (гепатоцити – зростання ОНР з $0,114 \pm 0,019$ до $0,162 \pm 0,022$, пул клітин кісткового мозку – зростання з $0,155 \pm 0,019$ до $0,206 \pm 0,031$). Як і за умов опромінення дозою, близькою до $LD_{50/30}$, можна спостерігати здатність неопромінених клітин протидіяти ДНК-уражуючій дії сигналів, що продукуються опроміненими клітинами.

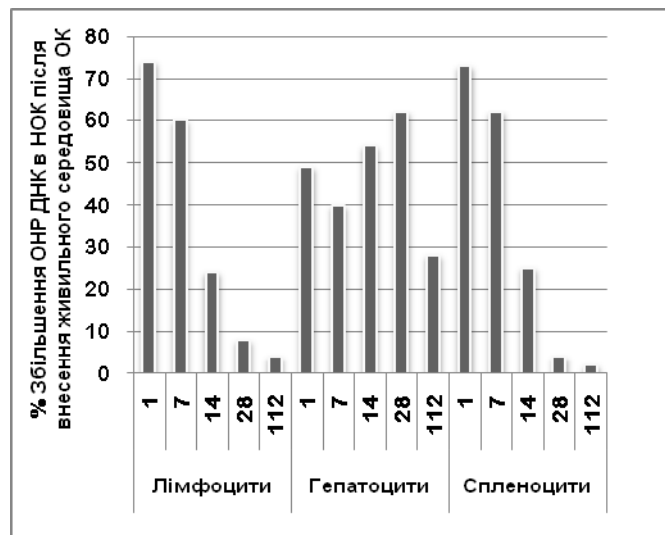


Рис. 3. Динаміка змін у інтенсивності "ефекту свідка" виявленого у мишей Balb/c у різні терміни після опромінення дозою $\sim 5,0$ Гр/16 год.(1, 7, 28 і 112 доби)

Висновки. Отже, феномен дистанційної передачі ДНК-токсичних сигналів з опромінених на неопромінені клітини можна виявити за описаних умов експозиції мишей Balb/c. Існування Ефекту Свідка очевидно може сприяти збільшенню ефективності ДНК-токсичних впливів опромінення. Отже, цей феномен виявляється не лише в експериментальних умовах *in vitro*, він функціонує також *in vivo* і може бути важливою передумовою для розвитку віддалених медико-біологічних ефектів опромінення як пухлинної, так і не пухлинної природи.

Список використаних джерел

- Nagasawa H, Little J.B. Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of α -particles // *Cancer Res.* – 1992. – V.52. – P.6394–6396.
- Mothersill C., Seymour C. Radiation-induced bystander effects: past history and future direction // *Radiat. Res.* – 2001. – V. 155. – P. 759–767.
- Ермаков А.В., Костюк С.В., Еголина Н. А и др. Фрагменты ДНК, обнаруживаемые в среде культивирования после воздействия ионизирующей радиации в адаптирующей дозах, являются фактором стресс-сигнализации между лимфоцитами и клетками-свидетелями // *Радиационная биология. Радиоэкология.* – 2007. – Т.47. №2. – С.133-140.
- Azzam, E.I., de Toledo, S.M., Little, J.B. Stress signaling from irradiated to non-irradiated cells // *Current Cancer Drug Targets.* – 2004. – V.4 N.1. – P. 53-64.
- Chakraborty A., HeldK., M. Prise K. et.al. Bystander effects induced by diffusing mediators after photodynamic stress // *Radiation Research.* – 2009. – V.172. N.1. – P. 74-81.
- Senyuk.O.F., Gorovoj L.F., Kurchenko V.P. et al. Genome protection properties of melanin-containing complexes from higher basidiomycetes / in: *Current Problems of Radiation Research* Ed. D. Grodzinsky, A. Dmitriev. – Kyiv. – 2007. – P. 224-239.
- Кудряшов Ю.Б. Радиационная биофизика (ионизирующие излучения). Подред. МазурикаВ.К., ЛомановаМ.Ф. – 2004. – 448 с.
- Narayanan P.K., Googwin E.YH, Lehnert B.E. Alpha particles initiate biological production of superoxide anions and hydrogen peroxide in human cells // *Cancer Res.* – 1997. – V 57, N 18. – P.3963–3971.
- Grososky A.J. Radiation-induced mutations in unirradiated DNA // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1999. – V.96. N.10. – P.46-53.
- Ермаков А.В., Конькова М.С., Костюк С.В. и др. Фрагменты внеклеточной ДНК из среды инкубирования лимфоцитов человека, облученных в малых дозах, запускают развитие окислительного стресса и адаптивного ответа в необлученных лимфоцитах-свидетелях // *Радиационная биология. Радиоэкология.* – 2009. – Т. 48, № 5. – С. 553–564.

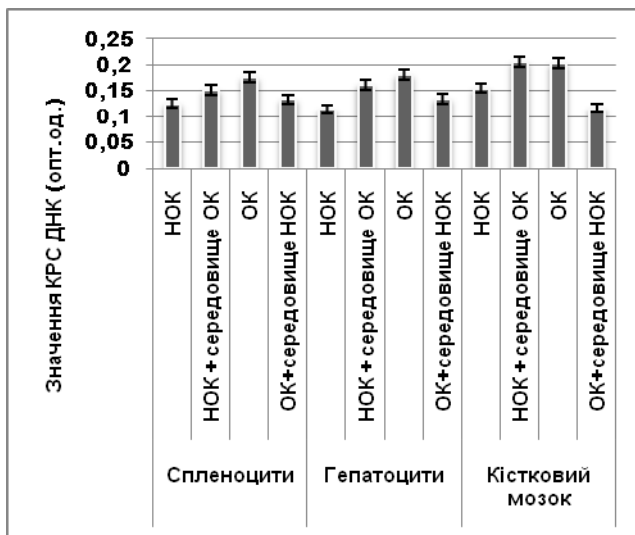


Рис. 4. Вплив живильного середовища від *in vivo* опромінених на неопромінені клітини і навпаки у мишей Balb/c, доза опромінення 0,29 Гр за 231 добу

- Lorimore S.A., Coates P.J., Scobie G.E. et al. Inflammatory-type responses after exposure to ionizing radiation *in vivo*: a mechanism for radiation induced by bystander effects? // *Oncogene.* – 2001. – N.20. – P.708595.
- Khan M.A., HIR.P., VanDyk. Partial volume rat lung irradiation: an evaluation of early DNA damage // *Int J Radiat Oncol.Biol.Phys.* – 1998. – V.40. – P. 467–76.
- Nobler MP.Theabscoptal effect in malignant lymphoma and its relationship to lymphocyte circulation//*Radiobiology.* – 1969. – V.93. – P. 410–12.
- Mothersill C., Seymour C.Cell-cell contact during gamma irradiation is not required to induce a bystander effect in normal human keratinocytes: evidence for release during irradiation of a signal controlling survival in to the medium//*Radiat. Res.* – 1998. – V.149. – P. 256-262.
- Azzam, E. I., de Toledo, S. M., Little, J. B. Expression of CON-NEXIN43 Is Highly Sensitive to Ionizing Radiation and Other Environmental Stresses // *Cancer Res.* – 2003. – V.63. – P. 7128.
- Little J.B., Nagasawa H., Pfenning T.et al. Radiation-induced genomic instability: delayed mutagenic and cytogenetic effects of X-rays and α -particles // *Radiat. Res.* – 1997. – V.148. N.3. – P. 299-307.
- Morgan W.E. Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: II. Radiation-induced genomic instability and bystander effects *in vivo*, clastogenic factors and transgenerational effects// *Radiat. Res.* – 2003. – V.15,N.5. – P.581–596.
- Xue L.Y., Butler N.J., Makrigiorgos G.M., Adelstein S.J., Kassis A. 1.Bystander effect produced by radiolabeled tumor cells *in vivo*// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 2002. – N.99. – P.13765–13770.
- Koturbashi I., Loree J., Kutanzi K. et al. In Vivo Bystander Effect: Cranial X-Irradiation Leads to Elevated DNA Damage, Altered Cell // *Int. J.Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2008. – N 70. – P: 554–562.
- Parsons W.B., Watkins C.H., Pease G.L., et al. Changes in sternal bone marrow following roentgen-ray therapy to the spleen in chronic granulocytic leukemia// *Cancer.* – 1954. – V.7. – P. 179-89.
- Спитковський Д.М., Кузьміна І.В. Теоретическіе і експериментальне підходи к проблеме индуцируемых адаптирующими дозами ионизирующей радиации изменений функциональных возможностей клеток // *Радиационная биология. Радиоэкология.* – 2001. – Т.41, №5. – С.599–605.
- Цыб А.Ф., Будагов Р.С., Замулаева И.А. и др./ *Радиация и патология.* – М.: Высшая школа. – 2005. – 340 с.
- Storer J.B. Acute responses to ionizing radiation//in: *Biology of the laboratory mouse*, Ed. E.L.Green., N.Y. – 1966. – P.427–446.
- www.jaxmice.jax.org, www.jax.org/jaxmice, June 2005 – May 2007. Catalog of the Jackson Laboratory.
- Котеров А. Н. Малые дозы ионизирующей радиации подходы к определению диапазона и основные радиобиологические эффекты // В кн.: "Радиационная медицина. Руководство для врачей-исследователей, организаторов здравоохранения и специалистов по радиационной биологии". – М.: Медицина. – 2000. – С. 10–15.

онной безопасности." Под общ. ред. Л.А. Ильина. Т.1. Теоретические основы радиационной медицины. – М.: Изд. АТ. – 2004. – С. 871–925.

25. Gilden D. H., Delvin M., Wroblewska Z., Friedman H. et al. Human brain in tissue culture. I Acquisition, initial processing and establishment of brain cell culture // J.Comp. Neurol. – 1975. – N 161. – P. 295–306.

26. Mendorf-Dreikorn K. El., ChauvinCh., Slor H. et al. Assessment of DNA damage and repair in human peripheral blood mononuclear cells using a novel DNA unwinding technique// Cellular and Molecular Biology. – 1999.V.45, N.2. – P. 211–218.

27. Sach. L. /Angewandte Statistik. – Springer-Verlag, Berlin. – 1997. – 687 p.
Надійшла до редколегії 03.03.14

О. Сенюк, канд. мед. наук, В. Ковальов, пров. инж., Л. Паламар, мл. науч. сотр.

Институт проблем безопасности атомных электростанций Национальной академии наук Украины, Чернобыль

ВКЛАД "ЭФФЕКТ СВИДЕТЕЛЯ" В РАСПРОСТРАНЕНИЕ РАДИАЦИОННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ОРГАНИЗМА

На модели Balb/c мишей обнаружена возможность передачи сигналов через питательную среду от облученных in vivo клеток, которые увеличивают уровни одностранных разрывов ДНК в необлученных клетках, при внешнем хроническом облучении, а также одновременно нормализующее воздействие на облученные клетки интактных клеток и грибных меланинов.

Ключевые слова: облучение in vivo, модели Balb/c, "бистандерный" эффект.

O. Seniuk, PhD, V.Kovalev, F.ing, L. Palamar, research woker

Institute for safety problems of nuclear power plants National academy of sciences of Ukraine, Chernobyl

THE CONTRIBUTION OF THE "BYSTANDER EFFECT" IN THE SPREAD OF RADIATION DAMAGE OF THE ORGANISM

Possibility of transmission through the culture medium signals from irradiated cells, which increase the level of single-strand DNA breaks in irradiated cells by exposure (acute and chronic) and internal chronic irradiation, and simultaneous normalizing effect on irradiated cells intact cells and fungal melanins in the model of Balb/c mice is found.

Key words: irradiated cells, model of Balb/c, "bystandereffect".

УДК: 612.398.192:577.15

Н. Салига, канд. біол. наук, Р. Іскра, канд. с.-г. наук
Інститут біології тварин НААН України, Львів

АКТИВНІСТЬ ГЛУТАТІОНЗАЛЕЖНИХ ЕНЗИМІВ У ЩУРІВ ЗА ВПЛИВУ ОКРЕМИХ АМІНОКИСЛОТ ТА ДІЇ СТРЕСУ

Досліджено вплив L-глутамінової кислоти (L-Glu), цистеїну (L-Cys) та L-Glu у комплексі з L-Cys на активність окремих антиоксидантних ензимів у крові щурів за дії стресу. Встановлено, що застосування L-Glu, L-Cys та L-Glu у комплексі з L-Cys після дії стресу приводило до змін активності глутатіонзалежних ензимів та вмісту відновленого глутатіону у крові тварин дослідних груп. Показано, що у тварин, які зазнавали дії стресу без застосування вищезгаданих амінокислот знижувалась глутатіонпероксидазна і глутатіонредуктазна активності ензимів та вміст відновленого глутатіону в еритроцитах крові щурів, вірогідно зростає вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів порівняно до тварин контрольної групи. Додаткове введення L-Glu, L-Cys та L-Glu у комплексі з L-Cys після дії стресу дозволяє організму не лише вийти на рівень контрольних значень, але й за окремими показниками перевищити його.

Ключові слова: глутатіонзалежні ензими, перекисне окиснення ліпідів, кров.

Вступ. Як відомо, однією з перших на дію стресу реагує антиоксидантна система. Стрес викликає інтенсифікацію процесів ПОЛ в організмі тварин. Як наслідок, у клітинах утворюються вільнорадикальні продукти обміну, котрі взаємодіючи з макромолекулами клітини, змінюють її властивості. Це приводить до зміни властивостей біологічних мембран та зниження активності системи антиоксидантного захисту [16].

Ключову роль у захисті клітин від ушкоджуючої дії вільнорадикальних продуктів обміну має глутатіон (GSH). Зокрема, його відновлена форма відіграє роль "пастки для вільних радикалів", що виникають у процесі оксидативного стресу [10, 18]. Таким чином, попереджаючи структурні зміни у мітохондріальних мембранах, що виникають внаслідок підвищення активності процесів перекисного окиснення. Узагальнюючи, можна сказати, що відновлена форма глутатіону приймає активну участь у збереженні цілісності клітини і забезпечує нормальне її функціонування [6, 8, 19].

Існують гіпотези, що введення в організм, який піддається будь-якому надпороговому впливу, зокрема, стресам різної етіології, ряду амінокислот-адаптогенів може сприяти поверненню організму до фізіологічного рівня [4]. До амінокислот, які мають властивості адаптогенів відносять глутамінову кислоту та цистеїн, як окремо, так і в комплексі [9, 11, 14]. Не менш важливим є введення цих амінокислот, зважаючи на те, що вони є попередниками GSH. Так можна досягти підвищення

резерву GSH у клітинах, що дасть можливість більш активно справлятися з додатковими навантаженнями на організм за дії різних шкідливих чинників, зокрема стресу.

У зв'язку з цим перспективним представляється вивчення біопротекторної дії L-Glu, L-Cys та комплексної дії цих двох амінокислот за дії стресу.

Метою роботи було визначити глутатіонпероксидазну, глутіонредуктазну активності, вміст відновленого глутатіону в еритроцитах крові та вміст гідропероксидів ліпідів і ТБК-активних продуктів у плазмі крові щурів за умов введення L-Glu, L-Cys та L-Glu у комплексі з L-Cys після дії стресу.

Матеріали і методи. Дослід проводили на білих щурах-самцях лінії Вістар масою 200-220 г, які були розділені на групи (чотири дослідні та одна контрольна). Тваринам першої дослідної групи вводили внутрішньочеревинно адреналін у дозі 10 мкг /100 г маси тіла, тваринам другої, третьої та четвертої дослідних груп вводили адреналін у дозі 10 мкг /100г маси тіла після чого щурам другої групи – розчин L-Glu у дозі 750 мг/кг, щурам третьої групи – розчин L-Cys у дозі 300 мг/кг та L-Glu у дозі 750 мг/кг, щурам четвертої групи – розчин L-Cys у дозі 300 мг/кг. Щурам контрольної групи вводили відповідну кількість фіз. розчину. Тваринам згодовували стандартний комбікорм для лабораторних щурів. Через 24 години тварин всіх груп за анестезії ефіром декапітували. Під час проведення досліджень на тваринах дотримувалися принципів біоетики,

законодавчих норм та вимог згідно з положенням "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей" (Страсбург, 1986) і "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах", ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Матеріалом для досліджень служили еритроцити крові щурів у яких визначали: глутатіонпероксидазну (ГП) активність (КФ 1.11.1.9) за швидкістю окислення GSH до і після інкубації з гідропероксидом третинного бутану [5]; глутатіонредуктазну активність (ГР) (КФ 1.6.4.2) визначали в реакційному середовищі, яке містило 2,5 мл фосфатного буфера (0,15 М фосфатний буфер, pH 7,4), 0,2 мл окисненого глутатіону (7,5 мМ), 0,1 мл гомогенату тканин, 0,1 мл NADPH (1,2 мМ) [1]; вміст відновленого глутатіону (GSH) визначали за рів-

нем утворення тіонітрофенільного аніону в результаті взаємодії SH-груп глутатіону з 5,5-дитіобіс,2-нітробензойною кислотою [1]. У плазмі крові визначали концентрацію гідропероксидів ліпідів [1], вміст ТБК-активних продуктів [3].

Одержані цифрові дані обробляли статистично. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами використовували критерій Стьюдента.

Результати та їх обговорення. Кожна клітина володіє системою захисту від активних форм кисню і продуктів пероксидного окиснення. Значна частина цієї захисної системи локалізована в мітохондріях і мікросомах. Система глутатіону є найбільш ефективною в організмі людини і тварин. До цієї системи входять три глутатіонзалежні ферменти, зокрема, ГП та ГР.

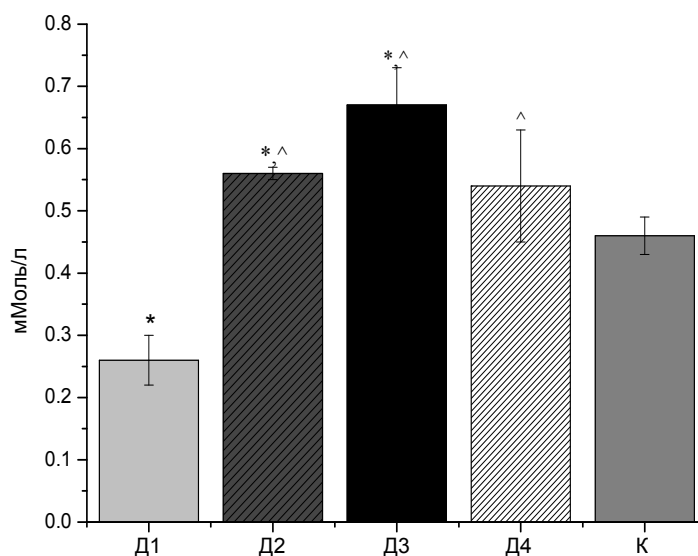


Рис. 1. Вміст GSH в еритроцитах крові щурів за дії амінокислот

В цьому і наступних рис.: * - вірогідно ($p < 0,05$) відносно контролю; ^ - вірогідно ($p < 0,05$) відносно першої дослідної групи.

Глутатіон присутній у всіх клітинах тварин та людини. Він приймає участь в багатьох метаболічних реакціях та забезпечує нормальне протікання багатьох фізіологічних та біохімічних процесів [17]. GSH можна вважати головним антиоксидантом еритроцитів, оскільки він служить кофактором при відновленні метгемоглобіну в функціонально активний гемоглобін. За допомогою відновленого глутатіону здійснюється детоксикація H_2O_2 і гідропероксидів. Вміст GSH залежить від швидкості синтезу, катаболізму, а також стану систем, які регулюють співвідношення його окиснених та відновлених форм. Завдяки наявності глутамільного зв'язку та реактивної сульфгідрильної групи глутатіон бере участь у численних реакціях метаболізму, забезпечуючи тим самим нормальний перебіг ряду фізіологічних і біохімічних процесів.

Як показали результати досліджень (Рис.1), вміст GSH у тварин другої, третьої та четвертої дослідних груп не лише виходив на рівень контрольних значень, але навіть перевищував ці значення. Це можна пояснити застосуванням амінокислот, які є вихідними при біосинтезі глутатіону, зокрема L-Glu та L-Cys. Важливою ланкою антиокислювальної системи є біомолекули, які містять сульфгідрильні групи. До таких біомолекул належить цистеїн. Він входить до складу активних центрів ферментів і знаходиться майже у всіх клітинах. Що стосується тварин першої дослідної групи, то вміст GSH був вірогідно нижчим порівняно до контрольної групи тварин.

Слід відзначити вірогідно вищий вміст GSH у тварин другої, третьої та четвертої дослідних груп порівняно до тварин першої дослідної групи, яка зазнавала дії стресу без застосування амінокислот. Це пояснюється підвищенням резерву глутатіонової кон'югації у тварин дослідних груп, які отримували додатково L-Glu та L-Cys. Зокрема, додавання L-Cys очевидно впливало на підвищення резерву сульфатної кон'югації. Додавання L-Glu, яка відіграє ключову роль у циклі трикарбонових кислот, ймовірно, сприяло посиленню утворенню АТФ, яка необхідна для енергозабезпечення всіх процесів кон'югації [13, 15]. Найбільший ефект спостерігали при комплексному застосуванні L-Glu та L-Cys.

Другим важливим захисним ферментом в еритроцитах є ГП. Вона відіграє основну роль в інактивації ліпідних гідропероксидних сполук. Активність ГП (рис.2) у наших дослідженнях була вірогідно нижчою у тварин першої дослідної групи, які зазнавали дії стресу без застосування амінокислот порівняно до контролю. Це корелює з вмістом GSH у тварин цієї ж групи. Оскільки активація ГП можлива лише за умови підтримання достатньо високого рівня внутрішньоклітинного GSH [7], не виключено, що зниження глутатіонпероксидазної активності в еритроцитах крові за дії стресу зумовлене вичерпанням доступного пулу GSH та накопиченням продуктів ліпопероксидації.

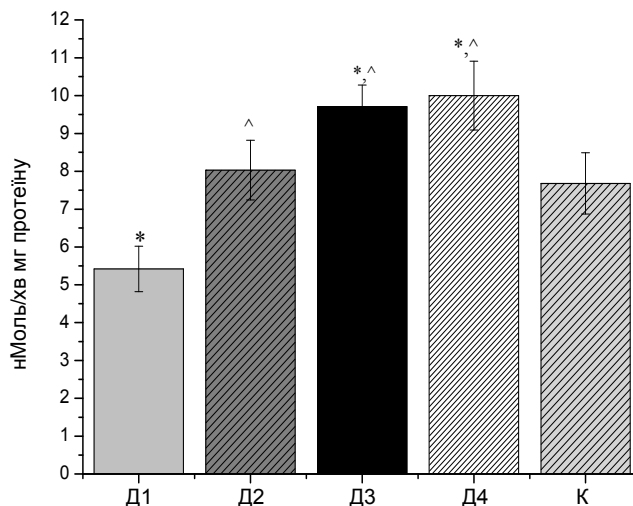


Рис. 2. Активність ГП в еритроцитах крові щурів за дії амінокислот

Що стосується тварин дослідних груп, то активність цього ензиму вірогідно зростала у тварин третьої та четвертої дослідних груп, які отримували L-Glu у комплексі з L-Cys та L-Cys відповідно. І це зростання активності ГП можна пояснити додатковим застосуванням цистеїну. Оскільки у пептидному ланцюзі ГП є залишок

селеноцистеїну – аналога цистеїну, в якому атом сірки замінений атомом селену. Підвищенню активності ГП свідчить про активну елімінацію H_2O_2 , який легко проникає через плазматичну мембрану всередину клітини. Слід зазначити, що у всіх дослідних груп значення цього показника виходили на рівень контрольних значень.

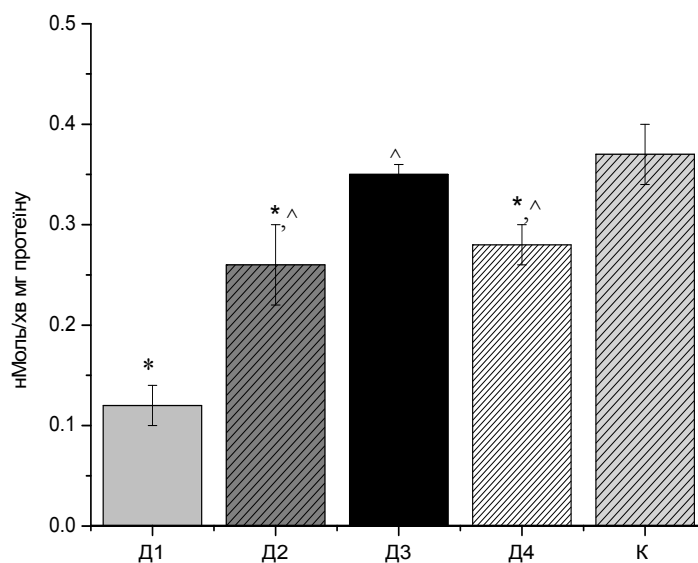


Рис. 3. Активність ГР в еритроцитах крові щурів за дії амінокислот

ГР – ензим, що відповідає за поповнення внутрішньоклітинного пулу GSH. Дані, представлені на рис. 3, показали, що глутатіонредуктазна активність є зниженою у тварин, які зазнавали дії стресу без застосування амінокислот. Можна припустити, що ГР не встигає відновлювати потрібну для клітини кількість глутатіону, оскільки відбувається інтенсивна утилізація GSH у реакції, яку каталізує ГП. Ще одним моментом, з яким можна пов'язати зниження рівня глутатіонредуктазної активності є накопичення окисненої форми NADP. Оскільки нормальне функціонування у клітині NADPH-залежної глутатіонредуктази є дуже важливим для запобігання

окисного ушкодження мітохондрій. Що стосується тварин дослідних груп, глутатіонредуктазна активність є вірогідно нижчою у тварин другої та четвертої дослідних груп, які додатково отримували глутамінову кислоту та цистеїн порівняно до контрольної групи тварин. У тварин третьої дослідної групи глутатіонредуктазна активність практично виходила на рівень контрольних значень. Зниження глутатіонредуктазної активності на фоні підвищеного рівня глутатіонпероксидазної активності та вмісту GSH ймовірно відбувається окрім відновлення за допомогою глутатіонредуктази ще й за рахунок синтезу GSH "de novo".

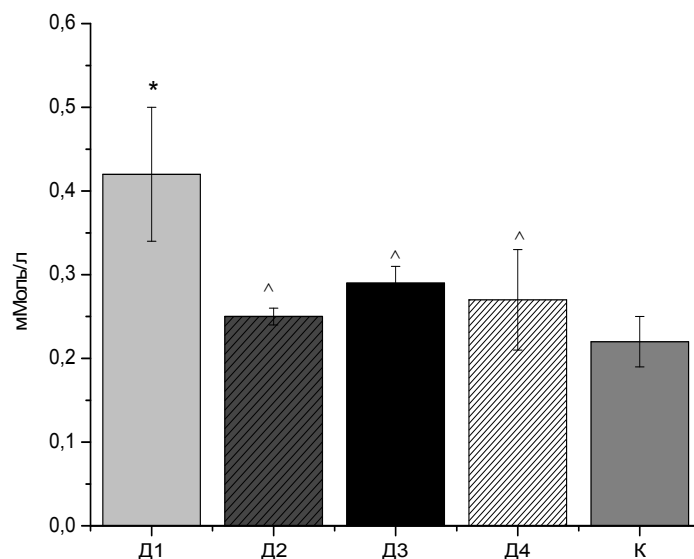


Рис. 4. Вміст гідропероксидів ліпідів у плазмі крові щурів за дії амінокислот

Стрес викликає інтенсифікацію процесів ПОЛ в організмі тварин та зниження активності системи антиоксидантного захисту. Інтенсифікація вільнорадикальних процесів є універсальним механізмом пошкодження клітин.

Однією з найбільш важливих регуляторних функцій глутатіону є обмеження надмірної активації вільнорадикальних процесів, перш за все ПОЛ, і підтримання здатності системи антиоксидантного захисту протидіяти окиснювальному стресу, який розвивається в організмі при дії стресів різної етіології [16]. Тому, вірогідно вищий вміст гідропероксидів ліпідів у тварин першої дослідної групи порівняно до контролю можна пов'язати з вірогідно нижчим вмістом GSH у тварин цієї ж групи (Рис.4). Що стосується тварин усіх дослідних груп, то вміст гідропероксидів ліпідів виходив на рівень контрольних значень і був вірогідно нижчим стосовно тварин першої дослідної групи. Подібну картину спостерігали і щодо вмісту ТБК-активних продуктів у плазмі крові щурів (Рис.5). Підвищення вмісту ТБК-активних продуктів у тварин першої дослідної групи, у якій спостерігали надмірну активацію

перексидного окиснення, що відбувалась за дії надлишку катехоламінів та сприяла пошкодженню клітинних мембран. Можна припустити також, що швидкість цієї реакції залежить від концентрації глутатіону у клітині, при зниженні якої збільшується вміст перексиду водню і зростає концентрація цитотоксичних вільних радикалів.

Слід вказати на нижчий вміст ТБК-активних продуктів у тварин другої дослідної групи, яка отримувала L-Glu. Тварини третьої та четвертої дослідних груп практично виходили на рівень контрольних значень шляхом інгібування ПОЛ. Таке інгібування надлишкового вільнорадикального окиснення відіграє особливо важливу роль у функціонуванні мітохондрій, мембрана яких несе на своїй поверхні комплекси ензимів, які беруть участь у транспорті електронів, циклі трикарбонових кислот та процесах фосфорилування. Результати досліджень показали, що дані амінокислоти здатні запобігати процесам ПОЛ в організмі тварин за дії стресу.

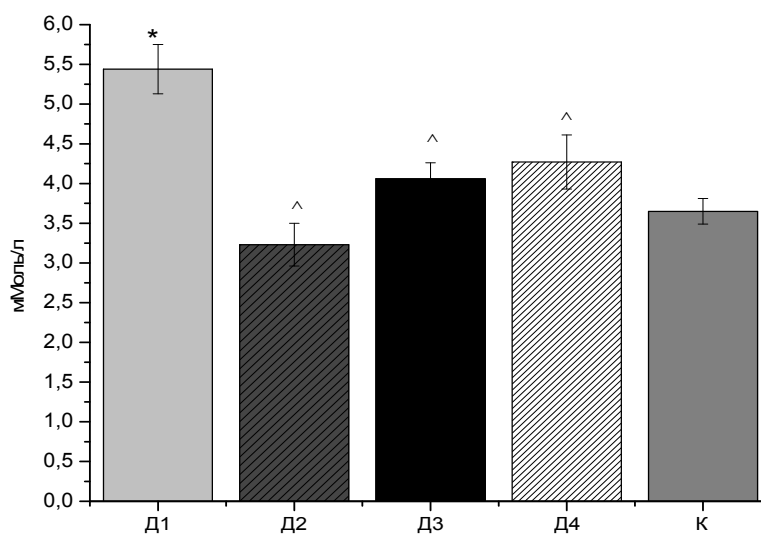


Рис. 5. Вміст ТБК-активних продуктів у плазмі крові щурів за дії амінокислот

L-Glu, L-Cys та L-Glu у комплексі з L-Cys проявляли виражену мембранопротекторну та антиоксидантну дію, знижували активацію індукованого ПОЛ і пригнічували накопичення гідропероксидів ліпідів та ТБК-активних продуктів.

Висновки. Таким чином, на основі проведених досліджень можна зробити висновок, що резервна потужність глутатионової системи є недостатньою, щоб у більш віддалений термін після дії стресу попередити зниження вмісту GSH у клітинах. Додаткове введення глутамінової кислоти, цистеїну та комплексу цих двох амінокислот після дії стресу дозволяє організму не лише вийти на рівень контрольних значень, але й за окремими показниками перевищити його.

Список використаних джерел

1. Влізко В.В., Федорук Р.С., Ратич І.Б. та ін. // Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині – Львів: СПОЛОМ. 2012. – 761с.
2. Коржов В. И., Жадан В. Н., Коржов М. В. Роль системы глутатиона в процессах детоксикации и антиоксидантной защиты // Журнал академии медицинских наук Украины. – 2007. – Том 13, № 1. – С.3–20.
3. Коробейникова Э. Н. Модификация определения ПОЛ в реакции с ТБК // Лаб. дело. – 1989. – № 7. – С. 8–10.
4. Минигалиева И.А. Экспериментальное обоснование подходов к биологической профилактике вредных эффектов органических загрязнителей среды обитания и их комбинаций с токсичными металлами // Автореф. на соискание ученой степени кандидата биологических наук. – 2009. – С. 18.
5. Моин В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб.дело. – 1986. – № 12. – С. 724–727.
6. Коржов В. И., Жадан В. Н., Коржов М. В. Роль системы глутатиона в процессах детоксикации и антиоксидантной защиты // Журнал академии медицинских наук Украины. – 2007. – Том 13, № 1. – С.3–20.

Н. Салыга, канд. биол. наук, Р. Искра, канд. с.-х. наук
Институт биологии животных НААН Украины, Львов

АКТИВНОСТЬ ГЛУТАТИОНЗАВИСИМЫХ ЭНЗИМОВ У КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ОТДЕЛЬНЫХ АМИНОКИСЛОТ ПРИ ДЕЙСТВИИ СТРЕССА

Исследовано влияние L – глутаминовой кислоты (L – Glu), цистеина (L – Cys) и L – Glu в комплексе с L – Cys на активность отдельных антиоксидантных ферментов в крови крыс в условиях стресса. Установлено, что применение L-Glu, L-Cys и L-Glu в комплексе с L-Cys после воздействия стресса приводило к изменениям активности глутатионзависимых ферментов и содержания восстановленного глутатиона в крови животных опытных групп. Показано, что у животных, подвергавшихся воздействию стресса без применения вышеупомянутых аминокислот снижалась глутатионпероксидазная и глутатионредуктазная активность ферментов и содержание восстановленного глутатиона в эритроцитах крови крыс, вероятно возрастало содержание продуктов перекисного окисления липидов по сравнению с животными контрольной группы. Дополнительное введение L-Glu, L-Cys и L-Glu в комплексе с L-Cys после воздействия стресса позволяет организму не только выйти на уровень контрольных значений, но и по отдельным показателям превысить его.

Ключевые слова: глутатионзависимые ферменты, перекисное окисление липидов, кровь.

N.Saluga, PhD., R.Iskra, PhD.
Institute of Animal Biology NAAS

ACTIVITY IN RAT GLUTATHIONE DEPENDENT ENZYMES IN TO AMINO ACIDS IMPACT ACTION STRESS

The effect of L- glutamic acid (L-Glu), cysteine (L-Cys) and L-Glu in combination with L-Cys on the activity of some antioxidant enzymes in blood under the action of stress was investigated. It was established that the use of L-Glu, L-Cys and L-Glu in combination with L-Cys after exposure to stress led to changes in the activity of glutathione dependent enzymes and glutathione content in the blood of animals of experimental groups. It is shown that in animals that were subjected to the action of stress without the above-mentioned amino acids decreased activity of glutathione peroxidase and glutathione reductase and the content of reduced glutathione in red blood cells of rats and significantly increased content of lipid peroxidation products compared to animals in the control group. Additional use of L-Glu, L-Cys and L-Glu in combination with L-Cys after exposure to stress allows the body to not only reach the level of control values, but for some indicators exceed it.

Key words: glutathione depended enzymes, lipid peroxidation, blood.

7. Кулинский В. И., Колесниченко Л. С. Обмен глутатиона // Успехи биол. химии. – 1990. – 31. – С. 157–179.
8. Мазо В. К. Глутатион как компонент антиоксидантной системы желудочно-кишечного тракта // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол. и колопроктол. 1998. – № 1. – С. 47–52.
9. Hansen A.M., Caspi R.R. Glutamate joins the ranks of immunomodulators // Nat.Med. – 2010. – Vol. 16. №8. – P. 856–858.
10. Kirstein C.L.,Coopersmith R., Bridges R.J., Leon M. Glutathione levels in olfactory and non-olfactory neural structures of rats // Mol. Aspects Med. 2009. – Vol. 30. – №1–2. – P.99–110.
11. Li P., Yin Y.L., Li D., et al. Amino acids and immune function. // Br. J. Nutr. – 2007. – Vol.98(2). – P. 237–252.
12. Newsholme P., Procopio J., Lima M.M., et al. Glutamine and glutamate: their central role in cell metabolism and function // Cell Biochem. Funct. 2003. – Vol. 21. – P.1–9.
13. Newsholme P., Lima M., Procopio J., et al. Glutamine and glutamate as vital metabolites // Braz. J.Med.Biol.Res. – 2003. – Vol. 36. – P.153–163.
14. Platt S.R. The role of glutamate in central nervous system health and disease // Vet. J. 2007. – Vol.173(2). – P.278–286.
15. Roth E. Nonnutritive effects of glutamine // J.Nutr. 2008. – Vol.138. – P. 2025–2031.
16. Stadtman E. R. Levine R. L. Free radical-mediated oxidation of free aminoacids and aminoacid residues in proteins // Amino Acids. 2003. – Vol. 25. – P. 207–218.
17. Townsend D.M., Tew K.D., Tapiero H. The importance of glutathione in human disease // Biomed Pharmacother. – 2003. – Vol. 57. – №3–4. – P.145–155.
18. Wu G. Functional amino acids in growth, reproduction, and health // Adv.Nutr. – 2010. – Vol.1(1). – P. 31–37.
19. Yuan L., Kaplowitz N. Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity // Molecular Aspects of Medicine. – 2009. – Vol. 30, № 1–2. – P. 29–41.

Надійшла до редколегії 27.01.14

УДК 581.1:632.4

О. Панюта, канд. біол. наук, В. Белава, канд. біол. наук, С. Фомаїді, маг. 2 курсу,
О. Калініченко, спец. 2 кат., Н. Таран, проф
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ВПЛИВ ПЕРЕДПОСІВНОЇ ОБРОБКИ НАСІННЯ НАНОЧАСТКАМИ МЕТАЛІВ НА ЗАХИСТІ РЕАКЦІЇ ПРОРОСТКІВ ПШЕНИЦІ, ІНФІКОВАНИХ ЗБУДНИКОМ ЦЕРКОСПОРЕЛЬОЗУ

Досліджували зміну інтенсивності пероксидного окиснення ліпідів та лектинової активності у проростках пшениці, отриманих із насіння обробленого колоїдним розчином суміші наночастинок металів (Zn, Ag, Fe, Mn, Cu) і колоїдним розчином наночастинок міді, за інфікування суспензією конідій збудника церкоспорельозу. Досліджувані неіонні колоїдні розчини наночастинок біогенних металів діяли як антиоксиданти, пригнічуючи утворення продуктів пероксидного окиснення ліпідів. Було показано, що зростання активності лектинів за інфікування у разі передпосівної обробки насіння сумішшю наночастинок металів настає раніше.

Ключові слова: нанометали, пероксидне окиснення ліпідів, лектини, пшениця, церкоспорельоз.

Вступ. Останнім часом в якості біостимуляторів та мікродобрив використовують нанопрепарати, які мають ряд переваг порівняно з традиційними розчинами: не розшаровуються під впливом тепла і світла, забезпечують повне змочування поверхні рослин, повністю поглинаються рослинами, не змиваються дощем, приготований робочий розчин може зберігатися роками, залишаючись при цьому активним.

Наночастки впливають на біологічні об'єкти на клітинному рівні, підвищуючи ефективність протікання біохімічних процесів у рослинах, а також, беручи участь у формуванні мікроелементного балансу, тобто є біоактивними. Отримані варіанти наночасток таких металів як мідь, цинк і залізо, на відміну від їх солей, потенційно менш токсичні (наночастки міді – в 7, наночастки цинку – в 30, а наночастки заліза – в 40 разів порівняно з сірчанокислими солями відповідних металів) [7].

Використання наночастинок металів у сільськогосподарському виробництві для передпосівної обробки насіння і/або для обробки вегетуючих рослин дозволяє покращити якість посівного матеріалу, підвищити стійкість до фітопатогенів, збільшити урожайність та отримати екологічно чисту продукцію [10; 17].

У зв'язку з цим метою роботи було дослідити вплив неіонних колоїдних розчинів наночастинок біогенних металів на формування захисних реакцій проростків озимої пшениці за інфікування збудником церкоспорельозу *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton.

Матеріали та методи. Рослини пшениці сприйнятливого до церкоспорельозу сорту Миронівська 808 вирощували в умовах піщаної культури з моделюванням способу використання неіонного колоїдного розчину суміші наночастинок металів цинку, срібла, заліза, марганцю, міді та неіонного колоїдного розчину наночастинок міді в умовах агровиробництва. У дослідках проводили передпосівну обробку насіння пшениці колоїдним розчином суміші наночастинок металів і колоїдним розчином наночастинок міді, створеними кафедрою технології конструкційних матеріалів і матеріалознавства НУБіП України, отримани диспергуванням гранул цинку, срібла, заліза, марганцю, міді імпульсами електричного струму з амплітудою 100-2000 А у воді [8]. Насіння намочували у дослідних розчинах (1 частина колоїдного розчину:100 частин води) на чотири години, відмивали дистильованою водою і поміщали в термостат за 25° С на добу. У контрольному варіанті – насіння намочували у дистильованій воді. Насіння висівали в хімічно-нейтральні контейнери (8×8×9 см) та інфікували суспензією конідій фітопатогенного гриба, збудника цер-

коспорельозу [4]. Використовували високовірulentний штам 543 7/1 *P. herpotrichoides* (Fron) Deighton, який був одержаний з лабораторії імунітету сільськогосподарських рослин до хвороб Українського науково-дослідного інституту захисту рослин.

Інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) оцінювали за вмістом малонового діальдегіду (МДА), який визначали за реакцією з 2-тіобарбітуровою кислотою [6]. Абсорбцію світла реєстрували за λ 532 нм.

Екстракцію розчинних білків та визначення лектинової активності (ЛА) (за мінімальною концентрацією білка, що спричинювала аглютинацію еритроцитів щура) проводили методом ратусеритроаглютинації [9]. Активність лектинів розраховували за формулою, як величину, обернену до мінімальної концентрації білка, що викликає реакцію аглютинації еритроцитів і представляли в (мкг/мл)⁻¹. Вміст загального білка у виділених екстрактах визначали за методом Бредфорд [14].

Результати оброблені статистично. Достовірність різниці між варіантами оцінювали за критерієм Стьюдента при рівні значущості $P \leq 0,05$ [5].

Результати та їх обговорення. Загальною відповіддю рослин на дію абіотичних та біотичних, зокрема патогенів, стресорів є інтенсифікація утворення та накопичення активних форм кисню (АФК), які стимулюють процеси ПОЛ, що супроводжується порушенням структурно-функціональної цілісності клітинних мембран. Маркерами ПОЛ є тіобарбітурат-активні продукти (ТБАП), зокрема МДА, які накопичуються за активації цього процесу у разі дії стресора. Малоновий діальдегід – високоактивна низькомолекулярна гідрофільна сполука, яка за нормальних умов присутня в клітинах у низьких концентраціях. У зв'язку з тим, що МДА – один із найбільш стабільних продуктів ПОЛ, його вміст в тканинах широко використовують для оцінки активності цього процесу. За накопиченням продуктів ПОЛ можна оцінювати стійкість рослин до дії стресорів різної природи [3].

В результаті дослідження динаміки вмісту продуктів ПОЛ за попередньої обробки насіння пшениці нанометалами встановили, що обробка насіння неіонними колоїдними розчинами наночастинок біогенних металів призводить до зниження вмісту ТБАП у тканинах проростків впродовж всього експерименту порівняно із необробленим контролем (Рис.1). У разі використання колоїдного розчину суміші наночастинок металів вміст ТБАП був нижчим за контроль на 5,5–24,9 %, а у разі використання колоїдного розчину наночастинок міді – на 14,1–28,7 %.

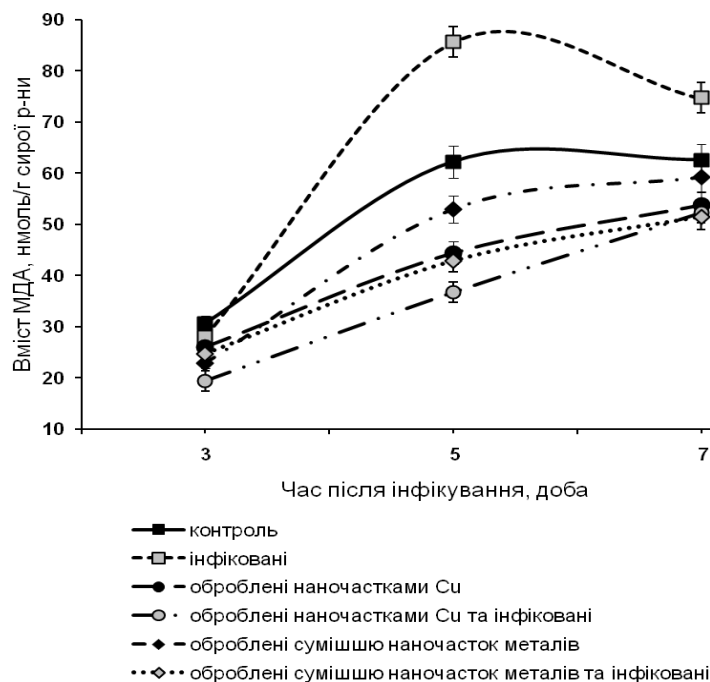


Рис. 1. Динаміка вмісту ТБКАП у проростках пшениці за передпосівної обробки насіння нанопрепаратами та послідуєчого інфікування суспензією конідій *P. Herpotrichoides*

За інфікування суспензією конідій гриба *P. herpotrichoides* вміст ТБКАП у проростках, отриманих із необробленого нанометалами насіння, був вищим ніж в неінфікованому контролі та ніж в усіх інших варіантах досліджу. Максимальний вміст продуктів ПОЛ (майже в 1,4 раза вищий за контроль) у цих проростках зафіксований на 5-ту добу. Це свідчить про розвиток стресового стану рослинного організму за патогенезу. Мінімальний вміст ТБКАП за інфікування спостерігали у разі передпосівної обробки насіння колоїдним розчином наночасток міді на 5-ту добу. Він майже в 1,7 раза був нижчим за контроль. Зважаючи на відомий факт щодо фунгіцидних властивостей сполук міді, ми припускаємо, що наночастки цього металу, як і наночастки срібла [15; 16], взаємодіючи із структурами гриба порушують перебіг нормальних фізіологічних реакцій, внутрішній гомеостаз, ініціюють загибель патогену, а отже запобігають розвитку патологічного процесу, що відображається в зниженні вмісту ТБКАП.

Слід зазначити, що досліджувані неіонні колоїдні розчини наночасток біогенних металів можуть діяти і як антиоксиданти [11], пригнічуючи утворення ТБКАП, а саме – малонового діальдегіду про що свідчить нижчий рівень ТБКАП у неінфікованих та інфікованих проростках, отриманих із попередньо обробленого нанометалами насіння, порівняно з контролем.

За дії патогену на рослину індукуються синтез патоген-залежних (pathogenesis related – PR) білків, задіяних у формуванні імунної відповіді. Встановлено, що PR-білки постійно наявні в рослинах у залишкових кількостях, але за атаки патогену їхня концентрація і актив-

ність значно зростають. Низькомолекулярні, хітинзв'язуючі захисні білки лектини, які належать до родини PR-4, взаємодіють з поверхнею клітин бактерій, спор і гіфів грибів, що призводить до припинення їхнього росту та перешкоджає розвитку патологічного процесу. При зараженні патогенами та за дії препаратів, які підвищують стійкість рослин до патогенів, спостерігається суттєве збільшення рівня ЛА [13].

Дослідження ЛА рослин пшениці за ураження патогенами (збудниками корневих гнилей, септоріозу, шкодо-чинних бактерій) показали, що відбувається зміна величини цього показника, яка корелює з розвитком інших проявів хвороби. Максимум активності цих захисних білків припадає на 4-9-у добу [1; 2; 13]. Ці дані безумовно вказують на безпосередню участь лектинів у формуванні захисних реакцій рослин проти фітопатогенів.

У дослідженнях Чурилова Г.І. [12] доведено, що ультрадисперсні порошки металів стимулюють ріст і розвиток лікарських рослин. Крім того, за дії нанопорошків металів, порівняно з контролем, у цих рослинах збільшувався вміст біологічно активних речовин: аскорбінової кислоти, каротину, вуглеводів. Тобто, можна зробити припущення, що передпосівна обробка насіння неіонними колоїдними розчинами наночасток біогенних металів впливатиме і на формування захисних реакцій за дії абіотичного або біотичного стресора.

Дослідження динаміки ЛА під час проростання у тканинах надземної частини проростків у контрольному варіанті показало поступове зростання цього показника до 5-ої доби з послідуєчим зниженням на 7-у добу до початкового рівня (Рис.2).

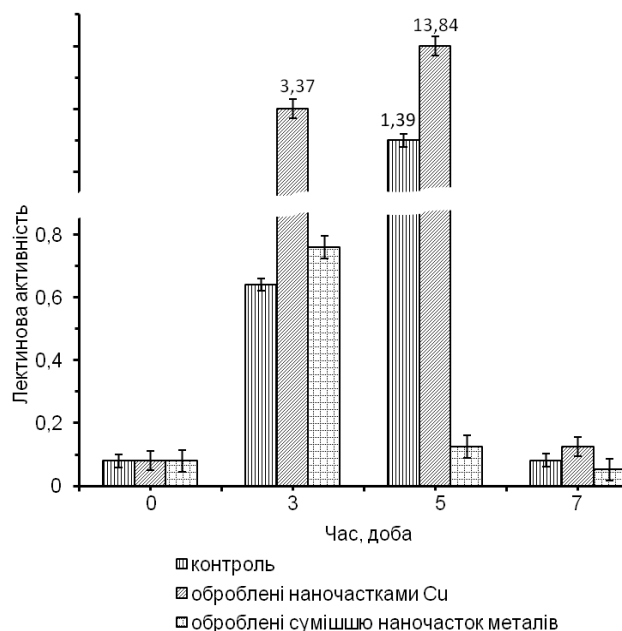


Рис. 2. Динаміка лектинової активності ((мкг/мл)⁻¹) в листках проростків пшениці за передпосівної обробки насіння нанопрепаратами

У разі передпосівної обробки зернівок пшениці сумішшю наночасток металів спостерігали незначне (у 1,2 раза) підвищення ЛА відносно контрольного і попереднього значень на 3-тю добу з послідовним поступовим зниженням. За передпосівної обробки зернівок пшениці розчином наночасток міді відмічене значне (у 5,3 раза) зростання ЛА порівняно з контрольним значенням на 3-тю добу з послідовним підвищенням у 4 рази відносно попереднього значення на 5-ту добу. У цьому варіанті досліду на 5-ту добу ЛА майже у 10 разів

була вища ніж у контролі. На нашу думку такі коливання значень ЛА можуть бути індуковані впливом передпосівної обробки насіння пшениці колоїдними розчинами наночасток біогенних металів, подібним до дії ксенобіотиків, які активують захисні реакції рослинного організму.

За інфікування у проростках, отриманих з необробленого нанопрепаратами насіння, індукцію ЛА спостерігали на 5-ту добу, як і в контролі, але у цьому випадку рівень ЛА був у 4,6 раза вищий, що пояснюється активацією захисних реакцій за патогенезу (Рис.3).

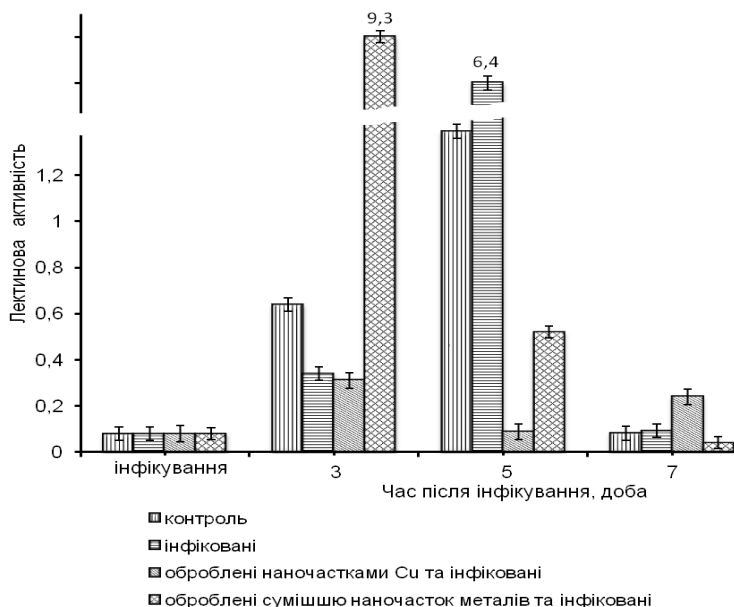


Рис. 3. Динаміка лектинової активності ((мкг/мл)⁻¹) в листках проростків пшениці за передпосівної обробки насіння нанопрепаратами та послідовного інфікування суспензією конідій *P. herpotrichoides*

У проростках, отриманих з насіння, яке обробляли колоїдним розчином суміші наночасток металів з послідовним інфікуванням суспензією конідій гриба *P. herpotrichoides* максимальний рівень ЛА (у 14,6 раза вищий за контроль) спостерігали на 3-тю добу. Тобто,

за передпосівної обробки зернівок пшениці сумішшю наночасток металів та інокуляції патогеном зростання активності захисних білків лектинів відмічалось раніше і було значно суттєвішим, а отже наночастки металів виступали в якості екзогенних індукторів ендогенних

захисних реакцій. Проте у проростках, отриманих з насіння, яке обробляли колоїдним розчином наночастинок міді з послідовним інфікуванням збудником церкоспореліозу спостерігали найнижчу ЛА порівняно з іншими варіантами дослідження. Слід зазначити, що у цьому випадку на 5-ту добу ЛА була мінімальною (у 3,5 раза нижча ніж на 3-тю добу і у 2,7 раза нижча ніж на 7-му). Загалом, за передпосівної обробки зернівки пшениці наночастиками міді та інюляції патогеном рівень ЛА був найнижчий впродовж 7 діб дослідження. В той же час, варто зазначити, що відносний приріст надземної частини проростків у цьому варіанті був найбільший.

Таким чином, результати наших досліджень формування у проростків пшениці захисних реакцій за патогенезу на рівні зміни активності захисних білків лектинів узгоджуються з результатами формування захисних реакцій на рівні накопичення продуктів ПОЛ.

На 7-му добу ЛА у всіх варіантах знижувалась. Варто відмітити, що в ході досліджень нами виявлено зворотну кореляцію між характером змін вмісту загального білка та активності захисних білків лектинів в усіх досліджуваних варіантах.

Висновки. Отже, за інфікування проростків пшениці збудником церкоспореліозу, яке спричиняє окиснювальний вибух у клітинах, досліджувані неіонні колоїдні розчини наночастинок біогенних металів діяли як антиоксиданти, пригнічуючи утворення тіобарбітурат-активних продуктів перекисного окиснення ліпідів, а саме – малонового діальдегіду. Припускаємо, що нанометали можуть підвищувати антиоксидантні властивості клітин за дії фітопатогену та покращувати фізіологічний стан рослин.

Характер загальної динаміки лектинової активності у контрольному та інфікованому варіантах співпадає, але максимальне значення ЛА значно вище за інфікування, що свідчить про індукцію ЛА патогеном. Передпосівна обробка зернівки пшениці неіонним колоїдним розчином суміші наночастинок металів цинку, срібла, заліза, марганцю, міді викликала підвищення ЛА, особливо значне за інфікування, яке спостерігали раніше ніж у варіантах без передпосівної обробки насіння сумішшю наночастинок металів, що може бути проявом індукції ендогенних захисних реакцій проростків пшениці до патогену. У разі обробки насіння пшениці колоїдним розчином наночастинок міді характер динаміки ЛА був подібний до такого у контролі, але значення ЛА були у 5-10 разів вищі від контрольних. Проте за інфікування – рівень ЛА у цьому варіанті був найнижчим, що обумовлено фунгіцидними властивостями сполук міді.

Acknowledgments. Робота виконана за фінансової підтримки Державного агентства з питань науки, інновацій та інформатизації України (за договором № ДЗ/493-2011 від 29 вересня 2011 р.)

Список використаних джерел

1. Адамовская В. Г., Линчевский А. А., Молодченкова О. О., Цисельская Л. И. Лектины клеточных стенок проростков ячменя при поражении *Fusarium culmorum* и действии салициловой кислоты // Физиология и биохимия культурных растений. – 2005. – Т. 37, № 3. С. 267–274.
2. Бабоша А. В. Лектины и проблема распознавания фитопатогенов растением-хозяином // Журнал общей биологии. – 2008. – Том 69, №5. – Стр. 379–396.
3. Бацманова Л. М., Таран Н. Ю. Скринінг адаптивного потенціалу рослин за показниками окисного стресу. – Київ, 2010.
4. Белава В. Н., Панюта О. О., Таран Н. Ю. Модельная система инфицирования та оцінки рівня стійкості озимої пшениці (*Triticum aestivum* L.) проти збудника церкоспореліозу (*Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton) // Карантин і захист рослин. – 2008. – Т. 7. – Стр. 25–28.
5. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). – М., 1985.
6. Жиров В. К., Мерзляк М. Н., Кузнецов Л. В. Перекисное окисление мембранных липидов холодостойких растений при повреждении отрицательными температурами // Физиология растений. – 1982. – Т. 29, №6. – С. 1045–1053.
7. Зайцев С. Ю. Мембранные наноструктуры на основе биологически активных соединений для бионанотехнологии // Российские нанотехнологии. – 2009. – Т. 4, №7-8. – С. 44–55.
8. Лопатко К. Г., Афтандіянц Є. Г., Каленська С. М., Тонха О. Л. "Спосіб отримання неіонного колоїдного розчину металів". – Патент на винахід №38459 від 12.01.2009.
9. Погоріла Н. Ф., Суржик Л. М., Погоріла З. О. Новий спосіб тестування лектинів рослин // Український ботанічний журнал. – 2002. – Т. 59, №2. – С. 217–220.
10. Райкова А. П., Паничкин Л. А., Райкова Н. Н. Исследование влияния ультрадисперсных порошков металлов, полученных различными способами, на рост и развитие растений // Нанотехнологии и информационные технологии – технологии XXI века: Материалы Международной научно-практической конференции – Москва, 2006.
11. Таран Н. Ю., Бацманова Л. М., Каленський В. П., Лопатко К. Г. Використання наночастинок металів у технології вирощування зернових культур. – К.: АБЕГА, 2012.
12. Чурилов Г. И. Влияние нанопорошков железа, меди, кобальта в системе почва-растение // Вестник ОГУ. – 2009. – №12 (106). – С. 148–151.
13. Шакирова Ф. М., Безрукова М. В. Современные представления о предполагаемых функциях лектинов растений // Журнал общей биологии. – 2007. – Т. 68, № 2. – С. 98–114.
14. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72: 248-254.
15. Jung JH, Kim SW, Min JS, Kim YJ, Lamsal K, Kim KS, et al. The effect of nano-silver liquid against the white rot of the green onion caused by *Sclerotium cepivorum*. *Mycobiology*. 2010; 38(1):39-45.
16. Kasprówicz MJ, Kozioł M, Gorczyca A. The effect of silver nanoparticles on phytopathogenic spores of *Fusarium culmorum*. *Can J Microbiol*. 2010 Mar;56(3):247-53.
17. Masarovičová E, Králová K. Metal nanoparticles and plants. *ECOL CHEM ENG S*. 2013;20(1):9-22.

Надійшла до редколегії 24.01.14

О. Панюта, канд. биол. наук, В. Белава, канд. биол. наук, С. Фомаиди, маг. 2 курса, Е. Калиниченко, спец. 2 кат., Н. Таран, проф. КНУ имени Тараса Шевченко, Киев

ВЛИЯНИЕ ПРЕДПОСЕВНОЙ ОБРАБОТКИ СЕМЯН НАНОЧАСТИЦАМИ НА ЗАЩИТНЫЕ РЕАКЦИИ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ, ИНФИЦИРОВАННЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕМ ЦЕРКОСПОРЕЛЕЗА

Исследовали изменение интенсивности перекисного окисления липидов и лектиновой активности в проростках пшеницы, полученных из семян, обработанных коллоидным раствором смеси наночастиц металлов (Zn, Ag, Fe, Mn, Cu) и коллоидным раствором наночастиц меди, при инфицировании суспензией конидий возбудителя церкоспореллеза. Исследованы неіонные коллоидные растворы наночастиц биогенных металлов действовали как антиоксиданты, угнетая образование продуктов перекисного окисления липидов. Было показано, что возрастание активности лектинов при инфицировании в случае предпосевной обработки семян смесью наночастиц металлов происходит раньше.

Ключевые слова: нанометаллы, перекисное окисление липидов, лектины, пшеница, церкоспореллеза.

O. Panyuta, PhD., V. Belava, PhD, S. Fomaidi, Masters 2 year., O. Kalinichenko, Spec categ. 2., N. Taran, Prof. Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

INFLUENCE OF PROCESSING OF WHEAT SEEDS BY METALS NANOPARTICLES ON DEFENSE REACTIONS IN WHEAT SEEDLINGS UNDER EYESPOT CAUSAL AGENT

The effect of processing wheat seeds by nonionic colloid solution of metals nanoparticles (Zn, Ag, Fe, Mn, Cu) and nonionic colloid solution of cuprum nanoparticles on lipid peroxidation and lectin activity in wheat seedlings under eyespot causal agent was investigated. Nonionic colloid solution of metals nanoparticles inhibited lipid peroxidation products formation. Early increasing of lectin activity in wheat seedlings under infection and presowing treatment of seeds by nonionic colloid solution of metals nanoparticles was determined.

Key words: metals nanoparticles, lipid peroxidation, lectins, wheat, eyespot.

УДК 615.277.3:612.465

М. Данилов, асп., Г. Островська, проф.
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ВПЛИВ ЦИТОСТАТИКА ПОХІДНОГО ДИГІДРОПІРОЛУ НА МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН НИРОК ЩУРІВ ПРИ РІЗНИХ ТЕРМІНАХ ВВЕДЕННЯ ТА ЗА УМОВ ХЕМОІНДУКОВАНОГО КОЛОРЕКТАЛЬНОГО КАНЦЕРОГЕНЕЗУ

Показано, що введення цитостатичної сполуки, похідного 1,2-дигідропіролу, протягом 7 тижнів викликає помірні порушення гістологічної структури нирок щурів. При впливі Д1 протягом 27 тижнів підсилюються негативні зміни гломерулярної частини нефрона, тоді як в епітелії канальців кіркового шару, навпаки, відбувається часткова адаптація. Нефротоксичний ефект похідного 1,2-дигідропіролу посилюється при його введенні в умовах диметилгідрозин-індукованого канцерогенезу.

Ключові слова: цитостатична сполука, похідне дигідропіролу, гістологічна структура нирки, канцерогенез.

Вступ. Онкологічні захворювання є однією з головних проблем сучасної медицини, для вирішення якої проводиться значний обсяг різноманітних досліджень. Серед найбільш поширених способів лікування онкологічних захворювань є застосування хіміотерапії, яка характеризується низькою вибірковістю напрямку дії та високою токсичністю. Розробка шляхів підвищення вибіркової дії лікувального агента разом із зменшенням загальної токсичності на організм активно проводиться в рамках так званої "таргетної" (цільової) терапії, яка заснована на цільовій дії на конкретні онкопротейни – важливі ланки сигнальних шляхів, які порушуються при канцерогенезі [8]. Важливою групою онкопротейнів є протеїнкінази рецептори, що залучені до регуляції багатьох клітинних процесів, серед яких особливо важливим при канцерогенезі виступає процес проліферації, через що ці ланки регуляції клітинного циклу є одними з головних мішеней препаратів цільової дії [5,6,9]. Перспективними сполуками в якості препаратів таргетної дії є похідні дигідропіролу, які, завдяки просторовій структурі молекул, можуть взаємодіяти з АТФ-зв'язуючим центром протеїнкінази і ефективно їх блокувати [10]. Науково-виробничим Хіміко-біологічним центром Київського національного університету імені Тараса Шевченка було синтезовано похідне дигідропіролу (Д1, 5-аміно-4-(1,3-бензотіазол-2-іл)-1-(3-метоксифеніл)-1,2-дигідро-3Н-пірол-3-он), що виявило антипроліферативну активність на культурах трансформованих клітин, особливо на лінії колоректального раку [4]. Похідне дигідропіролу в попередніх дослідженнях продемонструвало протипухлинну активність та відсутність пошкоджуючої дії у слизовій оболонці товстої кишки за умов моделювання колоректального раку у щурів [3], та меншу токсичність на слизову оболонку товстої кишки, у порівнянні з традиційним протипухлинним препаратом 5-фторурацилом [2].

Проте, при створенні і дослідженні ефектів таких сполук важливим є не тільки досягнення високої специфічності до молекули-мішені, що обумовлює цитостатичний ефект у малігнізованих клітинах, а також і аналіз їх токсичності при тривалому застосуванні. Нефротоксичність є одним з основних побічних ефектів лікарських засобів [1].

Мета дослідження полягала у вивченні впливу власних ефектів сполуки з цитостатичними властивостями 5-аміно-4-(1,3-бензотіазол-2-іл)-1-(3-метоксифеніл)-1,2-дигідро-3Н-пірол-3-ону (Д1) на морфофункціональний стан нирок щурів при 7- та 27-тижневому пероральному введенні, та її ефектів за умов моделювання раку товстої кишки щурів за допомогою 1,2-диметилгідрозину (ДМГ) [7].

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження проводили на 70 безпорідних статевозрілих щурах-самцях. Речовини вводили наступним чином: Д1 (2,3 мг/кг маси

тіла) per os щоденно розчиненим у 0,1 мл соняшникової олії, що містить 15% ДМСО; ДМГ (20 мг/кг маси тіла) підшкірно щотижнево розчиненим у 0,1 мл фізіологічного розчину з нейтральним рН). Експериментальні тварини були рандомізовано розділені на 5 груп: I – Д1, 7 тижнів; II – Д1, 27 тижнів; III – ДМГ, 20 тижнів; IV – ДМГ, 20 тижнів, потім Д1, 7 тижнів; V – ДМГ, 20 тижнів та одночасно Д1 27 тижнів, VI група інтактних тварин. Тварини контрольної групи отримували відповідні розчинники за вищевказаними схемами. Щури експериментальних груп також отримували розчинники замість речовин, дія яких не досліджувалась у даних групах. Щурів виводили з експерименту через 1 добу після останнього введення досліджуваних речовин шляхом декапітації під ефірним наркозом. Для гістологічних досліджень брали фрагменти нирок, які фіксували у суміші Буена. Виготовляли парафінові зрізи, препарати забарвлювали гематоксиліном та еозином за стандартною методикою. Морфологічний аналіз препаратів нирок проводили за допомогою світлової мікроскопії. Морфометричні параметри вимірювали за допомогою програми ImageJ 1.45 на цифрових мікрофотографіях, які були зроблені з використанням камери Delta Optical HDCE-50 та мікроскопа Bresser Trino Researcher. Статистичну обробку морфометричних даних проводили з використанням програм статистичного пакету аналізу даних Microsoft Excel 2010 для персонального комп'ютера з використанням t-критерію Стьюдента.

Результати досліджень та їх обговорення. Під впливом Д1 протягом 7 тижнів в нирках щурів відмічаються зміни гістологічної структури кіркової речовини. У судинних клубочках спостерігалось спадання капілярів, клубочки ущільнюються та втрачають округлу форму. Площа поперечного перерізу капсул Шумлянського-Боумана не змінюється під впливом Д1 порівняно із контролем, тоді як площа судинних клубочків зменшується на 10% ($p < 0,05$) (табл 1). Такі зміни у гломерулярному апараті вказують на нефротоксичність Д1. Виявлено також токсичний вплив Д1 на тубулярний апарат нирок. Спостерігались дистрофічні зміни епітеліоцитів ниркових канальців, зустрічаються ядра неправильної форми в окремих клітинах (рис. 1). В той же час достовірних змін площі поперечного перерізу ядер епітеліоцитів проксимальних та дистальних канальців при дії Д1 не спостерігалось. Апікальна частина деяких клітин канальців зруйнована. При введенні цитостатика протягом 7 тижнів висота епітелію проксимальних канальців зменшується на 20%, а дистальних на 27% ($p < 0,05$, табл 2). Просвіт канальців розширений, заповнений блідо-рожевими слабко зернистими масами. В інтерстиції спостерігався помірний набряк та подекуди помітна лімфоїдна інфільтрація. У мозковій речовині суттєвих змін гістологічної структури не виявлено. Такі зміни морфофункціонального стану нирок свідчать про помірну нефротоксичність похідного дигідропіролу.

Таблиця 1. Вплив Д1 на стан гломерулярного апарату нефронів щурів при ДМГ-індукованому канцерогенезі протягом 7 та 27 тижнів

Група	Площа капсули, мкм ² , M±m	Площа судинного клубочка, мкм ² , M±m
Контроль	6809,05±427,21	5063,14±245,7
I – Д1, 7 тижнів	7079,17±265,22	4428,03±146,38*
II – Д1 27 тижнів	7468,1±429,07	4248,16±157,32*
III – ДМГ	7918,46±511,83*	4955,3±389,3
IV – ДМГ + Д1 7 тижнів	8952,19±450,97 [#]	4400,25±230,49*
V – ДМГ + Д1 27 тижнів	9406,08±459,44 [#]	5374,28±415,03

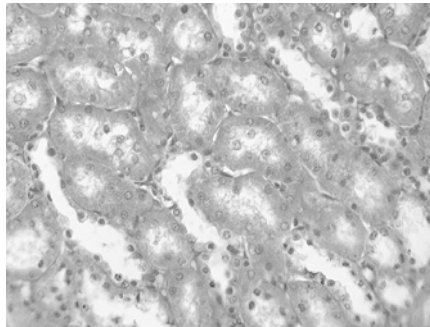
Примітка: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем [#] – $p < 0,05$ порівняно з групою ДМГ

При дії Д1 протягом 27 тижнів гістологічна структура кіркового шару нирок в цілому зазнає менших змін, ніж при 7-тижневому впливі. У судинних клубочках спостерігалось спадання капілярів, зустрічається багато зморщених клубочків, які втрачають правильну форму. Площа поперечного перерізу капсул Шумлянського-Боумана достовірно не змінюється під впливом Д1 протягом 27 тижнів, як це було і при 7-тижневій дії, проте, має тенденцію до збільшення, площа судинних клубочків зменшується на 16% ($p < 0,05$) (табл 1). Зустрічається менше каналців із дистрофічними епітеліоцитами порівняно із групою, яка отримувала Д1 7 тижнів (рис. 1).

При 27-тижневій дії Д1 спричиняє менші зміни висоти епітелію каналців – у проксимальних каналців вона

зменшується лише на 9% ($p < 0,05$), а дистальних – на 17% ($p < 0,05$), що свідчить про часткову адаптацію клітин ниркових каналців до дії цитостатика (табл 2). Ядра клітин каналців мають нормальну форму, зустрічаються поодинокі гіперхромні ядра, площа ядер не має достовірної різниці із показниками контрольної групи. Просвіт каналців вільний від стороннього вмісту, діаметр просвіту проксимальних та дистальних каналців незначно збільшений. Мозковий шар нирок щурів при 27-тижневій дії Д1 також має певні зміни: епітеліоцити мають ознаки зернистої дистрофії, у частини каналців відсутній епітелій, інтерстиційна тканина навколо каналців набрякла.

а



б

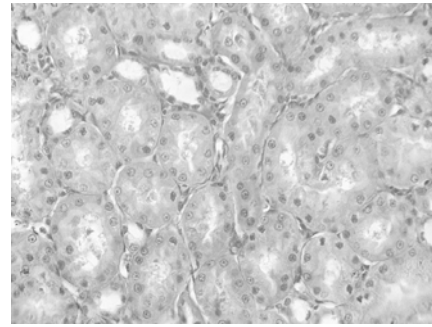


Рис. 1. Гістологічна структура нирок щурів (ниркові каналці): а – група, що отримувала Д1 7 тижнів; б – група, що отримувала Д1 27 тижнів. Гематоксилін-еозин. Збільш. 400

Таблиця 2. Вплив Д1 на стан проксимальних та дистальних каналців нирок щурів при ДМГ-індукованому канцерогенезі протягом 7 та 27 тижнів

Група	Висота епітелію, мкм, M±m	Площа ядер епітеліоцитів, мкм ² , M±m	Діаметр просвіту каналця, мкм, M±m
Проксимальні каналці			
Контроль	14,39±0,37	25,41±0,87	13,1±0,57
I – Д1, 7 тижнів	11,56±0,57*	25,83±0,75	14,97±0,74*
II – Д1, 27 тижнів	13,07±0,40*	25,8±0,6	14,38±0,41*
III – ДМГ	13,11±0,46*	23,69±0,59*	15,32±0,94*
IV – ДМГ+Д1, 7 тижнів	11,96±0,34 [#]	23,41±0,65*	15,57±0,85*
V – ДМГ + Д1, 27 тижнів	13,00±0,32*	23,07±0,60*	16,30±0,88*
Дистальні каналці			
Контроль	9,67±0,51	21,95±0,71	12±0,39
I – Д1, 7 тижнів	7,12±0,31*	20,84±0,56	16,24±0,46*
II – Д1, 27 тижнів	8,08±0,34*	21,06±0,64	15,78±0,86*
III – ДМГ	7,35±0,2*	17,6±0,32*	18,00±1,12*
IV – ДМГ+Д1, 7 тижнів	6,10±0,37 [#]	16,4±0,76*	17,49±1,02*
V – ДМГ + Д1, 27 тижнів	7,13±0,1*	18,5±0,9*	18,24±1,09*

Примітка: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем [#] – $p < 0,05$ порівняно з групою ДМГ

При введенні ДМГ, який використовується для моделювання хемо-індукованого раку товстої кишки, виявляється його нефротоксичність. Протягом 20 тижнів застосування канцерогену розвиваються помітні зміни гістологічної структури кіркового шару нирок (рис. 2). У гломерулярній частині нефрона спостерігався набряк. Просвіт між листками капсули Шумлянського-Боумана

розширений, площа поперечного перерізу капсул на 16% ($p < 0,05$) більша від контролю, але площа судинних клубочків залишається без змін (табл 1). У деяких ниркових каналцях з'являються ознаки гідропічної дистрофії, окремі епітеліоцити мають зруйновану апікальну частину, місцями спостерігалось злушення епітеліального шару у дистальних каналцях та оголення базаль-

ної мембрани. Висота епітеліального шару проксимальних канальців достовірно зменшена на 9%, у дистальних канальцях висота епітелію зменшується на 24% ($p < 0,05$) (табл 2). У клітинах зустрічаються гіперхромні та зморшкуваті ядра, що особливо помітно у дистальних канальцях, у проксимальних канальцях ядра зсунуті або до апікальної частини клітин, або притиснуті до базальної мембрани. Більшість ядер дистальних канальців неправильної форми, відбувається зменшення площі поперечного перерізу ядер епітеліоцитів на 7% у проксимальних канальцях, та на 20% ($p < 0,05$) у дистальних канальцях (табл 2). Просвіт різних канальців неоднаковий, але в середньому він більший ніж у контро-

льної групи, його діаметр складає $15,32 \pm 0,94$ мкм та $18 \pm 1,12$ мкм у проксимальних та дистальних канальцях відповідно (табл 2). Часто просвіт проксимальних канальців заповнений аморфними масами. У багатьох тварин спостерігалось повнокрів'я судин та розширення їх стінок. У мозковому шарі частина канальців має десквамований епітелій. Ядра епітеліоцитів у мозковому шарі зміненої форми, як і у канальцях кіркового шару, проте, зустрічалося не так багато гіперхромних та зморшкуватих ядер. Отже, ДМГ значною мірою впливає на канальцевий апарат нирок, що свідчить про нефротоксичність цього канцерогену.

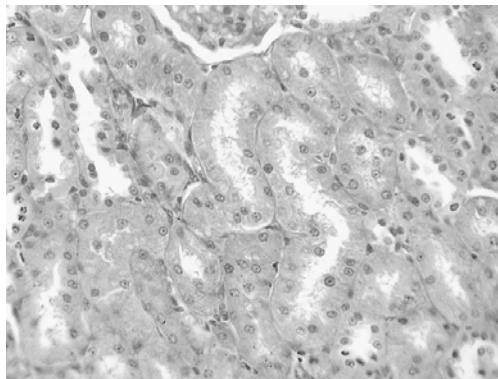


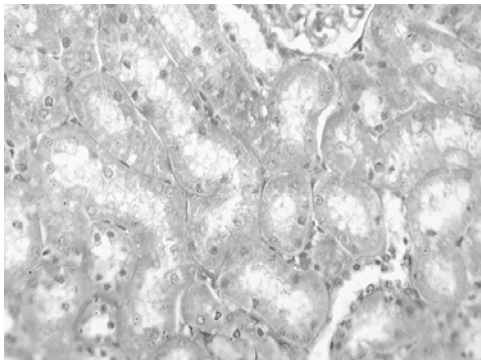
Рис. 2. Гістологічна структура нирки щурів при ДМГ-індукованому колоректальному канцерогенезі. Гематоксилін-еозин. Збільш. 400

При введенні Д1 протягом 7 тижнів після відміни канцерогену виникають більш значні зміни морфофункціонального стану кіркового шару нирок щурів ніж у групі, що отримувала лише ДМГ (рис. 3). Капсули Шумлянського-Боумена значно збільшені, часто неправильної форми, судинні клубочки зморщені, спостерігалось спадання капілярних петель клубочків. Площа поперечного перерізу капсул нефрона достовірно ($p < 0,05$) збільшується на 31% відносно контролю та на 16% відносно групи ДМГ, площа судинних клубочків зменшується на 13% відносно контролю та не має достовірних змін порівняно із групою ДМГ (табл 1). Це говорить про значний набряк у гломерулярному апараті нефрона. У багатьох тварин гідропічна дистрофія канальцевого епітелію помірно виражена, зустрічається більше канальців зі сплосченим епітелієм або оголеною базальною мембраною ніж у групі ДМГ. Висота епітелію проксимальних та дистальних канальців зменшується ($p < 0,05$) на 17% та 37% відповідно відносно контрольних значень, та на 8% і 13% відповідно порівняно із групою, що отримувала лише ДМГ (табл 2). Відповідно деструктивна дія комбінації Д1 із ДМГ значніша ніж вплив одного канцерогену. Ядра багатьох епітеліоцитів канальців мають неправильну форму, зустрічається велика кількість гіперхромних ядер, спостерігалось зменшення площі поперечного перерізу ядер на 8% та 25% у проксимальних та дистальних канальцях відповідно (табл. 2). Достовірних змін площі ядер порівняно з групою ДМГ не виявлено. Просвіт деяких канальців заповнений еозинофільним дрібнодисперсним матеріалом, діаметр просвіту більший від контрольних значень, проте не відрізняється від показників групи, що отримувала лише канцероген, і становить $15,57 \pm 0,85$ мкм та $17,49 \pm 1,02$ мкм у проксимальних та дистальних канальцях відповідно (табл 2). У інтерстиції часто спостерігається лімфоїдна інфільтрація. У мозковій речовині зустрічаються канальці із десквамованим епітелієм та зморшкуватими ядрами аналогічно групі ДМГ. Отже,

7-тижнева дія Д1 посилює нефротоксичний вплив канцерогену у кірковому шарі нирок.

У групі, що отримувала Д1 всі 27 тижнів експерименту одночасно із 20-тижневим впливом канцерогену вплив ДМГ на кірковий шар нирок посилюється, як і при 7-тижневій дії Д1 після відміни ДМГ (рис. 3). Площа поперечного перерізу капсул Шумлянського-Боумена достовірно ($p < 0,05$) збільшується на 38% відносно контролю та на 22% порівняно із ДМГ, це значніші зміни ніж при 7-тижневій дії Д1 після відміни ДМГ, проте, площа судинних клубочків має лише тенденцію до збільшення, тоді як при 7-тижневій дії Д1 після відміни ДМГ площа судинних клубочків значно зменшувалась. Це може бути пов'язано із тим, що площа капсул зростає не через набряк, а шляхом залучення компенсаторних механізмів, разом із тим збільшується і площа клубочків, оскільки морфологічно судинні клубочки мають такі ж деструктивні зміни, як і при 7-тижневій дії Д1 після відміни ДМГ. Отже, гломерулярний апарат нефрона має значніші зміни при 27-тижневій дії Д1. Гідропічна дистрофія канальцевого епітелію менш виражена порівняно із дією Д1 протягом 7 тижнів, зустрічається менше канальців зі сплосченим епітелієм або оголеною базальною мембраною. Висота епітелію проксимальних та дистальних канальців зменшується на 10% та 26% відповідно відносно контрольних значень, що є значно меншими змінами порівняно із групою, що отримувала Д1 протягом 7 тижнів після відміни ДМГ. Спостерігалось зменшення площі поперечного перерізу ядер епітеліоцитів на 10% у проксимальних канальцях, та на 26% у дистальних відносно контролю ($p < 0,05$), порівняно із групою ДМГ площа ядер не змінюється. Просвіт канальців розширений його діаметр складає $16,3 \pm 0,88$ мкм та $18,24 \pm 1,09$ мкм у проксимальних та дистальних канальцях відповідно. У мозковій речовині відмічається зерниста дистрофія епітелію канальців, подекуди некроз та десквамація епітеліальних клітин.

а



б

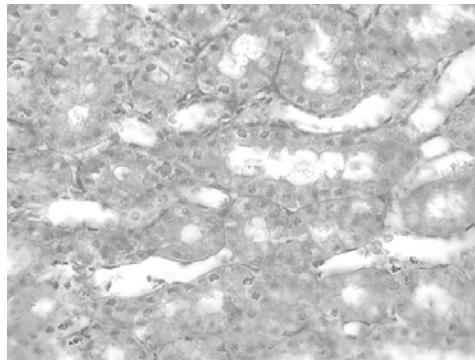


Рис. 3. Гістологічна структура канальців кіркового шару нирки щурів:

а – група, що отримувала Д1 протягом 7 тижнів після відміни ДМГ;

б – група, що отримувала Д1 27 тижнів одночасно із введенням ДМГ. Гематоксилін-еозин. Збільш. 400

Висновки. Таким чином, введення похідного дигідропіролу протягом 7 тижнів викликає помірний нефротоксичний ефект, що проявляється у пошкодженні капілярних клубочків нефрону та епітелію канальців кіркового шару нирок. При впливі Д1 протягом 27 тижнів спостерігаються більш значні негативні зміни гломерулярної частини нефрона, ніж при 7-тижневому введенні, тоді як у епітелії канальців кіркового шару, навпаки, виявляються менш значні порушення, що говорить про часткову адаптацію епітеліоцитів до дії Д1 при довготривалому введенні, однак, з'являються пошкодження у мозковій речовині нирок. 7-тижнева дія Д1 після 20 тижнів введення канцерогену посилює нефротоксичний вплив канцерогену у кірковому шарі нирок, що можна пояснити більшим навантаженням на нирки, як орган виділення при дії двох ксенобіотиків. Нефротоксичний ефект на тубулярний апарат кіркового шару є менш вираженим при 27-тижневій дії Д1 одночасно з введенням ДМГ, ніж при дії похідного дигідропіролу протягом 7 тижнів після канцерогену, як і у групах, які не отримували канцерогену, це свідчить про можливість епітеліоцитів адаптуватися до впливу цитостатика і в умовах канцерогенезу в організмі.

Враховуючи раніше встановлений позитивний вплив досліджуваної речовини на канцерогенез товстої кишки (протипухлинні ефекти і низька цитотоксичність) [2, 3],

подальше дослідження ефектів похідного дигідропіролу Д1 може продовжуватись, але з врахуванням можливих впливів на інші системи та органи.

Список використаних джерел

1. Зими́на Л.Н. Лекарственная гепатонепропатия // Арх. патологии. – 1988. – Т. 50, вып. 5. – С.58-65.
2. Кузнецова Г.М. Порівняння впливу цитостатичних сполук похідного дигідропіролу і 5-фторурацилу на слизову оболонку кишечника щурів // Совр.пробл. токсикологии. – 2011. – №1-2. – С.47-51.
3. Кузнецова Г.М. Протипухлинна дія цитостатичної сполуки похідного дигідропіролу при хемо-індукованому канцерогенезі товстої кишки щурів // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. – 2011. – Вип. 5 (107). – С. 66-74.
4. Пат. 22204 (UA), А61К31/40. Сполука 1,4-заміщених 5-аміно-1,2-дигідропірол-3-онів, що має протиракову активність / Дубініна Г.Г., Воловченко Ю.М. – Опубл. 25.04.2007, Бюлл. № 5.
5. Dancey J. Issues and progress with protein kinase inhibitors for cancer treatment // Nature Rev.Drug Discovery. – 2003. – 2, №4. – P.296-313.
6. Hait. W. N. Targeted Cancer Therapeutics // Cancer Research. – 2009. – Vol. 69, – P. 1263-1267.
7. Perse M. The dimethylhydrazine induced colorectal tumours in rat-experimental colorectal carcinogenesis // Radiol. Oncol. – 2005. – 39, № 1. – P. 61-70.
8. Singer C.F. Principles and method of action of targeted therapies // Wien Med Wochenschr. – 2010. – V.160, № 19-20. – P.501-505.
9. Thaimattam R. Protein kinase inhibitors: structural insights into selectivity // Curr. Pharm. Des. – 2007. – V.13, №27. – P. 2751-2765.
10. Wu H.-Ch. Targeted Therapy for Cancer // Journal of Cancer Molecules. – 2006. – 2, № 2. – P. 57-66.

Надійшла до редколегії 10.01.14

М. Данилов, асп., Г. Островская, проф.
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ВЛИЯНИЕ ЦИТОСТАТИКА ПРОИЗВОДНОГО ДИГИДРОПИРРОЛА НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПОЧЕК КРЫС ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СРОКАХ ВВЕДЕНИЯ И ПРИ ХЕМОИНДУЦИРОВАННОМ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

Показано, что введение цитостатического соединения, производного 1,2-дигидропиррола, в течение 7 недель вызывает умеренное нарушение гистологической структуры почек крыс. При воздействии Д1 в течение 27 недель усиливаются негативные изменения гломерулярной части нефрона, тогда как в эпителии канальцев коркового слоя, наоборот, происходит частичная адаптация. Нефротоксический эффект производного 1,2-дигидропиррола усиливается при его введении в условиях диметилгидразин-индуцированного канцерогенеза.

Ключевые слова: цитостатическое соединение, производное дигидропиррола, гистологическая структура почки, канцерогенез.

М. Danilov, PhD., G. Ostrovska, prof.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

INFLUENCE OF DERIVATIVE DIHYDROPYRROLE CYTOSTATICS ON MORPHOFUNCTIONAL STATUS OF RAT KIDNEY AT DIFFERENT DURATIONS OF ADMINISTRATION AND IN COLORECTAL CHEMO-INDUCED CARCINOGENESIS

It is shown that the cytostatic compound 1,2-dihydropyrrole derivative causes moderate damage of kidney histological structure in rats when administered it for 7 weeks. When D1 affects over 27 weeks the negative changes of the nephron glomerular are increased, while in the tubular epithelium of the cortical layer there is a partial adaptation to cytostatic action. Nephrotoxic effect derivative of 1,2-dihydropyrrole enhanced when administered under dimethylhydrazine-induced carcinogenesis.

Key words: cytostatic compound, dihydropyrrole derivative, histological structure of the kidney, cancerogenesis.

УДК 577.359/57.043:57.053:57.042

М. Мельник, асп., В. Мартинюк, д-р біол. наук,
О. Цимбалюк, канд. біол. наук, О. Артеменко, канд. біол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ВПЛИВ ЕЛЕКТРОМАГНІТНОГО ПОЛЯ НАДНИЗЬКОЇ ЧАСТОТИ НА ВИКЛИКАНЕ K^+ -ДЕПОЛЯРИЗАЦІЮ ЗБІЛЬШЕННЯ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОЇ КОНЦЕНТРАЦІЇ ІОНІВ КАЛЬЦІЮ В ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВИХ КЛІТИНАХ

Показано пригнічуючу дію електромагнітного поля 8 Гц 25 мкТл на K^+ -індуковане збільшення внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію в гладеньком'язових клітинах шлунку щурів. Продemonстровано збільшення часу досягнення максимальної внутрішньоклітинної концентрації кальцію під впливом електромагнітного поля. Показано, що отримані дані на гладеньком'язових клітинах узгоджуються з результатами досліджень впливу електромагнітного поля тих же параметрів на гладеньком'язові смужки сліпої кишки щурів. Отримані результати, дозволяють передбачити, що ймовірною мішенню впливу електромагнітного поля є потенціалкеровані кальцієві канали міоцитів.

Ключові слова: електромагнітне поле, кальцієві канали міоцитів.

Вступ. Електромагнітне поле (ЕМП) є важливим фізичним фактором навколишнього середовища. Впродовж мільйонів років живі організми пристосовувались певним чином до постійного впливу природного поля. Але в останнє сторіччя з розвитком технологій з'явилися ЕМП техногенного походження, які за частотним діапазоном та силою набагато різноманітніші та відчутні. Джерелом цих ЕМП є повсякденні речі, такі як мобільні телефони, побутові прилади, електромережі та ін. Враховуючи це, з'ясування можливого впливу полів на живі організми є актуальним питанням. Вплив слабких ЕМП на живі об'єкти довгий час викликав питання у дослідників. Але в останні роки була отримана значна кількість даних, що експериментально підтверджують біологічну активність ЕМП. Особливу цікавість викликають наднизькочастотні (ННЧ) ЕМП, оскільки добре проявляють біологічну активність [10, 15, 17]. Зокрема поля частотами 8, 50 і 60 Гц часто використовуються в фізіотерапії. Існує ряд теорій, що намагаються пояснити механізм впливу ЕМП на живі структури [13], але єдиної загальноприйнятої поки що немає. Так, припускають можливість впливу ЕМП на регуляторні шляхи в клітинах, а також розглядають їх можливу здатність підсилювати або послаблювати біологічну активність певних природних чи штучних речовин [16]. З точки зору біофізики та фізіології найбільш цікавим є здатність ННЧ ЕМП впливати на збудливі клітини і тканини. Так, під впливом ЕМП з параметрами 60 Гц і 2 мТл змінювалась проліферація клітин різних типів, зокрема, гладеньком'язових клітин (ГМК) аорти [10]. В режимі щоденної тригодинної експозиції полем через два тижні проліферація ГМК зменшувалась, тоді як В-лімфобластів, які знаходились в тих самих умовах, збільшувалась. За даними інших дослідників ЕМП частотою 50 Гц пригнічувало активність секреторних клітин залозистого епітелію простати [7]. В наших попередніх дослідженнях продемонстровано, що ЕМП в діапазоні частот 1-100 Гц та індукцією 25 мкТл змінювало внутрішньоклітинну концентрацію іонів кальцію ($[Ca^{2+}]_i$) в ГМК шлунку щурів, при чому якщо одні частоти індукували її збільшення (34, 45, 50, 95 Гц та ін.), то інші – навпаки призводили до зниження (24, 60 Гц та ін.) [17]. Автори [1] показали, що ННЧ ЕМП частотами 7-72 Гц та індукцією 13-114 мкТл в комбінації зі статичним полем індукцією 27-37 мкТл напряму змінювало ймовірність відкритого стану кальцієвих каналів плазматичної мембрани. Також було продемонстровано, що ЕМП частотою 50 Гц та індукцією 0,2 мТл інгібують Ca^{2+} -канали Т-типу впливаючи на сигнальний шлях арахідонової кислоти та лейкотрієну E_4 [4]. Скорочення і розслаблення гладеньких м'язів лежить в основі функціонування шлунково-кишкового тракту, судин, сечового міхура, матки та деяких інших важливих органів. Головним тригерним ме-

ханізмом в процесі скорочення ГМК є збільшення $[Ca^{2+}]_i$. Регуляція скоротливої активності гладеньких м'язів – складний процес, який поєднує сукупність зовнішньо- та внутрішньоклітинних сигналів. Не дивлячись на значну кількість даних про вплив ННЧ ЕМП на різні тканини та клітини, це питання з точки зору гладеньких м'язів залишається не вивченим. В попередній роботі ми показали пригнічуючу роль ЕМП частотою 8 Гц та індукцією 25 мкТл на стимульоване K^+ -деполяризацією скорочення гладенького м'язу [18]. Дослідження проводились на гладеньком'язових смужках, а оскільки вони являють собою складні структури, де піддаватись впливу ЕМП можуть як ГМК, так і нейрони, інтерстиціальні клітини Кахалія та інші структури, ми вирішили перевірити чи приймають участь безпосередньо ГМК в розвитку цього феномену.

Враховуючи все вище зазначене, **метою роботи** було дослідити вплив ЕМП частотою 8 Гц й індукцією 25 мкТл на ГМК шлунку щурів під час деполяризації плазматичної мембрани та порівняти з попередньо отриманими даними на гладеньком'язових смужках.

Матеріали і методи. В експериментах використовувались нелінійні білі щури-самці (середня вага 250 г). Тварини утримувались в стандартних умовах віварію ННЧ "Інститут біології" Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Вся робота проводилась відповідно до конвенції Ради Європи щодо захисту хребетних тварин, яких використовують у наукових цілях. Попередньо очищений від сполучних тканин і слизової оболонки шлунок в безкальцієвому розчині Кребса нарізали на фрагменти з середнім розміром 3x3 мм. Фрагменти інкубували в 2 мл розчину ферментів при температурі 37 °C впродовж 22 хв. Після інкубування, з тканинних фрагментів вилучали клітинну суспензію. Далі суспензію завантажували флуоресцентним кальцієвим зондом індо-1 [14] (на 1 мл суспензії 5 мкл індо-1 та 5 мкл флуороніка) впродовж 40 хв. Потім в суспензії розчин безкальцієвого Кребсу змінювали на розчин нормального Кребсу. В експерименті використовували нормальний розчин Кребсу (мМ): 135 NaCl, 5,9 KCl, 1,2 MgCl₂, 11,5 глюкози, 2,5 CaCl₂, 11,6 HEPES; безкальцієвий розчин Кребсу (аналогічний нормальному, але без CaCl₂); розчин ферментів (мг на 1 мл безкальцієвого Кребсу): 1 колагенази 1А, 1 соєвого інгібітору трипсину, 1 САБ, 0,5 протеази. Для реєстрації змін концентрації кальцію суспензію ГМК піддавали впливу імпульсного прямокутного ЕМП індукцією 25 мкТл та частотою 8 Гц, яке генерувалось за допомогою котушок Гельмгольца та генератора Г6-28. Вектор індукції ЕМП був паралельним вертикальній складовій геомагнітного поля. Експозиція ЕМП відбувалась впродовж 15 хвилин, під час якої безперервно вимірювали концентрацію кальцію двоховильовим спектрофлуориметричним методом [14] за допомогою спектрофлуориметра СДЛ-2 (ЛОМО).

K^+ -деполяризацію викликали додаванням в кювету з клітинною суспензією концентрованого розчину KCl в дистильованій воді (остаточно аліквота становила 1% від загального об'єму цього розчину) до кінцевої концентрації в кюветі 80 мМ. Додавання проводили через 5 хв від початку реєстрації спектру та на 15 хв завершували запис. У випадку експерименту з впливом ЕМП, додавання проводили на 5 хв експозиції, відповідно. Для порівняння показників максимальної зміни концентрації кальцію (ΔC_m) та часу досягнення максимальної концентрації (t_m) використовували t-критерій Ст'юдента. Достовірними вважали результати при $P < 0,05$.

Отримані результати представлені як середнє значення ($n = 8$) $\pm$ стандартна похибка середнього.

Результати та їх обговорення. Досліджували вплив ЕМП частотою 8 Гц та індукцією 25 мкТл на викликане K^+ -деполяризацією збільшення концентрації $[Ca^{2+}]_i$ в ГМК шлунку щурів. Було показано, що застосоване ННЧ ЕМП пригнічує зростання цього показника під час гіперкалієвої стимуляції порівняно з контролем (без ЕМП) (рис. 1). На рис. 2 продемонстровано, що максимальна зміна (по відношенню до базового рівня) $[Ca^{2+}]_i$ (ΔC_m) у випадку дії ЕМП частотою 8 Гц знижувалась на 65% порівняно з контрольним значенням за відсутності впливу поля.

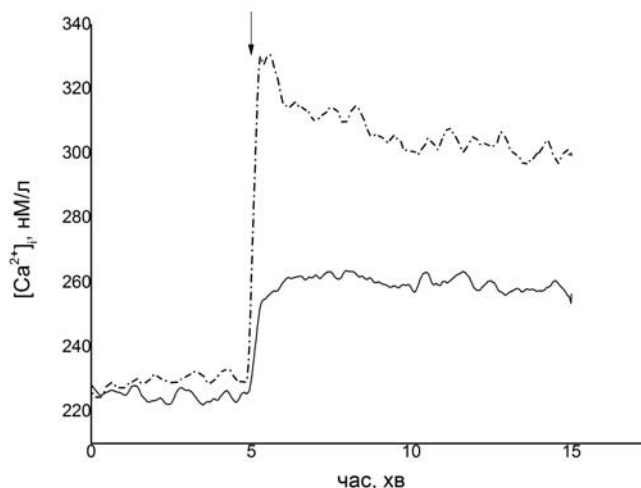


Рис. 1. Пригнічення ЕМП частотою 8 Гц зростання $[Ca^{2+}]_i$ під час гіперкалієвої деполяризації (80 мМ) суспензії міоцитів шлунку щурів

Пунктирна лінія – без ЕМП; суцільна лінія – під дією ЕМП 8 Гц; стрілка – момент додавання 80 мМ розчину KCl.

Також, як видно з рис. 1, за дії ЕМП змінювалась кінетика кальцієвої відповіді. Так, час досягнення максимальної концентрації $[Ca^{2+}]_i$ (t_m) під впливом ЕМП зрос-

тав у середньому на 18% порівняно зі значенням цього параметру за відсутності дії поля (рис. 2).

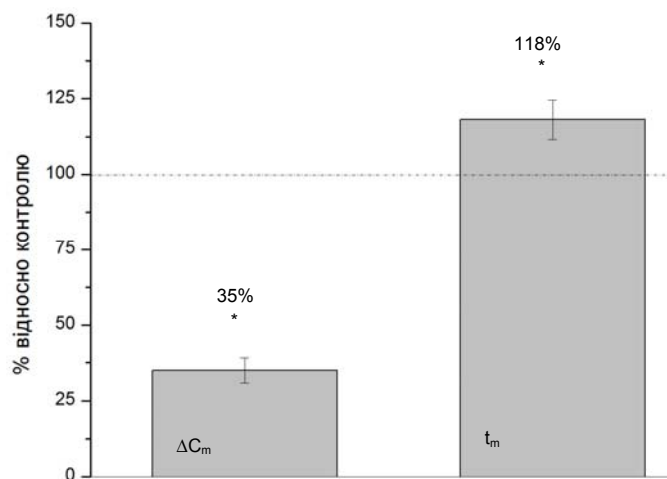


Рис. 2. Відносна зміна параметрів (γ %) під час дії ЕМП 8 Гц після додавання 80 мМ KCl

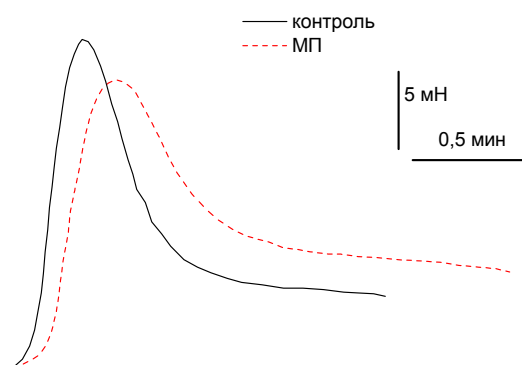
ΔC_m – максимальна зміна концентрації $[Ca^{2+}]_i$; t_m – час досягнення максимальної концентрації $[Ca^{2+}]_i$; за 100% прийнято контроль – значення відповідного параметру за відсутності дії ЕМП; * – $P < 0,05$ порівняно з контролем.

Скорочення ГМК напряму залежить від збільшення внутрішньоклітинної концентрації кальцію. Регуляція скорочення – складний процес, який умовно поділяється на три етапи. На першому етапі регуляція включає зв'язування нейротрансмітерів та гормонів з їх специфі-

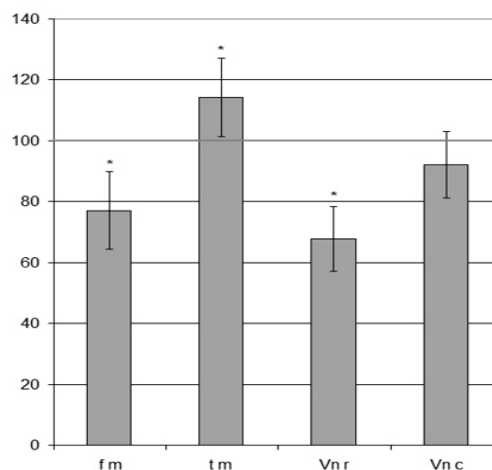
чними рецепторами. Це активує різні типи G-білків, які спряжені з різними іонними каналами та ферментами, та модулює їх активність. До цих ферментів відносять фосфоліпазу C, яка розщеплює фосфатидилінозитол з утворенням інозитол-1,4,5-трифосфату (IP_3) й діацилг-

ліцеролу, та аденілатциклазу, яка перетворює АТФ на цАМФ. Деякі рецептори, такі як рецептори до атріальних натріуретичних пептидів, безпосередньо взаємодіють з гуанілатциклазою, яка перетворює ГТФ на цГМФ [6]. На другому етапі регуляції відбуваються зміни концентрації $[Ca^{2+}]_i$. Головний внесок в підвищення внутрішньоклітинного кальцію забезпечують потенціалкеровані Ca^{2+} -канали (ПККК) [3]; також вхід цих катіонів через плазматичну мембрану здійснюється через неселективні катіонні канали та може бути наслідком роботи Na^+/Ca^{2+} -обмінника (в реверсному режимі). Крім того, вхід Ca^{2+} відбувається через канали плазматичної мембрани $Orai$, які поєднанні в єдину функціональну систему із білками сенсорами Ca^{2+} всередині саркоплазматичного ретикулуму (СР) – STIM [12]. Також рівень $[Ca^{2+}]_i$ збільшується за рахунок вивільнення кальцію з СР – головного депо внутрішньоклітинного кальцію [5]. Зменшення $[Ca^{2+}]_i$ пов'язано з депонуванням Ca^{2+} в СР та виштовхуванням його через мембранні Ca^{2+} -помпу та Na^+/Ca^{2+} -обмінник. Вторинні посередники, такі як IP_3 , діацилгліцерол, цАМФ, цГМФ та ряд інших, змінюють концентрацію $[Ca^{2+}]_i$ впливаючи на вищезазначені механізми. На останньому етапі регуляції відбувається кальцій-залежна зміна активності кінази легких ланцю-

гів міозину та безпосередньо скорочення ГМК. Підвищення зовнішньоклітинної концентрації іонів K^+ спричиняє деполяризацію плазматичної мембрани, яка призводить до активації ПККК і, як наслідок – швидкого потужного входу кальцію до міоцитів. Окрім цього, ПККК можуть підвищувати $[Ca^{2+}]_i$ опосередковано, через механізм CICR (кальцій індукованого вивільнення кальцію), що активує ріанодинові рецептори та випускає кальцій з СР у вигляді кальцієвого спарку [2, 3, 9, 11]. Також, гіперкалієва деполяризація призводить до збільшення Ca^{2+} сенситизації білків скоротливого апарату, через активацію RhoA кінази [8]. Згідно з отриманих даних, можна зробити припущення, що ЕМП частотою 50 Гц та індукцією 25 мкТл певним чином інгібує ПККК в ГМК. Як зазначалось у вступній частині, інші автори показали, що ННЧ ЕМП частотою 50 Гц та індукцією 0,2 мТл інгібували ПККК Т-типу в культурі клітин HEK293 [4]. Вони пояснюють інгібуючу дію поля через його вплив на сигнальний шлях арахідонової кислоти та лейкотрієну E_4 . Цікаво, що отримані нами результати на ГМК шлунку щурів добре узгоджуються з попередніми даними отриманими на гладеньком'язових смужках сліпої кишки щурів (рис. 3 а, б) [18].



а



б

Рис. 3. Вплив ЕМП 8 Гц на K^+ -викликане скорочення гладеньком'язових смужок сліпої кишки щурів [18]

а – зміна K^+ -викликаного (80 мМ) скорочення гладеньком'язових смужок під впливом ЕМП; б – вплив ЕМП на механокінетичні параметри скорочення (дані представлені у % відносно контрольних значень, прийнятих за 100%); f_m – максимальна сила скорочення; t_m – час досягнення максимального скорочення; V_{nc} та V_{nr} – нормована максимальна швидкість скорочення і розслаблення, відповідно; * – $P < 0,05$ порівняно з контролем.

З рис. 3 а видно, що ЕМП частотою 8 Гц та індукцією 25 мкТл пригнічувало K^+ -викликане скорочення гладеньком'язових смужок сліпої кишки щурів, а також змінювало кінетику скорочення. На рис. 3 б показано, що ЕМП викликало зменшення максимальної сили скорочення (f_m) приблизно на 23% та збільшення часу досягнення максимальної сили скорочення (t_m) приблизно на 15% порівняно з контролем за відсутності дії поля. Також на гладеньком'язових смужках вираховували механокінетичні параметри нормованої максимальної швидкості скорочення і розслаблення (V_{nc} та V_{nr}). При чому, якщо нормована максимальна швидкість скорочення вірогідно не змінилась, то швидкість розслаблення зменшилась приблизно на 33% [18]. Така подібність отриманих експериментальних даних на м'язових смужках [18] та спуспензії клітин схожих об'єктів може вказувати на безпосередню роль ГМК у виникненні феномену пригнічення K^+ -викликаних скорочень гладеньких м'язів. З

отриманих результатів можна зробити припущення, що ЕМП частотою 8 Гц змінює функціональний стан ПККК та, тим самим, пригнічує підвищення концентрації $[Ca^{2+}]_i$.

Висновки. Отримані експериментальні дані показують пригнічуючу дію електромагнітних полів частотою 8 Гц та індукцією 25 мкТл на K^+ -викликане збільшення внутрішньоклітинної концентрації кальцію в гладеньком'язових клітинах шлунка щурів. Результати, отримані на гладеньком'язових клітинах, добре узгоджуються з попередніми даними, які були отримані на гладеньком'язових смужках сліпої кишки щурів при впливі поля тих же параметрів. Це можна пояснити як безпосередню роль гладеньком'язових клітин у розвитку магнітобіологічного феномену. Однією з найбільш вірогідних мішеней дії наднизькочастотних електромагнітних полів в даному випадку можна вважати потенціалкеровані Ca^{2+} -канали, але це питання залишається відкритим і потребує наступних досліджень усіх

можливих ланок складного процесу регуляції скорочення гладеньких м'язів.

Список використаних джерел

1. Bauréus Koch C.L., Sommarin M., Persson B.R., Salford L.G., Eberhardt J.L. Interaction between weak low frequency magnetic fields and cell membranes // Bioelectromagnetics. – 2003, Sep. – Vol. 24, № 6. – P. 395-402.
2. Bers D.M. Cardiac excitation-contraction coupling // Nature. – 2002. – Vol. 415. – P. 198–205.
3. Catterall W.A. Voltage-Gated Calcium Channels // Cold Spring Harb Perspect Biol. – 2011.
4. Cui Y., Liu X., Yang T., Mei Y.-A., Hu C. Exposure to extremely low-frequency electromagnetic fields inhibits T-type calcium channels via AA/LTE₄ signaling pathway // Cell Calcium. – 2013 (в друкі).
5. Herrera G.M., Nelson M.T. Sarcoplasmic reticulum and membrane currents // Novartis Found Symp. – 2002. – Vol. 246. – P. 189-203.
6. Karakia H., Ozaki H., Hori M., Mitsui-Saito M., and other. Calcium Movements, Distribution, and Functions in Smooth Muscle // Pharmacological Reviews. – 1997. – Vol. 49, No. 2.
7. Khaki A. A., Arash Khaki D. V. M., Garachurlou S., and other. Pre and post natal exposure of 50 Hz electromagnetic fields on prostate glands of rats: an electron microscopy study // Iranian Journal of Reproductive Medicine. – 2008. – Vol. 6, No. 2. – P. 77-82.
8. Ratz P., Berg K., Urban N., Miner A. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calciumsensitizing stimulus // Am. J. Physiol.: Cell Physiol. – 2005. – Vol. 288. – P. 769-783.
9. Reuter H. Properties of two inward membrane currents in the heart // Annu Rev Physiol. – 1979. – Vol. 41. – P. 413–424.

10. Sul A.R., Park S.-N. and Suh H. Effects of Sinusoidal Electromagnetic Field on Structure and Function of Different Kinds of Cell Lines // Yonsei Medical Journal. – 2006. – Vol. 47, No. 6. – P. 852-861.

11. Tsien R.W. Calcium channels in excitable cell membranes // Annu Rev Physiol. – 1983. – Vol. 45. – P. 341–358.

12. Wang Y., Deng X., Gill D.L. Calcium signalling by STIM and Orai: intimate coupling details revealed // Sci Signal. – 2010, Nov. – Vol. 3, No. 148. – P. 42-49.

13. Бинги В.Н., Савин А.В. Физические проблемы действия слабых магнитных полей на биологические системы // УФН. – 2003. – Т. 173, № 3. – С. 265–300.

14. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. – М., 1986.

15. Мартынюк В.С., Абу Хада Р.Х. Реакция тучных клеток на действие переменных магнитных полей в условиях in vitro // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия "Биология, химия". – 2001. – Т. 14 (53), № 2. – С. 3-7.

16. Мартынюк В.С., Цейслер Ю.В., Темурьянц Н.А. Интерференция механизмов влияния слабых электромагнитных полей крайне низких частот на организм человека и животных // Геофизические процессы и биосфера. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 16-39.

17. Мельник М.І., Артеменко О.Ю., Мартинюк В.С. Вплив слабких низькочастотних електромагнітних полів на внутрішньоклітинну концентрацію кальцію гладеньком'язових клітин // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського, Серія "Біологія, хімія". – 2013. – Том 26 (65), № 2. – С. 123-132.

18. Цимбалюк О.В., Мартынюк В.С. Влияние магнитного поля крайне низкой частоты на вызванную K⁺-деполяризацией и ацетилхолином сократительную активность интестинальных гладких мышц // Фізика живого. – 2011. – Т. 19, № 1. – С. 20-25.

Надійшло до редколегії 28.01.14

М. Мельник, асп., В. Мартинюк, д-р биол. наук, А. Цимбалюк, канд. биол. наук, А. Артеменко, канд. биол. наук
КНУ имени Тараса Шевченко, Киев

ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ СВЕРХНИЗКОЙ ЧАСТОТЫ НА ВЫЗВАННОЕ ВЛИЯНИЕ K⁺ – ДЕПОЛЯРИЗАЦИЕЙ УВЕЛИЧЕНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ В ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТКАХ

Показано угнетающее действие электромагнитного поля 8 Гц 25 мкТл на K⁺ – индуцированное увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция в гладкомышечных клетках желудка крыс. Продemonстрировано увеличение времени достижения максимальной внутриклеточной концентрации кальция под воздействием электромагнитного поля. Показано, что полученные данные на гладкомышечных клетках согласуются с результатами исследований влияния электромагнитного поля тех же параметров на гладкомышечные полоски слепой кишки крыс. Полученные результаты позволяют предположить, что вероятной мишенью воздействия электромагнитного поля есть кальциевые каналы миоцитов.

Ключевые слова: электромагнитное поле, кальцевые каналы миоцитов.

M. Melnik, PhD stud., V. Martynyuk, DSc., A. Tsybalyuk, PhD., A. Artemenko, PhD.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

THE INFLUENCE OF EXTREMELY LOW-FREQUENCY ELECTROMAGNETIC FIELD ON INCREASE OF INTRACELLULAR CALCIUM CONCENTRATION IN SMOOTH MUSCLE CELLS EVOKED BY K⁺-DEPOLARIZATION

Inhibition effect of electromagnetic field 8 Hz 25 μT on K⁺-induced rise of intracellular calcium concentration in smooth muscle cells of a rats' stomach was shown. Increase of time to achievement the maximum calcium concentration under influence of the electromagnetic field was demonstrated. It was shown, that our data on smooth muscle cells are similar to data on influence of same electromagnetic field on smooth muscle fascias of a rats' caecum. Obtained data are explained role of voltage gated calcium channels in development of magnetobiological effect in smooth muscle.

Key words: electromagnetic field, myocyte calcium channels.

УДК 616. 342-002. 44(043. 3)

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

ВПЛИВ НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНОЇ ОРГАНІЧНОЇ СПОЛУКИ НА БАЗАЛЬНЕ ВИДІЛЕННЯ ШЛУНКОВОЇ СЕКРЕЦІЇ У ЩУРІВ

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

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

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

вань, а саме гастроезофагеальної рефлюксної хвороби, пептичної виразки шлунка та дванадцятипалої кишки, асоційованої або не асоційованої з *Helicobacter pylori*, та синдрому Золлінгера-Еллісона [1].

Сучасна терапія кислотозалежних захворювань заснована на використанні в клініці антисекреторних препаратів. Найбільш широко використовуються інгібітори

H^+ , K^+ -АТФази, мембранозв'язаних ферментів парієтальних клітин слизової шлунка – похідні бензимидазолу (омепразол, лансопразол, пантопразол, рабепразол, езомепразол) і блокатори H_2 -гістамінових рецепторів. Похідні бензимидазолу здатні досить швидко і ефективно знижувати активність H^+ , K^+ -АТФази, відповідно і секрецію кислоти, але при цьому володіють цілим рядом негативних побічних ефектів (морфо-функціональні порушення клітин слизової оболонки шлунка, онкогенні зміни і розвиток атрофічного гастриту, дисбалансу гормонів). Тривале застосування блокаторів призводить також до збільшення розміру, ваги і кількості парієтальних клітин, зменшення кількості головних клітин слизової оболонки шлунка і зниження синтезу мРНК пепсиногену. Основним негативним ефектом застосування інгібіторів протонної помпи є розвиток онкогенних процесів у СОШ [2].

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

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

Групи тварин:

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

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

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

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

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

Всі кількісні та якісні показники, зареєстровані в журналі досліджень підлягали статистичній обробці за допомогою пакету програм Statistica 8.0. Отримані результати досліджень перевіряли на нормальність розподілу за допомогою W тесту Шапіро-Вілка. Оскільки дані були параметричні, то для їх порівняння використовували t-критерій Стюдента для незалежних вибірок, рівень значущості становив $p < 0,05$. Дані представляли у вигляді середнього значення (M) і помилки середнього (m).

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

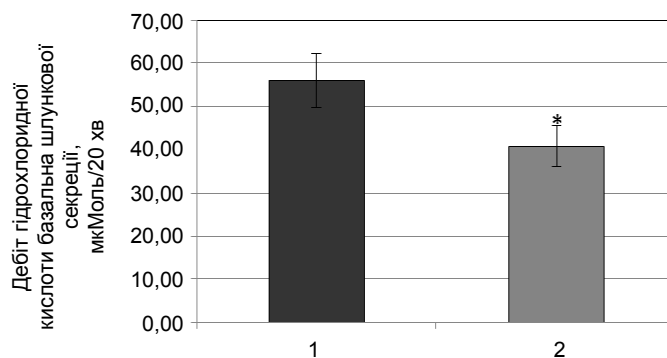


Рис. 1. Базальна секреція гідрохлоридної кислоти в шлунку щурів за умов введення низькомолекулярної органічної сполуки КУД 259 (1мг/кг, в/о) ($M \pm m$, $n = 20$ у кожній групі)

1 – контроль, 2 – КУД 259.

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

Базальний рівень протеолітичного ферменту пепсину в шлунку щурів становив 2685 ± 210 мкг/120 хв. При

введенні НМОС дебіт пепсину значущо зменшився на 38% ($p < 0,05$) (рис.2).

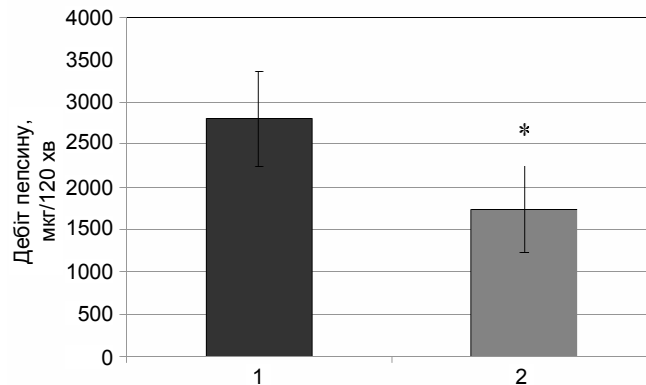


Рис. 2. Базальна секреція пепсину в шлунку щурів за умов введення низькомолекулярної органічної сполуки КУД 259 (1мг/кг, в/о) ($M \pm m$, $n = 20$ у кожній групі)

1 – контроль, 2 – КУД 259.

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

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

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

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

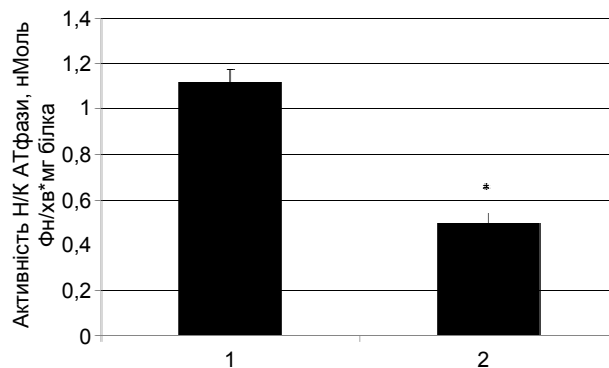


Рис. 3. Базальна активність H^+, K^+ -АТФази в шлунку щурів за умов введення низькомолекулярної органічної сполуки КУД 259 (1мг/кг, в/о) ($M \pm m$, $n = 20$ у кожній групі)

1. контроль, 2. КУД 259.

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

Висновки. Отримані результати свідчать, що досліджувана сполука ефективно зменшує базальну секрецію гідрохлоридної кислоти, дебіт пепсину, а також знижує активність H^+, K^+ -АТФази. Наведені ефекти є одним з механізмів антивиразкової дії НМОС. Отже, досліджувана сполука є перспективною для подальшого вивчення механізмів її дії, а також для розробки і впровадження антивиразковим засобом.

Список використаних джерел

1. Передерий В.Г. Современные представления о лечении язвенной болезни с точки зрения принципов доказательной медицины / В.Г. Передерий, С.М. Ткач, О.В. Швец // Сучасна гастроентерологія. – 2002. – № 3. – С. 18-20.
2. A model for integrative study of human gastric acid secretion / I.M. Joseph [et.al] // J. Appl. Physiol. – 2003. – Vol. 94. – № 4. – P. 1602-1618.

3. Использование новых низкомолекулярных органических соединений в профилактике вызванных аспирином эрозивно-язвенных поражений у крыс / К.В. Кудрявцев [и др.] // Проблемы экологической та медико-генетической та клінічної імунології. – 2012. – № 5(113). – С.458-465.

4. Скринінг синтезованих низькомолекулярних органічних сполук щодо їх ефективності в лікуванні виразок на лабораторних тваринах / О.П. Гаділія [та ін.] // Світ медицини та біології. – 2013. – № 3(39). – С.16-20.

5. Скринінг синтезованих низькомолекулярних органічних сполук щодо їх ефективності в профілактиці уражень слизової оболонки шлунка / А.О. Маркевич [та ін.] // Вісник проблем біології та медицини. – 2013. – № 3, том 1 (102). – С.116-121.

6. Bittencourt P.F. Gastroduodenal peptic ulcer and Helicobacter pylori infection in children and adolescents / P.F. Bittencourt [et.al] // J. Pediatr. – 2006. – № 82. – P.325-334.

7. ЗУ от 21.02.2006 № 3447-IV "Про заштиту животних от жестокого обращения": 2006.

8. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. – Washington DC: National Academy Press, 1996.

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

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

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

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

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

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

Надійшла до редколегії 10.04.14

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

ВЛИЯНИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ОРГАНИЧЕСКОГО СОЕДИНЕНИЯ НА БАЗАЛЬНОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ ЖЕЛУДОЧНОЙ СЕКРЕЦИИ У КРЫС

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

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

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

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

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

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

УДК 612.015.1:577.152.08

В. Заєць, канд. біол. наук, В. Кітам, пров. інж., О. Максимчук, канд. біол. наук, І. Росохацька, пров. інж., М. Чашин, канд. біол. наук Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ

ГЕТЕРОЛОГІЧНА КОЕКСПРЕСІЯ ФУНКЦІОНАЛЬНО-АКТИВНИХ ЦИТОХРОМУ P450 2E1 ТА NADPH-ЦИТОХРОМ P450 РЕДУКТАЗИ В *ESCHERICHIA COLI*

Створено біцистронну плазмідну конструкцію з клонованими кДНК цитохрому P450 2E1 та NADPH-цитохром P450 редуктази. В трансформованих плазмідною конструкцією клітинах *Escherichia coli* отримано експресію каталітично-активних рекомбінантних білків.

Ключові слова: біцистронна плазмідна конструкція, цитохром P450, NADPH-цитохром P450 редуктаза.

Вступ. Мікросомальний цитохром P450 2E1 (CYP2E1) належить до надродини ферментів цитохрому P450 – гемтіолатних монооксигеназ, які здійснюють першу фазу метаболічного перетворення більшості ксенобіотиків, що надходять до організму ссавців. В ендогенному метаболізмі цитохром P450 бере участь у біотрансформації стероїдів, вітамінів, простагладинів, лейкотриєнів та інших сигнальних молекул [1]. Разом з NADPH-цитохром P450 редуктазою – оксидоредуктазою (oxidoreductase, OR), що поставляє необхідні для каталітичної активності ферменту електрони, цитохром P450 входить до складу монооксигеназної системи, яка функціонує в мікосомі мембран ендоплазматичного ретикулу клітин печінки і багатьох інших органів [2].

CYP2E1 є однією з основних ізоформ цитохрому P450, які залучені до метаболізму екзогенних хімічних сполук. Дана ізоформа здійснює біотрансформацію біля 6% всіх ксенобіотиків, що нейтралізуються в печінці. CYP2E1 метаболізує переважно невеликі гідрофобні хімічні сполуки, до яких належать важливі в токсикологічному відношенні речовини: етанол, бензол, хлороформ, чотирихлористий вуглець та інші галогеномісні вуглеводні.

Ефективними субстратами ферменту є лікарські препарати (ацетамінофен, хлорзоксазон і галотан), канцерогени (нітрозозаміни і азосполуки), а також багато прокарциногенів і протоксинів. Встановлено роль

CYP2E1 в утворенні пошкоджуючих клітинні структури реакційних форм кисню, гідроксильних радикалів і гідроперексидів, що генеруються як при метаболізмі ксенобіотиків, так і в холостому каталітичному циклі ферменту [1,3]. Показано також участь ферменту в патогенезі цукрового діабету, алкогольному ушкодженні печінки та ін. Таким чином, вивчення структурно – функціональних і біохімічних характеристик цитохрому P450 2E1 необхідно для з'ясування фізіологічної ролі даного ферменту, його участі у процесах патогенезу, а також для фармакологічних та токсикологічних досліджень.

Для дослідження структурних і біохімічних властивостей цитохромів P450 ссавців, зокрема вивчення механізмів каталізу здійснюваних ними ферментативних реакцій, а також з'ясування їх ролі в біотрансформації ксенобіотиків необхідні значні кількості гомогенних ізоформ білку. На даний час для їх отримання створено декілька гетерологічних експресійних систем, заснованих на використанні клітинних ліній ссавців, клітин дріжджів і бактерій, а також бакуловірусних систем на основі клітинних ліній комах. Серед них найбільш часто використовується бактеріальна система *E.coli*, завдяки добре вивченим генетичним властивостям бактерій, легкості проведення мутагенезу структурної послідовності клонованих білків, простоті виділення і очищення ферментів, а також низькій вартості культуральних се-

редовищ. Більш того, вихід експресованих цитохромів в *E. coli* набагато вищий, ніж в інших системах [4]. Для ефективної експресії ізоформ цитохрому P450 ссавців в *E. coli* в більшості випадків необхідна модифікація нуклеотидної послідовності, що кодує N-кінцеву частину білків. Вона полягає в делеції перших 3-20 амінокислот і заміні другої амінокислоти на аланін, а також у збільшенні в наступних декількох кодонах за рахунок незначущих заміни вмісту АТ, що знижує потенціал вторинної структури синтезованих мРНК до їх зв'язування з рибосомою. Численні дослідження показують, що ці зміни не впливають на каталітичні властивості рекомбінантних цитохромів та їх специфічність [4]. Завдяки таким модифікаціям в системі *E. coli* отримано більшість ізоформ рекомбінантного цитохрому P450 ссавців, що дало можливість дослідити їх структурні та каталітичні властивості *in vitro*. В той же час, відсутність у *E. coli* власного цитохрому P450 дозволяє досліджувати властивості ферментів *in vivo* безпосередньо в клітинах бактерій при клонуванні в них всіх компонентів монооксигеназної системи.

Метою роботи було створення в клітинах *E. coli* функціональної монооксигеназної системи "Цитохром P450 2E1 – NADPH-цитохром P450 редуктази" для вивчення каталітичних та структурно-функціональних властивостей CYP2E1 *in vivo* та *in vitro*.

Матеріали і методи. Для відбору рекомбінантних клонів та експресії кДНК генів CYP2E1 і OR використовували генноінженерний штам *E. coli* DH5 α (*supE44* Δ *lacU169* (ϕ 80 *lacZ*M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*). Ампліфікацію кодувочної послідовності кДНК гена OR проводили методом ПЛР на основі плазмиди pIN4OR, люб'язно наданої доктором Д. Портером (Division of Pharmaceutical Sciences, University of Kentucky, USA), за допомогою прямого F-OR 5'-ctagtaagcttcggaattcactggaactctagataaacgag – 3' і зворотнього R-OR 5'-ctagtaagcttcctagctccacacatctagtgagtagc – 3' праймерів. ПЛР – продукти розділяли методом електрофорезу в 1% агарозному гелі. Для виділення необхідного фрагменту з гелю застосовували набір реагентів AxyPrepTM DNA Gel Extraction Kit фірми "Axygen Biosciences". Аналіз орієнтації клонованої кДНК гена OR в плазміді pCW/2E1/OR проводили за допомогою ПЛР, з використанням прямого F-2E1A298 5' – ggccgacctgttcgctcgsggggacagagac – 3' і зворотнього R-OR праймерів. Полімеразні реакції проводили в буферній суміші, що містить 2 мМ хлориду магнію, 200 мкМ кожного dNTP, 1 мкМ праймерів, 50 нг матриці і 0,5 U Pfu ДНК-полімерази фірми "Прайтех" (Білорусь). Первинну денатурацію матриці проводили протягом 3 хв. при 94 °C. Наступні 30 циклів реакції склалися з етапів денатурації при 94 °C і віджигу при 59 °C протягом 30 сек кожний та елонгації протягом 3 хв при 72 °C. Останній етап синтезу проводили протягом 5 хв при 72 °C. Компетентні клітини отримували згідно методу [5]. Всі процедури з клонування кДНК гена OR – рестрикцію, обробку вектора лужною фосфатазою, лігування, трансформацію і виділення плазмідної ДНК – проводили за допомогою ферментів фірми "Fermentas" (Литва) згідно методик [6], а також інструкцій фірми. Для клонування використовували вектор pCW/2E1, люб'язно наданий доктором Ф. Генгеріхом (Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, USA). Вирощування культури *E. coli* DH5 α та індукцію експресії рекомбінантних білків CYP2E1 і NADPH-цитохром P450 редуктази в бактеріальній культурі проводили згідно [7] в середовищі TB, що містило 4-метилпіразол, ампіцилін, мікроелементи та амінолевуленову кислоту. Після відмивання клітин до них додавали у співвідношенні 1:1 (m/v) лізуючий 20 мМ калій-фосфатний буфер (pH 7,4), що

містив 0,5 М KCl, 10 мМ β -меркаптоетанол і 0,02% емульген 913. Лізис клітин проводили методом ультразвукової обробки, отриманий клітинний лізат зберігали при -80 °C. Кількість синтезованого рекомбінантного цитохрому P450 2E1 у клітинах *E. coli* оцінювали методом диференціальної спектрофотометрії, використовуючи коефіцієнт екстинції $E_{450-490} = 91 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [8]. Спектри реєстрували в 100 мМ калій-фосфатному буфері (pH 7,4), що містив 20% гліцерин (v/v) і 0,2% емульген 913 (w/v). Каталітичну активність цитохрому P450 2E1 визначали в реакції гідроксидування п-нітрофенолу до 4-нітрокатехолу [9]. Реакцію гідроксидування проводили протягом 10 хв. при 37 °C в 100 мМ калій-фосфатному буфері (pH 7,4) із 1мМ аскорбінової кислоти, 3 мкМ НАДФН, 25 мкл лецитину та 200 мкМ п-нітрофенолу. У реакційну суміш додавали клітинний лізат *E. coli*, що містив 2 нМ рекомбінантного цитохрому P450 2E1. Кількість утвореного продукту реакції гідроксидування 4-нітрокатехолу визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 535 нм.

Результати та їх обговорення. Одним з недоліків *E. coli*, як гетерологічної системи для синтезу ізоформ цитохрому P450, є відсутність у бактерій аналогу NADPH-цитохром P450 редуктази, яка здійснює у ссавців перенесення електронів від NADPH до цитохрому P450, що необхідно для його ферментативної активності. Відсутність ефективного переносу електронів до рекомбінантних цитохромів P450 обмежує можливість використання бактеріальної культури в біотехнологічних процесах. Для створення функціональних монооксигеназних систем в бактеріях було розроблено декілька методичних підходів, заснованих на коекспресії в клітинах *E. coli* каталітично активних цитохромів P450 і NADPH-P450 редуктази. Більшість таких систем створено на основі вектору pCWOri+ [10, 12-15]. Клонування в цій плазміді кДНК ізоформ цитохрому P450 і NADPH-цитохром P450 редуктази здійснюється під спільним (біцистронний варіант) [4, 10-14] або окремими промоторами [13, 15]. Також можливе клонування кДНК цих ферментів в двох різних плазмідах [13]. Експресовані таким чином цитохроми і NADPH-P450 редуктази були каталітично активні, що забезпечувало функціонування в бактеріальних клітинах монооксигеназної системи. При цьому монооксигеназні системи були найбільш ефективними при застосуванні біцистронного варіанту клонування [10]. Виходячи з цього для створення функціональної цитохром P450 2E1 монооксигеназної системи в *E. coli* було використано біцистронний варіант клонування у векторі pCWOri+ кДНК CYP2E1 людини і NADPH-цитохром P450 редуктази щура. Поєднана трансляція цих ферментів з однієї молекули мРНК має забезпечувати еквімолярне або близьке до нього їх кількісне співвідношення в бактеріальній клітині. Це повинно у повній мірі забезпечити каталітичну активність цитохрому [10]. Як базовий вектор була використана плазміда pCW/2E1 – вектор pCWOri+ з клонваною за сайтами рестрикції NdeI і HindIII модифікованою кДНК CYP2E1 людини [7]. Для створення біцистронної конструкції була використана похідна плазмиди pIN110mpA3 – pIN4OR, яка містить повну послідовність кДНК NADPH-цитохром P450 редуктази щура, зливу з сигнальною послідовністю мембранного білка *E. coli* OmpA, що значно стабілізує рекомбінантну редуктазу та збільшує її вихід в бактеріальних клітинах [12]. Аналіз нуклеотидної послідовності pIN4OR на наявність рестриктних сайтів показав, що в послідовності кДНК NADPH-цитохром P450 редуктази відсутній сайт рестриктази HindIII, по якому в плазміді pCW/2E1 клонована кДНК CYP2E1. Вбудовування в pCW/2E1/OR за цим

сайтом рестрикції кДНК NADPH-цитохром P450 редуктази безпосередньо після кДНК цитохрому P450 2E1 надало можливість створення біцистронної плазмідної конструкції. Для отримання кДНК гена NADPH-цитохром P450 редуктази була проведена специфічна ПЛР на матриці плазмиди pIN4OR. Для цього були синтезовані прямий і зворотній олігонуклеотидні праймери F-OR і R-OR, які обмежують нуклеотидну послідовність, що кодує фермент, сигнальний пептид OmpA та сайт зв'язування з рибосомою. Для вбудовування у pCW2E1 в

обидва праймери були введені сайти рестриктази HindIII. Після ПЛР синтезу амплікони кДНК NADPH – P450 редуктази клонували за сайтами HindIII у плазмиду pCW/2E1. В результаті була отримана біцистронна плазмідна конструкція pCW/2E1/OR, в якій кДНК цитохрому P450 2E1 і NADPH – цитохром P450 редуктази розташовані послідовно під спільним *taq* промотором плазмиди pCW/2E1. Схема клонування NADPH-P450 редуктази в векторі pCW/2E1/OR наведена на рис. 1.

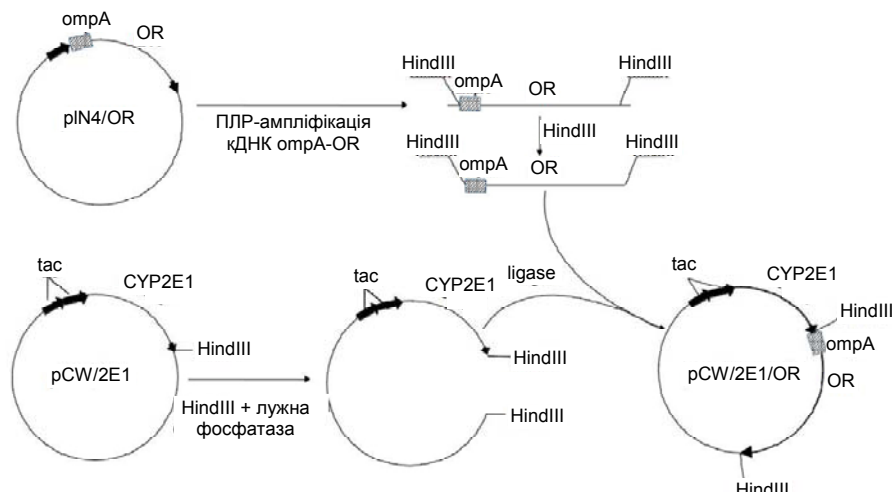


Рис.1. Схема клонування кДНК NADPH-P450 редуктази в векторі pCW/2E1/OR

Наявність клонованої кДНК NADPH-цитохром P450 редуктази та її копійність в плазмиді pCW/2E1/OR визначали за розміром плазмідних ДНК, виділених з трансформованих плазмидою клітин *E.coli* DH5α, і ПЛР аналізом плазмідних ДНК цих клітин з використанням в реакціях специфічних до послідовності редуктази праймерів F-OR і R-OR. З рис. 2 видно, що як ампліфікований на матриці плазмиди pIN4OR, так і клоновані в плазмиді pCW/2E1/OR фрагменти кДНК NADPH-цитохром P450 редуктази досліджуваних клонів однакові за розміром і складають ~ 2300 п.н., що відповідає довжині кДНК редуктази разом із сигнальною послідовністю OmpA та сайтом зв'язування з рибосомою.

Орієнтацію клонованої кДНК NADPH-цитохром P450 редуктази в плазмиді відібраних клонів також оцінювали методом ПЛР-аналізу. Для цього використовували специфічні до послідовності цитохрому та редуктази прямий F-2E1A298 та зворотній R-OR праймери, які обмежують на плазмиді pCW/2E1/OR фрагмент цитохрому довжиною ~ 600 п.н. та повну послідовність редуктазного фрагменту довжиною ~ 2300 п.н. При прямій орієнтації кДНК NADPH-цитохром P450 редуктази на плазмиді в реакції ПЛР має утворюватися амплікон довжиною ~ 2900 п.н. Розміри синтезованих на матриці плазмиди ПЛР фрагментів (рис.2) свідчать, що кДНК NADPH-цитохром P450 редуктази вбудована в прямій орієнтації до послідовності кДНК цитохрому P450 2E1.

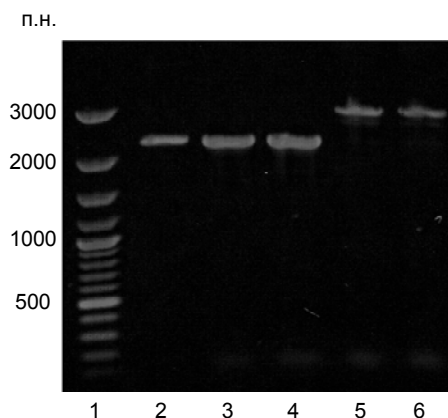


Рис.2. ПЛР амплікони кДНК NADPH-цитохром P450 редуктази

1 – ДНК маркер (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder, "Fermentas", Лутвеа). 2 – ПЛР амплікон кДНК NADPH-цитохром P450 редуктази, синтезований на матриці плазмиди pIN4OR (праймери F-OR і R-OR). 3, 4 – ПЛР амплікони кДНК NADPH-цитохром P450 редуктази, синтезовані на матриці плазмиди pCW/2E1/OR (праймери F-OR і R-OR). 5, 6 – ПЛР амплікони кДНК NADPH-цитохром P450 редуктази, синтезовані на матриці плазмиди pCW/2E1/OR (праймер F-2E1A298 і R-OR).

За допомогою диференціальної спектрофотометрії було встановлено, що така плазмідна конструкція забезпечує синтез в клітинах *E. coli* DH5α до 120 нМ/л рекомбінантного цитохрому. Для дослідження його каталітичної активності було проведено реакцію гідроксилювання специфічного для CYP2E1 субстрату –

п-нітрофенолу. Показано, що в результаті проведеної реакції утворюється значна кількість 4-нітрокатехолу (рис.3). Це свідчить про експресію рекомбінантних каталітично-активних ферментів CYP2E1 і NADPH-цитохром P450 редуктази та функціонування в *E.coli* ефективної монооксигеназної системи.

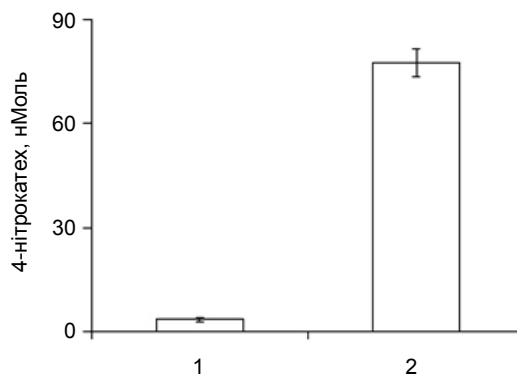


Рис.3. Утворення 4-нітрокатехолу в реакції гідроксилювання п-нітрофенолу в лізатах культури *E. coli* DH5α, трансформованих плазмідами pCW/2E1 (1) і pCW/2E1/OR (2)

Висновки. В результаті проведеної роботи створено експресуючу плазмідну конструкцію pCW/2E1/OR, в якій клоновано в біцистронному варіанті кДНК цитохрому P450 2E1 людини та NADPH-цитохром P450 редуктази щура. Створена конструкція забезпечує експресію каталітично-активних ферментів, які утворюють в клітинах *E.coli* функціональну монооксигеназну систему.

Список використаних джерел

1. Enzyme systems that metabolizes drugs and other xenobiotics // edited by C. Ioannides. – Chichester: John Wiley and Sons, Ltd., UK, 2001.
2. Omura T. // J. Biochem. – 2010. – Vol.147. – P. 297–306.
3. Пентюк О.О., Качула С.О., Герич О.Х. цитохром P450 2E1. // Укр. біохім. журн. – 2004. – Т. 76. – С.16–28.
4. Yun C.-H., Yim S.-K., Kim D.-H. et al. // Curr. Drug Metab. – 2006. – Vol. 7. – P. 411–429.
5. Nishimura A., Morita M., Nishimura Y. et al. // Nucl. Acids Res. – 1990. – Vol.18. – P. 6169.
6. Sambrook J., Fritsch T., Manniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. – 2th ed. – N York: Cold Spring Harbor, 1989.
7. Gillam E.M.J., Guo Z. and Guengerich F.P. // Arch. Biochem. Biophys. – 1994. – Vol. 312. – P. 59–66.
8. Schenkman J.B. and Jansson I. // Methods Mol. Biol. – 2006. – Vol. 320. – P.11–18.
9. Chang T.K.H., Crespi C.L. and Waxman D.J. // Methods Mol. Biol. – 2006. – Vol. 320. – P. 127–131.
10. Parikh A., Gillam E.M.J., and Guengerich F.P. // Nature Biotechnology. – 1997. – Vol.15. – P. 784–788.
11. Dong J. and Porter T.D. // Arch. Biochem. Biophys. – 1996. – Vol. 327. – P. 254–259.
12. Porter T.D. and Chang S. // Drug Metab. Rev. – 1999. – Vol. 31. – P. 159–174.
13. Boye S.L., Kerdpin O., Elliot D.G. et al. // Xenobiotica. – 2004. – Vol. 34. – P. 49–60.
14. Shet M.S., Fisher C.W., Arlotto M.P. et al. // Arch. Biochem. Biophys. – 1994. – Vol. 311. – P. 402–417.
15. Iwata H., Fujita K., Kushida H., Syzuki A. et al. // Biochemical Pharmacology. – 1998. – Vol. 55. – P. 1315–1325.

Надійшла до редколегії 25.02.14

В. Заец, канд. биол. наук, В. Китам, пров. инж., А. Максимчук, канд. биол. наук, И. Росохацкая, пров. инж., М. Чашин, канд. биол. наук
Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев

ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКАЯ КОЭКСПРЕССИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНО-АКТИВНЫХ ЦИТОХРОМОВ P450 2E1 И NADPH – ЦИТОХРОМ P450 РЕДУКТАЗЫ В ESCHERICHIA COLI

Создано бицистронную плазмидную конструкцию с клонированными кДНК цитохрома P450 2E1 и NADPH – цитохром P450 редуктазы. В трансформированных плазмидной конструкцией клетках *Escherichia coli* получено экспрессию каталитически – активных рекомбинантных белков.

Ключевые слова: бицистронная плазмидная конструкция, цитохром P450, NADPH – цитохром P450 редуктаза.

V.Zaets, PhD., V. Kitam, ing., O. Maksimchuk, PhD., I. Rosohatskaya, ing., M. Chaschin, PhD.
Institute of Molecular Biology and Genetics National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

HETEROLOGICAL COEXPRESSION OF FUNCTIONAL-ACTIVE CYTOCHROMES P450 2E1 AND NADPH-CYTOCHROME P450 REDUCTASE IN *E. COLI*

The bicistronic plasmid construction with cloned cDNAs of the cytochrome P450 2E1 and NADPH-cytochrome P450 reductase has been created. Expression of catalytical active recombinant proteins has been shown in *Escherichia coli* cells transformed with plasmid construction.

Key words: bicistronic plasmid construction, cytochrome P450, NADPH-cytochrome P450.

УДК 632.38:578.863.1

Т. Бова, канд. біол. наук, Ю. Дмитрук, наук. співроб., О. Пиріг, мол. наук. співроб.,
В. Шепелевич, канд. біол. наук, Л. Авдєєва, д-р мед. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ВПЛИВ МІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ НА ШКОДОЧИННІСТЬ ВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ НА ПОСАДКАХ КАРТОПЛІ В УМОВАХ ПОЛІССЯ УКРАЇНИ

Встановлено зниження шкодочинності вірусних інфекцій на посадках картоплі сортів Невська, Сувенір Чернігівський, Жуківський ранній, Пікассо при застосуванні мікробних препаратів гаупсин та бактопасльон. Відмічено підвищення врожайності картоплі та позитивний вплив вказаних препаратів на функціонування фотосинтетичного апарату рослин картоплі у фазі цвітіння-бутонізації порівняно з контролем.

Ключові слова: фітопатогенні віруси, шкодочинність вірусних інфекцій, гаупсин, бактопасльон.

Вступ. Захист рослин від вірусних інфекцій є важливою ланкою сучасного землеробства. Для прийняття рішення щодо заходів боротьби з вірусними захворюваннями картоплі необхідно володіти знаннями стосовно взаємовідносин вірусів з навколишнім середовищем. Конкретні заходи боротьби для кожної комбінації "вірус – хазяїн" залежать, крім економічних факторів (цінність даної культури, рослини, розміру можливих втрат) також від екологічної "стратегії виживання" вірусів у доквіллі, яка забезпечує "виживання" фітопатогенних вірусів [1]. Основою захисту рослин від вірусних хвороб є рання діагностика інфекції, ефективний контроль матеріалу на всіх етапах вирощування, завчасне прогнозування поширення захворювань.

Серед чисельних хвороб рослин вірусні інфекції є важливим біотичним фактором зниження продуктивності культур, товарності та якості продукції [2, 3, 4]. Значною мірою піддаються вірусному ураженню сільськогосподарські культури, що розмножуються вегетативно, зокрема, картопля. Середнє зниження врожайності картоплі внаслідок вірусних хвороб в умовах Полісся України становить 30-40%, сягаючи 38-70 % – за ураження Y-вірусом картоплі, 80-90 % – вірусом скручування листя картоплі, до 30 % – за ураження вірусом аукуба мозаїки картоплі. Зниження врожайності залежить здебільшого від видів і штамів збудників, поширених у даній ґрунтово-кліматичній зоні, генетично зумовленої сортової чутливості до інфекції та умов вирощування [5]. Біопрепарат гаупсин, створений на основі двох штамів *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* УКМ В-111 і УКМ В-306 і захищений патентом України [6], має поряд з антифунгальною і антибактеріальною значну ентомопатогенну активність, що забезпечує його широке використання проти шкідників і збудників захворювань рослин. В той же час вплив на збудників вірусних захворювань досі був досліджений лише щодо вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ). Зокрема, було показано, що він гальмував на 73-100 % ВТМ на рослинах дурману (*Datura stramonium*) та тютюну (*Nicotiana tabacum*) [7]. Бактеріальний препарат бактопасльон використовують для підвищення врожайності картоплі. Бактерії, які є діючою основою препарату, вирощуються у середовищі з лектином картоплі, що сприяє їх більш інтенсивному росту, активному продукуванню фітогормонів, підвищенню азотфіксувальної активності та їх приживаності у ризосферному ґрунті рослин. Препарат стимулює ріст і розвиток рослин [8].

Метою роботи було вивчення впливу мікробних препаратів на шкодочинність інфекційних хвороб картоплі 4 сортів: Невська, Сувенір Чернігівський, Жуківський ранній, Пікассо.

Матеріали і методи. Інсектофунгіцидний біопрепарат гаупсин було отримано у відділі антибіотиків Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАНУ. Штами *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* УКМ В-111 і УКМ В-306 сумісно вирощували в умовах аерації на качалках (220 об/хв) на промисловому органі-

мінеральному середовищі з мелясою і кукурудзяним екстрактом [6]. Культивування проводили протягом 72 годин за температури 27°C. Вихідний титр препарату становив $2,25 \times 10^9$ колонієутворюючих одиниць (КУО). 500 мл препарату розводили у 20 л води з розрахунку на 1 т насіння, обробляли бульби картоплі рівномірним зволоженням. Мікробний препарат бактопасльон, розроблений в Інституті сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН, одержували культивуванням консорціуму бактерій *A. vinelandii* і *A. chroococcum* у рідкому живильному середовищі на основі горохового відвару, яке додатково містило 0,001 г/л лектину бульб картоплі. Чисельність бактеріальних клітин у виготовленому препараті була 1×10^9 КУО. Бульби рівномірно зволожували перед садінням розчином, який містив 0,2 л бактеріальної суспензії, 1,0 л меляси та 18,8 л води, із розрахунку на 1,0 т картоплі [8]. Польовий дрібно-ділянковий дослід з вивчення впливу мікробних препаратів на шкодочинність вірусних інфекцій картоплі проведено на дослідному полі Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН на площі 0,4 га, на дерново-підзолистому ґрунті (рН_{сол.} 5,2; вміст гумусу – 3,01 %; азот, що легко гідролізується – 109 мг на 1 кг ґрунту; вміст рухомих форм фосфору (P₂O₅) – 168 мг на 1 кг ґрунту; вміст обмінного калію (K₂O) ґрунту – 58 мг на 1 кг ґрунту). Норма садіння бульб в умовах Полісся становила 50 тис. шт./га при довжині міжряддя 70 см, попередник – вико-вівсяна сумішка. Під картоплю вносили оптимальну норму мінеральних добрив – 450 кг/га у фізичній вазі, що становить 65 кг/га діючої речовини. Для боротьби з бур'янами застосовували препарат "Прометрин" у дозі 2 кг/га.

Схема дослідів:

1. Контроль (обробка бульб водою перед посадкою).
2. Передсадивна обробка бульб гаупсином.
3. Передсадивна обробка бульб бактопасльоном.

В досліді було використано вихідний матеріал 4 сортів картоплі: Невська, Сувенір Чернігівський, Жуківський ранній, Пікассо. Відбір зразків для лабораторного аналізу проводили у фазу бутонізації-цвітіння рослин картоплі за методом проб по діагоналі поля згідно існуючих методичних рекомендацій [9]. Для вірусологічного дослідження з основних стебел куща відбирали 3-4 листки верхнього та середнього ярусів, які зберігали при температурі 4 °C. Для виявлення та ідентифікації вірусів картоплі застосовували методи візуальної та серологічної діагностики, електронної мікроскопії нативних препаратів [10]. Для проведення серологічних аналізів використовували антисироватки для виявлення вірусів картоплі, одержані у лабораторії вірусології Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН. Нативні препарати для електронної мікроскопії готували методом негативного контрастування, модифікованим у лабораторії вірусології ІСМАВ [11]. Досліджували препарати в електронних мікроскопах Tesla-540 (Чехія) та EM-125 (Суми, Украї-

на) при інструментальному збільшенні 20-22 тис. Аналіз впливу М-вірусу картоплі на формування фотосинтетичного апарату рослин проводили на основі визначення вмісту хлорофілу *a* і *b* в листках уражених рослин картоплі [12]. Для визначення суми хлорофілів *a* і *b* використовували 96 % розчин етилового спирту. Концентрацію пігментів розраховували за рівнянням:

$$C_{\text{хл. a}} = 13,70 D_{665} - 5,76 D_{649};$$

$$C_{\text{хл. b}} = 25,80 D_{649} - 7,60 D_{665};$$

де $C_{\text{хл. a}}$ і $C_{\text{хл. b}}$ — відповідно концентрації хлорофілів *a* і *b*, мг/дм³; D — експериментально одержані величини оптичної густини при відповідних довжинах хвиль.

Облік урожаю проводили суцільно поділянковим методом, дані обробляли за методом дисперсійного аналізу за Б.А. Доспеховим [13].

Результати та їх обговорення. За результатами обстеження насаджень картоплі виявлено М-вірус картоплі у моноінфекції на сортах Невська, Сувенір Чернігівський, Жуківський ранній та у складі комплексних інфекцій з М-, S- та Y-вірусами картоплі на рослинах сорту Пікассо (рис. 1).



Рис. 1 Симптоми плямистої мозаїки на рослинах картоплі сорту Пікассо

У польових умовах за ураження М-вірусом картоплі спостерігали латентний перебіг інфекції та розвиток симптомів захворювання у вигляді плямистої мозаїки, залежно від складу комплексу вірусів-збудників. Результати лабораторних аналізів показують: в розсадниках розмноження спостерігається активне накопичення вірусної інфекції, ураженість сортів мозаїчними вірусами картоплі становить 100 %; серед виявлених та ідентифікованих патогенів переважає М-вірус картоплі (рис. 2). Ураженість матеріалу в розсадниках відтворення оздоровленого матеріалу може означати як присутність вірусів у використаних для розмноження лініях пробіркових рослин, так і присутність в рослинах слабopatогенних штамів або проявлення стійкості сорту, що зумовлює безсимптомне протікання інфекції.

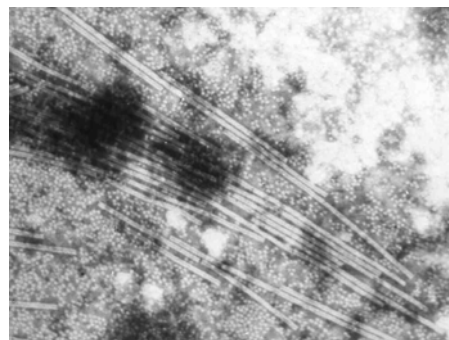


Рис. 2. Електроннограма М-вірусу картоплі, ізолюваного з картоплі сорту Сувенір Чернігівський

Процес взаємодії фітопатогенних вірусів з рослинами спричиняє порушення функціональної активності рослин-хазяїв, у тому числі структурно-функціональну перебудову компонентів ураженої клітини, характер і ступінь якої визначається властивостями вірусу та особливостями патогенезу. Розвиток вірусного патогенезу пов'язаний зі зміною структури і функцій фотосинтетичного апарату рослин. Однією з причин зниження вмісту хлорофілу при вірусній інфекції є руйнування структури гран, у які хлорофіл входить як складова частина [14]. Морфологічні зміни пластид відбиваються на процесі фотосинтезу. Фотосинтетичний апарат рослин є досить чутливим до дії різноманітних стресових факторів, в тому числі вірусної інфекції, як фактора біотичної природи. Показано, що віруси мозаїчної групи як мішень патогенної дії використовують хлоропласти, порушуючи фотосинтетичну функцію рослинної клітини. При розвитку патологічних процесів, спричинених вірусами, порушується ультраструктура пігментного апарату хлоропластів, змінюється кількість пігментів світлозбираючих комплексів, а в подальшому зменшується кількість реакційних центрів [15]. Ці структурні та функціональні зміни в організації пігментного апарату призводять до зменшення ефективності використання світлової енергії, що пояснює шкідливість вірусів для сільськогосподарських рослин. Тому за вмістом хлорофілу в рослинах картоплі, яка оброблена біопрепаратами, можна оцінити шкодочинність М-вірусу картоплі. Результати досліджень показали, що застосування мікробних препаратів гаупсину і бактопасльону позитивно вплинуло на формування фотосинтетичного апарату рослин всіх сортів картоплі. Встановлено підвищення показників вмісту хлорофілу у рослин картоплі сорту Невська на 7,1 і 14 %, Сувенір Чернігівський – на 10,8 і 18,7 %, Жуковський ранній – на 17,2 і 28,07 %, Пікассо на 10,6 і 7,0 %, відповідно порівняно з контролем (табл. 1).

Таблиця 1. Вплив мікробних препаратів на формування фотосинтетичного апарату рослин картоплі

Варіант	Вміст хлорофілу <i>a</i> (мг на 100г)	Вміст хлорофілу <i>b</i> (мг на 100г)	Вміст хлорофілу <i>a + b</i> (мг на 100г)
Сорт Невська			
Контроль	89,84 ± 0,23	38,92 ± 0,42	128,76 ± 0,19
Гаупсин	100,1 ± 0,08	37,84 ± 0,27	137,98 ± 0,19
Бактопасльон	88,68 ± 0,04	58,18 ± 0,35	146,86 ± 0,31
Сорт Сувенір Чернігівський			
Контроль	98,55 ± 0,10	46,67 ± 0,24	145,22 ± 0,34
Гаупсин	104,02 ± 0,12	56,94 ± 0,23	160,96 ± 0,35
Бактопасльон	104,56 ± 0,22	67,79 ± 0,28	172,35 ± 0,10
Сорт Жуковський ранній			
Контроль	83,55 ± 0,08	42,17 ± 0,14	125,72 ± 0,27
Гаупсин	101,02 ± 0,10	46,32 ± 0,22	147,34 ± 0,19
Бактопасльон	108,56 ± 0,18	52,45 ± 0,20	161,01 ± 0,13
Сорт Пікассо			
Контроль	98,66 ± 0,15	34,43 ± 0,35	133,09 ± 0,32
Гаупсин	106,64 ± 0,10	40,61 ± 0,22	147,25 ± 0,30
Бактопасльон	102,00 ± 0,08	40,39 ± 0,29	142,39 ± 0,36

Також застосування препаратів забезпечило підвищення врожайності репродукційного матеріалу картоплі (табл. 2). Обробка насіння гаупсином забезпечила приріст урожайності картоплі сортів Невська, Сувенір Чер-

нігівський, Жуківський ранній, Пікассо на 15,2 %, 17,0 %, 13,3 % та 15,0 % відповідно. Бактопасльон сприяв збільшенню врожайності картоплі зазначених сортів від 16,0 % до 21,4 % залежно від сорту картоплі.

Таблиця 2. Вплив мікробних препаратів на врожайність репродукційного матеріалу картоплі

Сорт картоплі	Варіант досліду	Урожайність, кг	Приріст до контролю, %
Невська	Контроль	48,0	—
	Гаупсин	55,3	15,2
	Бактопасльон	58,3	21,4
Сувенір Чернігівський	Контроль	26,5	—
	Гаупсин	31,0	17,0
	Бактопасльон	31,5	18,8
Жуковська рання	Контроль	30,0	—
	Гаупсин	34,0	13,3
	Бактопасльон	34,8	16,0
Пікассо	Контроль	20,0	—
	Гаупсин	23,0	15,0
	Бактопасльон	23,8	19,0

Висновок. Аналіз ситуації показує, що сорти картоплі вже у розсадниках оригінального насінництва значною мірою уражені вірусними хворобами – поширення інфекції сягає 100 %. Превалює в посівах М-вірус картоплі в моноінфекції або у комплексі з іншими мозаїчними вірусами. Тобто, вже при вирощуванні насінневого матеріалу складаються передумови економічних збитків у галузі картоплярства, як за рахунок зниження врожайності уражених рослин, якості й товарності бульб, так і резервації та накопичення вірусів в агроценозах. Отже, мікробні препарати можуть відігравати важливу роль у зменшенні шкодочинності вірусних інфекцій рослин і підвищенні врожайності картоплі.

Список використаних джерел

1. Защита растений в устойчивых системах земледелия: в 4-х кн. [Д. Шпаар, У. Бурт, Т. Ветцел и др.]; под общ. ред. Д. Шпаара. – Торжок: ООО "Вариант", 2003. – Кн. 1. – 392 с.
2. Бойко А.Л. Фітовіруси: екологія, діагностика, профілактика / А.Л. Бойко, В.П. Патица // Агрокол. журн. Спецвип. – 2002. – № 3. – С. 23-26.
3. Гнутова Р.В. Фитопатогенные вирусы и их штаммы, выявленные на азиатской территории России / Р.В. Гнутова, В.Ф. Толкач // Микробиол. журн. – 2004. – Т. 66, № 4. – С. 48-56.
4. Вірусні інфекції картоплі та їх перебіг за умов модельованої мікрогравітації / [Мищенко Л.Т., Поліщук В.П., Таран О.П., Гордейчик О.І.]. – К.: Фітосоціоцентр, 2011. – 144с.
5. Коломієць Л.П. Вірусні хвороби картоплі / Л.П. Коломієць // Чернігівщина аграрна. – 2007. – №2(6). – С. 7-9.

6. Пат. 73682 UA, A01N 63/00, C 12 N 1/20. Інсектофунгіцидний препарат гаупсин для боротьби із шкідниками і хворобами сільськогосподарських культур / О.А. Кіпріанова, С.В. Гораль. – Заявл. 10.03.2004; Опубл. 15.08.2005, Бюл. № 8.

7. Балко О.І., Кіпріанова О.А., Коваленко О.Г. та ін. Антифитовірусна активність біопрепарату гаупсин // Микробиологія і біотехнологія. – 2010. – № 2. – С. 51-57.

8. Пат. 60613 UA, A01C 21/00, C05F 11/00, C 12 N 1/00. Спосіб бактеризації посадкового матеріалу картоплі / Т.А. Жеребдор, С.Ф. Козар, Т.О. Усманова, заявник та патентовласник: Інститут сільськогосподарської мікробіології НААН. – Заявл. 24.11.2010; Опубл. 25.06.2011, Бюл. № 12.

9. Методичні рекомендації щодо проведення досліджень з картоплею / [Куценко В.С., Осипчук А.А., Подгаєцький А.А. та ін.]. – Немішаєве, 2002. – 182 с.

10. Мельничук М.Д. Фітовірусологія: навчальний посібник / М.Д. Мельничук, А.Л. Бойко, В.П. Патица. – К.: Поліграф Консалтинг, 2005. – 200 с.

11. Щербина Н.В. Метод приготовления препаратов фитопатогенных вирусов для электронной микроскопии / Н.В. Щербина, М.Я. Курбала, Л.П. Коломієць // V съезд Укр. микробиол. о-ва (Днепропетровск, февр. 1980): тез. докл. – К.: Наук. думка, 1980. – С. 229.

12. Гродзинский А.М. Краткий справочник по физиологии растений / А.М. Гродзинский. – К.: Наук. Думка. – 1973. – С. 433-434.

13. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта / Б.А. Доспехов – М.: Колос, 1985. – 376 с.

14. Бужорьян В.В. Ультраструктура вирусных включений в растительных клетках. Атлас / В.В. Бужорьян, М.Я. Молдован. – Кишинев: Штиинца, 1982. – 168 с.

15. Кахнович Л.В. Влияние ингибитора синтеза белка в хлоропластах на фонд фотосинтетических пигментов / Л.В. Кахнович, В.А. Струженко // Вест. Белорус. гос. ун-та. – 1992. – №2. – С. 40 – 42.

Надійшла до редколегії 11.04.14

Т. Бова, канд. биол. наук, Ю. Дмитрук, науч. сотр., А. Пирог, мл. науч. сотр., В. Шепелевич, канд. биол. наук, Л. Авдеева, д-р мед. наук
КНУ имени Тараса Шевченко, Киев

ВЛИЯНИЕ МИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ВРЕДНОСТЬ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ В ПОСАДКАХ КАРТОФЕЛЯ В УСЛОВИЯХ ПОЛЕСЬЯ УКРАИНЫ

Наблюдалось снижение вредности вирусных инфекций на посадках картофеля сортов Невский, Сувенір Чернігівський, Жуковський ранній, Пікассо при использовании микробных препаратов гаупсин и бактопасльон. Отмечено увеличение урожайности картофеля и положительное влияние указанных препаратов на функционирование фотосинтетического аппарата растений картофеля в фазе цветения-бутонизации по сравнению с контролем.

Ключевые слова: Фитопатогенные вирусы, вредность вирусных инфекций, гаупсин, бактопасльон.

T. Bova, PhD., Yu. Dmitruk, Scient. Research., A. Pirog, Junior Scient. Research., V. Shepelevich, PhD., L. Avdeeva, DSc.
Taras Shevchenko National University of Kyiv. Institute of Biology

INFLUENCE OF MICROBIAL PREPARATIONS FOR MALICIOUS VIRUS INFECTIONS IN POTATO FIELDS IN CONDITIONS UKRAINE POLISSYA

The decrease of harmfulness infections in potato crop varieties Nev'ska Souvenir chernihiv's'kyi, Zhukivskyy early, Picasso when using microbial preparations Gaupsyn and Baktopaslon. Marked increase potato yield and positive effects of these drugs on the functioning of the photosynthetic apparatus of potato plants in the flowering stage, budding compared with controls.

Key words: Phytopathogenic viruses, malicious virus infections, gaupsin, baktopaslen.

UDC 632.3:594.38

O. Boyko, PhD
National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine,
T. Shevchenko, PhD, D. Lukashov, Prof.,
G. Orlovskaya, PhD
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Institute of Biology, Kyiv, Ukraine

THE CIRCULATION OF PHYTOVIRUS AMONG PLANTS AND FUNGI INVOLVING THE *HELIX POMATIA* L.

The results of researches about TMV (Tobamovirus) affection of Metaphyta and its contamination of pileated fungi Agaricus bisporus (J. Lge) Mbach), which was the model objects in diverse experiments, are given in this work. The Helix pomatia was investigated as vectors of infection, which is common in Ukraine phytocenosis.

Key words: plants, virus, mushrooms, *Helix pomatia*, phytocenosis, circulation.

Introduction. The abrupt change in climate factors in Planet region, anthropogenic burden on living systems cause unpredictable processes in organisms of different taxonomic groups. Thus there are accelerated mutation in microorganisms, viruses, new vectors of pathogens of various diseases appears in conditions of biocenosis. If realize that the living world – the macro- and micro-organisms are inseparable and they have adapted to each other for thousands of years, it becomes clear that the biological systems have so close links with each other that they were formed on the evolutionary path and carries out important functions in the current period of life [1-3]. It should be admitted that many biotic and abiotic factors act on the process of disruption in the formation of micro- and macroorganisms. Herewith the death or unpredictable reduction in certain populations often provokes a decreasing of other types organisms that occupy the appropriate ecological niches. It is known that an important feature of each population is a genetic individuality that supports the structure and function of the body. Under these conditions, even "useful" introduction of new genetic information into the process of growth and development of organism of a certain type can cause unpredictable consequences. This is particularly true to viruses of different taxonomic groups that are extremely changeable and contaminate different organisms and under certain conditions can cause diseases in them. According to our researches pileated fungi (*Basidiomycetes*) are affected by pathogens of different nature and cause diseases that reduce productivity and quality of raw stuff. These mushrooms and their mycelium often lead to unforeseen situations for food technology, pharmaceutical industry. They have a low yield of raw material for forming drugs based on biochemically active substances for the purpose of using them in agriculture (APC) and other industries [3-5]. In this case, we first developed a stepwise control of raw materials for detection of complex infection that is induced by bacteria, viruses and microscopic fungi. Back in the early 90s of the twentieth century, we found rod-shaped virus that contaminate champignon and causes specific symptoms on fruit bodies [4]. At the same time it remains a mystery how similar to TMV (tobacco mosaic virus) is able to get to the pileated fungi considering the main hosts of this pathogen. *The purpose of work* – to study the possible transfer of pathogen, that often circulates in the conditions of residential areas, causing peculiar symptoms on plants and pileated fungi, by the *Helix pomatia*.

The object and methods. In the experiments it was used the methods of visual analysis of accompanying plants, fungi and *Helix pomatia*, which were in the same phytocenosis – mostly in residential areas. All monitoring and sampling was carried out in 5-10 replications. Each of these areas covered 10 m². For the experiments, it was grown tomato plants (*Solanum lycopersicum* (L.) Merr.), datura (*Datura stramonium* L.), ribwort plantain (*Plantago*

lanceolata L.), and also pileated fungi (*Agaricus bisporus* (J. Lge) Imbach) by known techniques. The last one is often eaten by snail in natural biocenosis. However it is noted that it eats mushrooms of such kind: shaggy ink cap (*Coprinus comatus* (Müll. ex Fr.) S. F. Gray.), puffball (*Lycoperdon perlatum* Pers.), oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus* Fr. Kumm.).

For identification of TMV fluorescent microscopy was used to identify its intracellular inclusions. Morphological and structural features of pathogens were studied by electron microscopy with the instrumental magnification (20000 – 45000) of microscope EM 125 (Sumy, Ukraine), JEM 1400 (Japan). For the diagnosis of viruses and other pathogens the rapid method, which is developed by us, was used that has been successfully applied in the analysis of mushrooms natural biocenosis and those that are grown in specialized biotechnological processes [3]. Also it was used: polyacrylamide gel electrophoresis for the analysis of pathogen capsid proteins enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method Uhterlioni to detect the virus in the test material. It was used the standard serum for TMV in the detection of pathogens in samples extracts (Institute of agricultural microbiology and agroindustrial manufacture NAAS). For the diagnosis of disease and identification of the pathogen it was used the method of biological testing on plants datura (*Datura stramonium* L.). The full homogeneous leaves of middle-tier plants were selected. In experiments the titration on half sheet surface in a moist chamber were carried out by known in phytovirology methods [6,7]. The selection of healthy fruiting bodies of fungi was performed by a modified method of electrophoresis used to assess the quality of seed of various species of alfalfa (*Medicago sativa* L.) [8]. When doing research the results were subjected to mathematical processing to obtain a statistical evaluation of their reliability. Statistical analysis of experimental data was performed by parametric criteria of normal distribution option. The standard deviation of the mean values was calculated by the conventional method of using the program MS Excel XP [9].

The results and discussion. Analysis of examination of residential areas and of agrocenosis farms and natural ecosystems of Polissya and forest-steppe showed that during the 2008-2013 years mainly appropriate patterns of distribution of *Helix pomatia* were formed. On 10 m² area in average of 2-5 individuals snail were noted. As an exception served 2011 year, when on accounting areas *Helix pomatia* had a significant outbreak of number, which covers certain kinds of herbal plants and shrubs and trees. This is especially true to tomatoes, plantain, hops and grapes. On the last one it is noted for 8-10 individuals snail on a standard bush in the transition zone of southern Polissya to forest-steppe. While this the active eating by *Helix pomatia* was observed on plants of plantain, which as shown by further studies, was affected by TMV. This

variant of the virus was widespread, caused symptoms in biocenosis on plantain, black nightshade (*Solanum nigrum* L.), tomato, and under conditions of laboratory experiments on the plants datura and tobacco cultivar "Havana" (mainly a systemic reaction, often with peculiar necrotic spots) (Fig.1 a).

It is noted that the pathogen is adapted to plantain plant which is spreading along roads that are actively eaten by slugs. Thus in June-August, he often dies mass falling under the wheels of vehicles. Just at this period in late August and early September snail individuals are observed in different species of *Basidiomycetes* pileated fungi. This was particularly noticeable on *Agaricus bisporus*. Eating fruit bodies it leaves 0.5 -1.2 cm surface hollow on the surface of pileus (Fig. 1 r). Experiments allow you to note that the most active specialization of *Helix pomatia* occurs in plantain plants (table. 1). Its food activity is accelerated

on virus infected plants. Thus there is an opportunity to state that the capsid viral proteins positively attract snail species as a food "ration." Active virus reproduction in plants and migration of *Helix pomatia* then on mushrooms induces accumulation of the virus in its body and carrying the pathogen on fungi, where it is in a certain concentration. As proved virus induced corresponding necrosis on *Datura stramonium* after inoculation with infectious homogenate in different versions of the experiment. Thus inoculation of datura leaves with infectious homogenates of plantain of residential areas caused from 7 to 12 necrosis on half of the leaf blade, 2-5 of necrosis was formed after inoculation with snail homogenates, which fed on infectious plantain plants (5 days), and 2-4 necrosis using champignons homogenate after eating it by snail (5 days), contaminated with a virus.

Table 1. The intensity of eating *Helix pomatia* at different types of plants and fungi

№	Object of eating	time of eating h / min	The area of eaten leaf cm ²	Note
1.	plantain infected by virus	1 hour.30 min.	2,04 ±0,29	Affection by virus in natural biocenoses
2.	plantain not infected by virus	—"—	1,28±0,23	
3.	free- virus grape	—"—	1,06±0,2	best eaten edge of leaf blades
4.	Non-viral tomato leaves	—"—	0,4±0,1	leaves eaten not actively
5.	fruiting bodies of champignons	—"—	0,72±0,19	surface hollow

After inoculation with infectious homogenate obtained from the snail the biological virus titer was observed on the leaves of plants datura. By electron microscopy in these samples, we observed that virus particles by morphological parameters were similar to TMV (Fig.1 6), TMB, which contaminated plantain and synthesized crystalline

inclusions, which were well observed in fluorescent microscope. The virus of the snail gave a reaction with TMV by the Uhterloni method (Fig.1 c) and was detected by IFA. Its electrophoretic parameters of structural proteins were within 18,0-14,5 kDa.

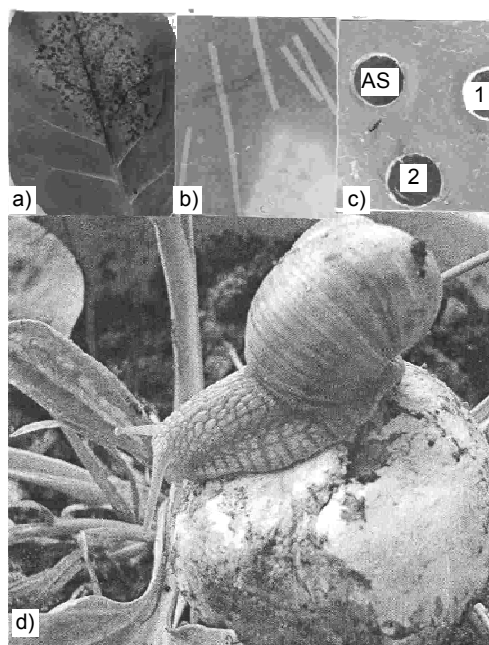


Fig. 1. The main results of researches pathogen:

a) necrotic spots on tobacco cultivar "Havana"; b) electron microscopic image of a virus isolated from datura *Datura stramonium* ($\times 30\,000$); c) reaction of double immunodiffusion in agar extracts of the snail *Helix pomatia* with antiserum to TMV. In the central hole – antiserum (AS) to TMV. In peripheral – extracts from snail (1 – virus-free homogenate, 2 – virus-containing homogenate); d) eating on champignons fruit bodies *Agaricus bisporus*.

It is important to emphasize that the using of express-method of virus detection [3] we often noted a mixed infection in fungi which are eaten by individuals of snail after eating infected plants. However, as modeling researches showed that the most commonly found bacteria are *Pseudomonas* and microscopic fungi of the genus

Penicillium. Thus, it must be emphasized that the researches of rod virus circulation made it possible to conclude that it should be referred to the genus *Tobamovirus*. This isolate is mechanically transferred from plants on fungi involving *Helix pomatia*. According to its biological properties virus can be attributed to TMV

isolates, which became widespread in natural biocenoses of Ukraine after the Chernobyl accident [7].

References

1. Крылов В.Н. Фаготерапия // Химия и жизнь. – 2002. – № 3. – С. 11-15.
2. Кордюм В.А. Эволюция и биосфера / К.: Наук. думка, 1982. – 264 с.
3. Бойко О.А., Шевченко Т.П., Бойко А.А. Морфологічні та структурні особливості патогенів Basidiomycetes // Мікробіологічний журнал. – 2013. – Т. 75, № 3. – С. 54-59.
4. Бойко О.А., Тараненко П.Х., Бухало А.С. Вирусная болезнь шампиньона при интенсивной технологии его выращивания // Докл. АН Украины. – 1992. – № 8. – С. 159-160.

5. Бойко О.А., Григорук І.П., Мельничук М.Д. Гриби (Basidiomycetes): властивості в екологічних нішах, продуценти біологічно-активних речовин // Агроекологічний журнал. – 2011. – № 3. – С. 69-75.
6. Поліщук В.П., Будзанівська І.Г., Шевченко Т.П. Посібник з практичних занять до курсу "Загальна вірусологія". – К.: Фітосоціоцентр, 2005. – 204 с.
7. Бойко А.Л. Основи екології та біофізики вірусів. – К.: Фітосоціоцентр, 2003. – 164 с.
8. Підюра О.І. Рід *Medicago* L. (Fabaceae) у флорі України. Електрофорез білків // Аграрна наука. – 1998. – С. 37-53.
9. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1980. – 293 с.

Submitted Editorial Board 17.02.14

О. Бойко, канд. біол. наук,
Національний університет природокористування та біоресурсів України
Т. Шевченко, канд. біол. наук,
Д. Лукашов, проф.
Г. Орловська, канд. біол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ЦИРКУЛЯЦІЯ ФІТОВІРУСУ СЕРЕД ГРИБІВ ТА РОСЛИН ПОВ'ЯЗАНИХ З ВИНОГРАДНИМ СЛИМАКОМ *HELIX POMATIA* L.

У роботі подаються результати досліджень ураження ВТМ (*Tobamovirus*) вищих рослин та контамінацію ним шапинкових грибів *Agaricus bisporus* (J. Lge) *Mbach* печерицю двоспорову, яка слугувала модельним об'єктом у різнопланових дослідках. Як вектор інфекції досліджували слимака виноградного (*Helix pomatia*), який має поширення в фітоценозах України.

Ключові слова: рослини, віруси, гриби, Виноградний слимак, фітоцетоз.

О. Бойко, канд. биол. наук.
Национальный университет природопользования и биоресурсов Украины,
Т. Шевченко, канд. биол. наук,
Д. Лукашов, проф.
Г. Орловская, канд. биол. наук
КНУ имени Тараса Шевченко, Киев.

ЦИРКУЛЯЦИЯ ФИТОВИРУСОВ СРЕДИ ГРИБОВ И РАСТЕНИЙ СВЯЗАННЫХ С ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКОЙ *HELIX POMATIA* L.

В работе представлены результаты исследований поражения ВТМ (*Tobamovirus*) высших растений и контаминацию к ним шапковых грибов *Agaricus bisporus* (J. Lge) *Mbach* шампиньон двоспоровый, который служил модельным объектом в разноплановых опытах. Как вектор инфекции исследовали улитку виноградную (*Helix pomatia*), которая имеет распространение в фитоценозах Украины.

Ключевые слова: растения, вирусы, грибы, Виноградная улитка, фитоцетоз.

УДК 612.821.6:615.355

О. Гаділія, зав. лаб.,
О. Вірченко, асп.,
Т.Фалалєєва, д-р біол. наук,
Л. Остапченко, проф.
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ,
К. Кудрявцев, канд. хім. наук
Московський державний університет імені М.В. Ломоносова, Російська Федерація, Москва

ВМІСТ ЛЕЙКОТРИЄНІВ ТА ПРОСТОГЛАНДИНУ E_2 В КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО УЛЬЦЕРОГЕНЕЗУ ТА ПРОФІЛАКТИЧНОГО ВВЕДЕННЯ 2-(2-ГІДРОКСИФЕНОКСИ)АЦЕТИЛ)-L-ПРОЛІНАТ НАТРІЮ

Метою роботи було дослідити роль лейкотрієнів та простагландину E_2 в гастропротекторній дії низькомолекулярної органічної сполуки (НОС) 2-(2-гідроксифеноксид)ацетил)-L-пролінат натрію. Встановлено, що у щурів вміст лейкотрієнів B_4 і C_4 в сироватці крові після нанесення ультрогенних чинників (стрес, етанол та нестероїдні протизапальні засоби) значущо підвищувався. Профілактичне введення НОС 2-(2-гідроксифеноксид)ацетил)-L-пролінат натрію зменшувало вміст лейкотрієнів B_4 і C_4 . Аналіз змін вмісту простагландину E_2 , який бере участь у цитопротекції в слизовій оболонці шлунка, показав, що після нанесення ультрогенних чинників (стрес, етанол та нестероїдні протизапальні засоби) ендогенний рівень простагландину зменшувався лише при введенні аспірину та індометацину. Профілактичне введення НОС 2-(2-гідроксифеноксид)ацетил)-L-пролінат натрію відновлювало рівень простагландину E_2 .

Ключові слова: лейкотрієни, простагландин E_2 , ерозивно-виразкові ураження, слизова оболонка шлунка.

Вступ. Згідно з сучасними уявленнями пошкодження слизової оболонки розвивається в результаті переважання факторів кислотно-пептичної агресії над захисними можливостями слизового бар'єру шлунка.

Одним з факторів агресії є накопичення лейкотрієнів у судинній стінці шлунка. Лейкотрієни – група ліпідних високоактивних речовин, що утворюється в організмі з арахідонової кислоти та містить 20-члений вуглецевий ланцюг. Утворюються лейкотрієни в лейкоцитах, мастоцитах, тромбоцитах і макрофагах за ліпоксігеназним

шляхом у відповідь на дію імунологічних та неімунологічних стимулів. Вивільнення лейкотрієну C_4 (ЛТС₄) призводить до повільно наростаючого стійкого скорочення гладких м'язів бронхів і травного тракту. Показано, що ЛТС₄ стимулює скорочення гладких м'язів і підвищує проникність судин [1]. Експериментальні дослідження показали кореляційний зв'язок між ураженнями слизової оболонки шлунка (СОШ) та збільшенням синтезу лейкотрієнів [2]. Лейкотрієни B_4 (ЛТВ₄) – ліпідний медіатор родини ейкозаноїдів з групи лейкотрієнів, є

медіатором запалення. В-лімфоцити під дією ЛТВ₄ диференціюються і у присутності інтерлейкіну 4 секретують Ig E. Крім цього, ЛТВ₄ є ключовим компонентом у Th2-відповіді, викликає утворення інтерлейкінів 4 і 5, активує проліферацію CD⁴⁺-клітин та інгібує зростання CD⁸⁺-клітин. Ендотеліальні клітини під дією ЛТВ₄ зв'язують і забезпечують трансміграцію нейтрофілів. Дія ЛТВ₄ на нейтрофіли особливо важлива. Він активує їх трансміграцію, блокує клітинний апоптоз і індукує вивільнення секреторних гранул нейтрофілів, що пов'язано з утворенням реактивних форм кисню. ЛТВ₄ підсилює фагоцитоз макрофагів і викликає вивільнення ними протизапальних цитокінів.

На думку багатьох вчених, в основі феномена адаптивної цитопротекції лежить активація природних механізмів адаптації слизової оболонки до впливу агресивних факторів [3, 4]. Вперше це явище описав Андре Роберт у 1979 р., який дійшов висновку щодо ефективності простагландинів у захисних механізмах відновлення слизової оболонки після її пошкодження. Основним простагландином, що бере участь у явищі цитопротекції, є простагландин E₂ (ПГЕ₂) [5, 6]. На сьогодні точний механізм дії цитопротекторних простагландинів залишається невідомим, але для пояснення цього явища були запропоновані такі можливі варіанти: стимулююча дія цих речовин щодо вироблення шлункового слизу та секреції бікарбонатів, посилення мікроциркуляції та збільшення сульфгідрильних сполук у слизовій оболонці шлунка [5]. З'ясовано, що простагландини не здатні захистити поверхневий шар епітелію слизової оболонки від дії подразника. Вони лише запобігають ушкодженню більш глибоких шарів за рахунок стимуляції міграції клітин слизової оболонки з непошкоджених ділянок [7, 8].

У попередній роботі нами було показано, що профілактичне введення низькомолекулярної органічної сполуки (НМОС) 2-(2-гідроксифенокси)ацетил-L-пролінат натрію захищало СОШ від ульцерогенезу, викликаного чинниками різної етіології (стрес, етанол та нестероїдні протизапальні засоби) [9].

У зв'язку з вище наведеним метою роботи було дослідити роль лейкотрієнів та простагландину E₂ в гастропротекторній дії низькомолекулярної органічної сполуки 2-(2-гідроксифенокси)ацетил-L-пролінат натрію.

Матеріали і методи. У дослідженнях використані тварини розведення віварію Навчально-наукового центру "Інституту біології" Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Тварини утримувалися на стандартному раціоні в умовах акредитованого віварію згідно "Стандартним правилам з упорядкування, обладнання та утримання експериментальних біологічних клінік (віваріїв)". У приміщенні для утримання тварин підтримувалися наступні умови: температура – 20-25° С, вологість – 50-55%, 12-годинний світловий день.

Вибираючи адекватні моделі патології шлунка, ми виходили з сучасної концепції етіопатогенезу виразкової хвороби, яка враховує як нервово-гуморальний (центральный), так і гастродуоденальний (місцевий) механізми. Порушення діяльності нервової системи у центральному та вегетативному відділах займає провідне місце у появі виразок. Воно тісно пов'язане зі змінами в ендокринній регуляції та обміні біогенних амінів, які виконують роль медіаторів. Серед місцевих механізмів, що беруть участь у формуванні виразкового дефекту в шлунку і дванадцятипалій кишці, важлива роль належить зниженню резистентності слизової оболонки, обумовленому трофічними порушеннями і ослабленням захисного бар'єру [10]. У зв'язку з вище викладеним в даній роботі ми відібрали найбільш популярні і сучасні методики моделювання ерозивно-виразкових ура-

жень СОШ, викликаних стресом, алкоголем, індометацином і аспірином.

Дослідження проведені на 90 білих лабораторних щурах лінії Wistar. Всі роботи з тваринами проводились відповідно до Закону України від 21.02.2006 № 3447-IV "Про захист тварин від жорстокого поводження" [3У от 21.02.2006 № 3447-IV "Про защиту животных от жестокого обращения": 2006.] та у відповідності з етичними нормами і правилами роботи з лабораторними тваринами (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Academy Press, Washington DC, 1996) [7]. Тварин умертвляли методом цервікальної дислокації.

Тварини були поділені на 10 груп:

1 – група тварин – інтактний контроль.

2, 4, 6, 8 – контрольні групи. Щурам за 30 хвилин до ульцерогенного фактору (група 2 – стрес, 4 – етанол, 6 – індометацин, 8 – аспірин) вводили 2 мл/кг фізіологічного розчину внутрішньоочеревинно (в/о) – самці щурів;

3, 5, 7, 9 – дослідні групи. Щурам профілактично за 30 хвилин до дії ульцерогенного чинника (група 3 – стрес, 5 – етанол, 7 – індометацин, 9 – аспірин) здійснювали ін'єкції НМОС (2-(2-гідроксифенокси)ацетил-L-пролінат натрію) у дозі 1 мг/кг об'ємом 2 мл/кг (сполука синтезована в Московському державному університеті імені М.В. Ломоносова) – самці щурів.

За добу до проведення експерименту тварини були піддані харчовій депривації з вільним доступом до води. Ерозивно-виразкові ураження СОШ щурів у 2-й і 3-й групах викликали методом іммобілізаційного водонепропусного стресу [11], у 4-й та 5-й групах – інтрагастральним введенням 96° етанолу [12], у 6-й та 7-й – індометацину [13] та 8-й та 9-й – аспірину [14].

Вміст ЛТВ₄ і ЛТС₄ та ПГЕ₂ в сироватці крові щурів визначали методом імуноферментного аналізу з використанням специфічних поліклональних антитіл (Sigma) до даних молекул. Антитіла до ПГЕ₂ та ЛТВ₄ і ЛТС₄ були вироблені в кролі. В лунки 96-лункового планшета із сорбційною поверхнею іммобілізували досліджувані молекули. До них приєднували первинні антитіла, до яких після чого додавали вторинні антикролячі антитіла, вироблені в козлі, кон'юговані з пероксидазою. Оптична щільність розчину в лунці після додавання субстрату свідчила про кількість ферменту в лунці, а відповідно і про кількість іммобілізованих молекул. Їх вміст виражали в умовних одиницях оптичної щільності.

Отримані результати досліджень перевіряли на нормальність розподілу за допомогою W тесту Шапіро-Вилка. Оскільки дані були нормально розподілені, тому порівняння вибірок проводили з використанням t-критерія Стюдента для незалежних вибірок, рівень значущості $p \leq 0,05$. Дані представляли у вигляді середнього значення (M) і помилки середнього (m).

Результати та обговорення. Після дії стресу вміст ЛТС₄ у сироватці крові зростав з $0,132 \pm 0,009$ до $0,189 \pm 0,008$ у.о., або на 43,5% ($p \leq 0,01$) (рис. 1). При введенні НМОС вміст ЛТС₄ збільшився у порівнянні з інтактним контролем на 23,6% ($p < 0,05$). При цьому досліджувана сполука значущо зменшувала вміст ЛТС₄ в сироватці крові на 13,8% ($p < 0,05$) у порівнянні з групою щурів, яким вводили фізіологічний розчин.

Розвиток уражень в СОШ щурів, викликаних введенням етанолу, супроводжувався зростанням вмісту ЛТС₄ з $0,132 \pm 0,009$ до $0,182 \pm 0,010$ у.о., або на 38,2% ($p < 0,01$) (рис. 1). Вміст ЛТС₄ у сироватці крові при дії НМОС становив $0,147 \pm 0,012$ у.о., що на 19,0% ($p < 0,05$) менше порівняно з позитивним контролем і достовірно не відрізнявся від інтактного контролю.

Розвиток ерозивно-виразкових уражень в СОШ, викликаних індометацином, супроводжувався зростанням рівня

ЛТС₄ як в контрольній так і дослідній групі тварин у порівнянні з інтактним контролем відповідно на 48,9% ($p < 0,001$) та 23,9% ($p < 0,05$) (рис. 1). Проте, профілактичне введення НОС зменшувало вміст ЛТС₄ у сироватці крові на 16,8% ($p < 0,05$) порівняно з контрольною групою щурів.

Введення аспірину щурам у якості ульцерогенного фактору також супроводжувалося зростанням вмісту

ЛТС₄ в сироватці крові піддослідних тварин. Так у контрольній групі тварин цей показник зріс на 64,8% ($p < 0,001$) у порівнянні з інтактним контролем (рис. 1). У групі тварин, яким вводили НМОС, вміст ЛТС₄ зменшився на 14,7% ($p < 0,01$) порівняно з контрольною групою тварин, проте залишався більшим на 40,5% ($p < 0,01$) порівняно з інтактними щурами.

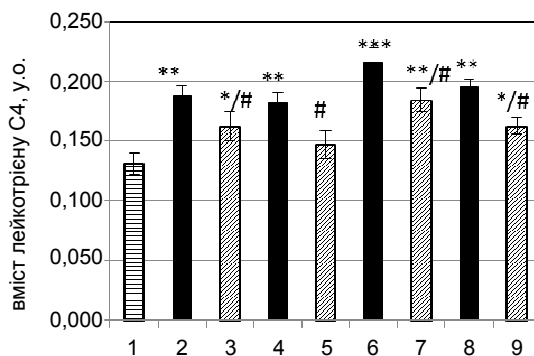


Рис. 1. Вміст лейкотрієну С4 в сироватці крові щурів за умов впливу ульцерогенних факторів та профілактичного введення

низькомолекулярної органічної сполуки (НОС) 2-(2-гідроксифенокси)ацетил-L-пролінат натрію (n=10 в кожній групі, M±m):

1 – інтактний контроль; 2 – фізіологічний розчин + стрес; 3 – НОС + стрес;

4 – фізіологічний розчин + етанол; 5 – НОС + етанол; 6 – фізіологічний розчин + індометацин;

7 – НОС + індометацин; 8 – фізіологічний розчин + аспірин; 9 – НОС + аспірин.

Примітка: *, **, *** – $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ відносно інтактного контролю, #, ##, ### – $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ відносно відповідної групи щурів, яким вводили фізіологічний розчин.

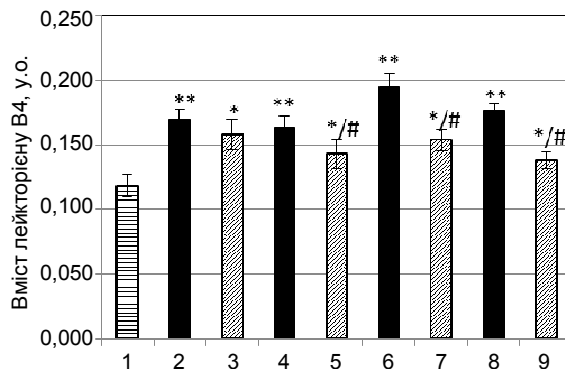


Рис. 2. Вміст лейкотрієну В4 в сироватці крові щурів за умов впливу ульцерогенних факторів та профілактичного введення

низькомолекулярної органічної сполуки (НОС) 2-(2-гідроксифенокси)ацетил-L-пролінат натрію (n=10 в кожній групі, M±m):

1 – інтактний контроль; 2 – фізіологічний розчин + стрес; 3 – НОС + стрес;

4 – фізіологічний розчин + етанол; 5 – НОС + етанол; 6 – фізіологічний розчин + індометацин;

7 – НОС + індометацин; 8 – фізіологічний розчин + аспірин; 9 – НОС + аспірин

Примітка: *, **, *** – $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ відносно інтактного контролю, #, ##, ### – $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ відносно відповідної групи щурів, яким вводили фізіологічний розчин.

Встановлено, що після дії стресу вміст ЛТВ₄ у сироватці крові тварин зростав з $0,118 \pm 0,008$ до $0,170 \pm 0,007$ у.о., або на 43,5% ($p < 0,01$) (рис. 2). Під дією препарату вміст ЛТВ₄ у сироватці крові дослідних щурів статистично достовірно не відрізнявся від контрольних тварин, проте був на 33,5% ($p < 0,05$) більшим порівняно з інтактними тваринами.

Було виявлено, що застосування етанолу у якості ульцерогенного фактору, призводило до збільшення вмісту ЛТВ₄ у сироватці крові щурів контрольної групи на 38,2% ($p < 0,01$) порівняно з інтактними тваринами. У групі тварин, яким вводили НМОС вміст ЛТВ₄ у крові був на 21,0% ($p < 0,05$) більшим від інтактного контролю і на 12,5% ($p < 0,05$) меншим порівняно з групою позитивного контролю.

За умов індометацин-індукованої виразки вміст ЛТВ₄ у сироватці крові щурів як контрольної, так і дослідної групи збільшувався відповідно на 64,8% ($p < 0,01$) та 30,1% ($p < 0,05$) порівняно з інтактними щурами. Проте профілактичне введення досліджуваної сполуки значуще зменшило рівень ЛТВ₄ порівняно з контрольною групою на 21,0% ($p < 0,05$).

Введення фізіологічного розчину щурам за умов аспіринової виразки збільшило вміст ЛТВ₄ у сироватці крові щурів з $0,118 \pm 0,008$ до $0,176 \pm 0,006$ у.о., або на 48,9% ($p < 0,01$). Вміст даного лейкотрієну у сироватці крові при дії НМОС зменшився порівняно з позитивним контролем на 21,7% ($p < 0,05$) (рис.2).

Отже, досліджувана сполука зменшувала вміст ЛТС₄ у всіх моделях експериментальних виразок, а

вміст рівень ЛТС₄ за умов етанолової виразки та викликаній нестероїдними протизапальними засобами.

Наступним етапом наших досліджень було аналіз ролі ПГЕ₂ у цитопротекторній дії НМОС. Встановлено, що після дії стресу та застосування етанолу у якості ульцерогенного фактору достовірної відмінності у вмісті ПГЕ₂ у сироватці крові щурів як контрольної, дослідної груп, так і групи інтактного контролю виявлено не було. Розвиток ерозивно-виразкових уражень в СОШ, викликаних індометацином, супроводжувався зменшенням вмісту ПГЕ₂ у сироватці крові з $0,129 \pm 0,006$ до $0,087 \pm 0,004$ у.о. або на 32,74% ($p < 0,01$). За умов профілактичного введення НМОС вміст ПГЕ₂ складав

$0,112 \pm 0,003$ у.о. або на 13,0% ($p < 0,05$) менше, ніж у групі інтактного контролю, і на 29,3% ($p < 0,05$) більше, ніж у групі позитивного контролю (рис. 3).

Розвиток уражень в слизовій оболонці шлунка щурів, викликаних введенням аспірину, супроводжувався зменшенням вмісту ПГЕ₂ на 26,8% ($p < 0,01$) порівняно з групою інтактного контролю. Вміст ПГЕ₂ у сироватці крові при дії 2-(2-гідроксифенокси)ацетил)-L-пролінат натрію становив $0,123 \pm 0,005$ у.о., що було більше на 31,0% ($p < 0,05$) порівняно з позитивним контролем і не мало статистично достовірної відмінності від групи інтактного контролю.

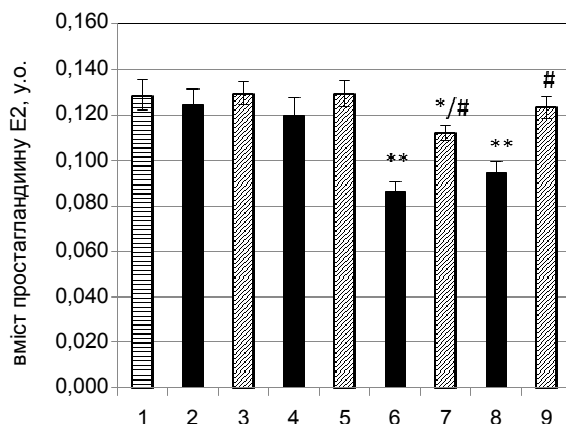


Рис. 3. – Вміст простагландину E₂ в сироватці крові щурів за умов впливу ульцерогенних факторів та профілактичного введення

низькомолекулярної органічної сполуки (НОС) 2-(2-гідроксифенокси)ацетил)-L-пролінат натрію (n=10 в кожній групі, M±m):

- 1 – інтактний контроль; 2 – фізіологічний розчин + стрес; 3 – НОС + стрес;
4 – фізіологічний розчин + етанол; 5 – НОС + етанол; 6 – фізіологічний розчин + індометацин;
7 – НОС + індометацин; 8 – фізіологічний розчин + аспірин; 9 – НОС + аспірин

Примітка: *, **, *** – $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ відносно інтактного контролю, #, ##, ### – $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ відносно відповідної групи щурів, яким вводили фізіологічний розчин.

Висновок. Як було зазначено вище одним з факторів агресії щодо слизової оболонки є накопичення лейкотрієнів у судинній стінці шлунка. Дійсно у щурів вміст лейкотрієнів B₄ і C₄ в сироватці крові після нанесення ульцерогенних чинників (стрес, етанол та нестероїдні протизапальні засоби) значущо підвищувався. Профілактичне введення НМОС 2-(2-гідроксифенокси)ацетил)-L-пролінат натрію зменшувало вміст лейкотрієнів B₄ і C₄. Аналіз змін вмісту простагландину E₂, який бере участь у цитопroteкції в слизовій оболонці шлунка, показав, що після впливу ульцерогенних чинників (стрес, етанол та нестероїдні протизапальні засоби) ендogenous рівень даного простагоїду зменшувався лише при введенні аспірину та індометацину, що узгоджується з даними літератури [15]. Профілактичне введення НМОС 2-(2-гідроксифенокси)ацетил)-L-пролінат натрію відновлювало рівень простагландину E₂ в сироватці крові щурів за умов аспірин- та індометацин-індукованих уражень.

Список використаних джерел

- Hudson N. Enhanced gastric mucosal leukotriene B₄ synthesis in patients taking non-steroidal anti-inflammatory drugs / N. Hudson, M. Balsitis, S. Everitt [et al.] // Gut. – 1993. – Vol.34, № 6. – P.742-747.
- Wallace J. L. Gastrointestinal damage induced by platelet-activating factor: role of leukotrienes / J.L. Wallace, W. K. MacNaughton // Eur J Pharmacol. – 1988. – Vol.151, № 1. – P.43-50.
- Ткач С. М. Современные подходы к профилактике и лечению НПВП-гастропатий / С. М. Ткач, М. П. Середа // Суч. гастроентерологія. – 2005. – Т.3, № 23. – С.66-71.
- Дзяк Г. В. Сучасний погляд на гастропатії, викликані нестероїдними протизапальними препаратами. Целекоксиб і стан секреторної функції шлунка / Г. В. Дзяк, Ю. М. Степанов, В. І. Гриценко // Сучасна гастроентерологія. – 2003. – Т.1, № 11. – С.4-10.

- Свінціцький А. С. Гастроудоденальні ускладнення фармакотерапії нестероїдними протизапальними препаратами як актуальна проблема медицини. / А. С. Свінціцький, Н. І. Хомченкова, А. І. Таран, et al. // Суч. гастроентерологія. – 2001. – Т.1, № 3. – С.22-28.
- Laine L. Proton pump inhibitor co-therapy with nonsteroidal anti-inflammatory drugs-nice or necessary? / Laine L. // Rev Gastroenterol Disord. – 2004. – Vol.4 Suppl 4, № – P.S33-41.
- Konturek S. J. Role of locally generated prostaglandins in adaptive gastric cytoprotection / S. J. Konturek, T. Brzozowski, I. Piastucki, et al. // Dig Dis Sci. – 1982. – Vol.27, № 11. – P.967-971.
- Konturek S. J. Role of prostaglandins in the formation of aspirin-induced gastric ulcers / S. J. Konturek, I. Piastucki, T. Brzozowski, et al. // Gastroenterology. – 1981. – Vol.80, № 1. – P.4-9.
- Маркевич А. О. Скринінг синтезованих низькомолекулярних органічних сполук щодо їх ефективності в профілактиці уражень слизової оболонки шлунка / А. О. Маркевич, О. П. Гаділія, Т. М. Фалалєєва, et al. // Вісник проблем біології і медицини. – 2013. – Т.1(102), № 3. – С.116-121.
- Laine L. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside / L. Laine, K. Takeuchi, A. Tamawski // Gastroenterology. – 2008. – Vol.135, № 1. – P.41-60.
- Takagi K. Studies on the Drugs for Peptic Ulcer. A Reliable Method for Producing Stress Ulcer in Rats / K. Takagi, Y. Kasuya, K. Watanabe // Chem Pharm Bull (Tokyo). – 1964. – Vol.12, № – P.465-472.
- Ramesh S. T. Effect of central administration of ondansetron, a 5-hydroxytryptamine-3 receptor antagonist on gastric and duodenal ulcers / S. T. Ramesh, M. Asad, S. S. Dhamanigai [et al.] // Fundam Clin Pharmacol. – 2009. – Vol.23, № 3. – P.303-309.
- Seo P. J. Comparison of Indomethacin, Diclofenac and Aspirin-Induced Gastric Damage according to Age in Rats / P. J. Seo, N. Kim, J. H. Kim [et al.] // Gut Liver. – 2012. – Vol.6, № 2. – P.210-217.
- Shea-Donohue T. Aspirin-induced changes in gastric function: role of endogenous prostaglandins and mucosal damage / T. Shea-Donohue, L. Steel, E. Montcalm-Mazzilli [et al.] // Gastroenterology. – 1990. – Vol.98, № 2. – P.284-292.
- Hill T. L. The Effect of Tramadol and Indomethacin Coadministration on Gastric Barrier Function in Dogs / T. L. Hill, B. D. Lascelles, M. Law [et al.] // J Vet Intern Med. – 2014. – [Epub ahead of print]

Надійшла до редколегії 17.04.14

Е. Гадилия, зав. лаб.,
А. Вирченко, асп., Т. Фалалеева, д-р биол. наук,
Л. Остапченко, проф.
КНУ имени Тараса Шевченко, Киев.
К. Кудрявцев, канд. хим. наук
Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Российская Федерация, Москва

СОСТАВ ЛЕЙКОТРИЕНОВ И ПРОСТАГЛАНДИНА E_2 В КРОВИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО УЛЬЦЕРОГЕНЕЗА

И ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО ВВЕДЕНИЯ 2-(2-ГИДРОКСИФЕНОКСИ)АЦЕТИЛ)-L-ПРОЛИНАТ НАТРИЯ

Целью работы было исследовать роль лейкотриенов и простагландина E_2 в гастропротекторном действии низкомолекулярного органического соединения 2-(2-гидроксифенокси) ацетил)-L-пролинат натрия. Установлено, что у крыс содержание лейкотриенов B_4 и C_4 в сыворотке крови после нанесения ulcerогенных факторов (стресс, этанол и нестероидные противовоспалительные средства) значительно повышалось. Профилактическое введение НОС 2-(2-гидроксифенокси) ацетил)-L-пролинат натрия уменьшало содержание лейкотриенов B_4 и C_4 . Анализ изменений содержания простагландина E_2 , который принимает участие в цитопротекции в слизистой оболочке желудка, показал, что после нанесения ulcerогенных факторов (стресс, этанол и нестероидные противовоспалительные средства) эндогенный уровень простагландинов уменьшался лишь при введении аспирина и индометацина. Профилактическое введение НОС 2-(2-гидроксифенокси) ацетил)-L-пролинат натрия восстанавливало уровень простагландина E_2 .

Ключевые слова: лейкотриены, простагландин E_2 , эрозивно-язвенные поражения, слизистая оболочка желудка.

E. Gadiliya, ch.lab.,
A. Virchenko, PhD stud., T. Falaleeva, DSc.,
L. Ostapchenko, Prof.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv
K. Kudrayvtsev, PhD.
Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

LEUKOTRIENES AND PROSTAGLANDIN E_2 CONTENT IN RAT BLOOD SERUM UNDER THE CONDITIONS OF EXPERIMENTAL ULCEROGENESIS AND PROPHYLACTIC ADMINISTRATION OF 2 – (2-HYDROXYPHENOXY) ACETYL)-L-PROLINAT SODIUM

The aim of the study was to investigate the role of leukotrienes and prostaglandin E_2 in gastroprotective action of low molecular weight organic compound 2-(2-hydroxyphenoxy) acetyl)-L-prolinat sodium. It was established that the leukotriene B_4 and C_4 contents in rat blood serum after exposure to ulcerogenic factors (stress, ethanol and nonsteroidal anti-inflammatory drugs) was significantly increased. Prophylactic administration of 2 – (2-hydroxyphenoxy) acetyl)-L-prolinat sodium reduced the content of leukotrienes B_4 and C_4 . Analysis of changes of the content of prostaglandin E_2 , which is involved in cytoprotection in gastric mucosa showed that after the action of ulcerogenic factors (stress, ethanol and non-steroidal anti-inflammatory drugs) level of endogenous prostanoids decreased by aspirin and indomethacin. Prophylactic administration of 2-(2-hydroxyphenoxy) acetyl)-L-prolinat sodium restored the level of prostaglandin E_2 .

Keywords: leukotrienes, prostaglandin E_2 , erosive and ulcerative lesions, gastric mucosa.

УДК 577.125:615.35:611.018.6:636.92

С. Костюк, канд. біол. наук
НДІ фізіології та екоімунології тварин і птиці ЛНУВМ та БТ імені С.З.Гжицького, Львів,
О. Бусенко, проф.
Національний університет біоресурсів та природокористування, Київ

ЖИРНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД ЗАГАЛЬНИХ ЛІПІДІВ НАЙДОВШОГО М'ЯЗА СПИНИ КРОЛІВ ПІД ВПЛИВОМ ГАММА-РАДІАЦІЇ ЗА ДІЇ ПІРИДОКСИНУ

Встановлено, що гамма-опромінення призвело до зменшення вмісту більшості жирних кислот найдовшого м'яза спини кролів, а застосування піридоксину нівелювало негативний вплив радіації на вміст жирних кислот.

Ключові слова: гамма-опромінення, жирні кислоти, піридоксин.

Вступ. Ефективне використання тварин в умовах інтенсифікації тваринництва вимагає глибокого розуміння особливостей фізіологічних процесів у тварин і птиці, а також змін, які виникають в організмі під впливом різноманітних факторів навколишнього середовища, серед яких вважається іонізуюча радіація. Через інтенсивне випробування ядерної енергетики, виникненням аварій на атомних електростанціях стають нові завдання вивчення особливостей дії іонізуючого випромінювання на живий організм.

Відомо, що ліпіди відіграють важливу роль у розвитку компенсаторно-приспосувальних реакцій організму за дії надзвичайних подразників. За опікової хвороби найбільш очевидна їхня роль у пластичних, енергетичних і регуляторних процесах. Доведено також, що основним субстратом процесу ліпідної перекисидзації є переважно поліненасичені жирні кислоти, які легко піддаються окисному впливу. Вони втрачають свої первісні властивості й можуть викликати в організмі різні порушення обміну. Висока метаболічна активність ненасичених жирних кислот ліпідів біологічних мембран визначає важливість вивчення цього класу ліпідів [1].

Жирні кислоти виконують цілу низку життєвих функцій і забезпечують процеси росту, розвитку й розмноження. Таке важливе значення цих сполук для організму тварин зумовлене їхньою високою енергетичною цінністю та багатограним впливом на основний обмін і тканинний метаболізм [3,6]. Жирні кислоти беруть участь у метаболічних реакціях, транспорті ліпідів, вони задіяні в процесі утворення ліпопротеїдів і входять переважно до складу фосфоліпідів, які є важливими структурними елементами мембранних систем. Жирні кислоти безпосередньо впливають на активність ферментів метаболізму ліпідів, що викликає зміни жирнокислотного складу тканин. Зупиняючи швидке збільшення фібробластів і їх диференціювання, жирні кислоти в організмі тварин зменшують відкладення жиру в м'язових тканинах [3, 5, 4], що й послужило нам вибрати для дослідження власне найдовший м'яз спини.

Враховуючи вищевикладене дослідження даного питання є актуальним і на сьогоднішній день.

Метою роботи було вивчення впливу гамма-радіації на жирно-кислотний вміст загальних ліпідів найдовшого м'яза спини кролів на тлі дії піридоксину.

Матеріал і методи. Дослідження проводилися на сороках кролях породи Білий велетень у дві серії дослідження. Тварин відбирали за принципом параналогів (табл.1).

Кролі були розподілені на дві групи: I (контрольну) і II (дослідну). Тваринам дослідної групи за тиждень до опромінення і протягом всього дослідження вводили

внутрішньом'язово 1 мл піридоксину гідрохлориду (вітамін B₆). Кролів опромінювали рентгенівськими променями DL=50, яка складала 1000 рентгенів, 190 кв, А – 20 mA, фокусна відстань – 62 см, фільтри Cu – 0,5, A1 – 1 мм потужність 20 Р/хв. З метою фільтрації м'яких променів застосовувались алюмінієвий та мідний фільтри. Опромінювання було тотальним та одномоментним.

Таблиця 1. Характеристика піддослідних тварин

Номер кролика	Вік, місяців		Маса тіла, кг	
	1-ша група	2-га група	1-ша група	2-га група
1	5,0	5,0	3,2	3,4
2	5,2	5,0	3,3	3,5
3	5,1	5,0	3,6	3,3
4	5,2	5,2	3,7	3,2
5	5,0	5,1	3,8	3,7
6	5,2	5,2	3,5	3,6
7	5,0	5,2	3,7	3,5
8	5,0	5,0	3,6	3,8
9	5,0	5,0	3,5	3,7
10	5,1	5,0	3,6	3,5

Жирні кислоти загальних ліпідів жирних кислот визначали на рідинному хроматографі японського виробництва "Shimadzu", в якому застосовувалася для розділення жирних кислот іонообмінна колонка. Залежно від маси жирних кислот вони розділялися іонообмінником у відповідній послідовності та часі.

Результати та їх обговорення. На рисунках 1–3 представлено жирнокислотний склад загальних ліпідів найдовшого м'яза спини кролів тих жирних кислот, які зазнали зміни після опромінення. Концентрація лауринової, міристинової, пентадеканової, пальмітинової і пальмітоолеїнової кислот після опромінення зменшилася і екзогенний піридоксин не вплинув на їх концентрація після опромінення. На рисунку 1 подана концентрація стеаринової кислоти найдовшого м'яза спини кролів контрольної і дослідної групи. До опромінення концентрація стеаринової кислоти найдовшого м'яза спини кролів контрольної групи становила $5,31 \pm 0,3$ ммоль/л, а після опромінення зменшилася на 50% до $2,15 \pm 0,24$ (рис. 1). У наступному дещо збільшилася, але до норми не повернулася і становила на 76-у добу в найдовшому м'язі кролів контрольної групи $2,38 \pm 0,54$ ммоль/л (норма $5,31 \pm 0,3$ ммоль/л). Уміст стеаринової кислоти в найдовшому м'язі спини кролів дослід-

ної групи, яким вводили піридоксин гідрохлориду до опромінення становив $6,16 \pm 0,6$ ммоль/л, після опромінення зменшився на 41,9%, а у контрольної – на 50% і становив $2,15 \pm 0,24$ ммоль/л, а після опромінення – $6,16 \pm 0,6$ ммоль/л. Різниця вмісту стеаринової кислоти в найдовшому м'язі спини кролів між контрольною та дослідною групами була вірогідною ($p < 0,05$). Як видно з рисунку 2 концентрація олеїнової кислоти до опромінення становила $28,06 \pm 3,44$ ммоль/л, а після опромінення зменшилася до $16,68 \pm 5,40$ ммоль/л, лінолевої – $25,35 \pm 3$ ммоль/л тенденція до збільшення вмісту стеаринової кислоти в найдовшому м'язі спини кролів дослідної групи. Так, на 5-у добу вміст вищезгаданої кислоти в найдовшому м'язі спини кролів дослідної групи зріс до $3,84 \pm 0,6$ ммоль/л, на 36-у добу – до $4,88 \pm 0,5$ ммоль/л, на 56-у добу – до $5,54 \pm 0,61$ ммоль/л і на 76-ту добу установлений максимальний вміст стеаринової кислоти в найдовшому м'язі спини кролів дослідної групи і становив $5,38 \pm 0,81$ ммоль/л (до опромінення $6,16 \pm 0,6$ ммоль/л) на 12,5% менше норми, практично повернувся до вихідного значення. Слід відзначити, що вірогідна різниця між контрольною і дослідною групами була встановлена після опромінення, на 36-у, 56-у і на 76-у доби досліді.

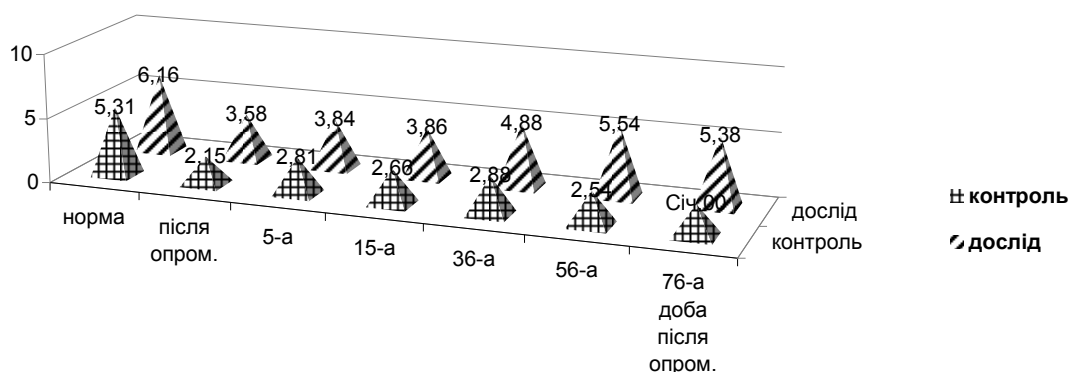


Рис. 1. Вміст стеаринової кислоти в загальних ліпідах найдовшого м'яза спини піддослідних кролів

На рисунку 2 поданий вміст олеїнової кислоти загальних ліпідів найдовшого м'язу спини. У результаті досліджень встановлено, що гамма-опромінення викликало зменшення вмісту вищезгаданої жирної кислоти як у контрольній, так і в дослідній групах. Так, якщо вміст олеїнової кислоти у найдовшому м'язі спини кролів контрольної групи становив $32,26 \pm 5,34$ то після опромінен-

ня зменшився на 42,5% – до $18,56 \pm 3,64$ ммоль/л. У наступному спостерігалася тенденція до збільшення вмісту олеїнової кислоти загальних ліпідів найдовшого м'язу спини кролів контрольної групи, однак до норми він не повернувся (норма $32,26 \pm 5,34$ ммоль/л, і в кінці досліді становив $25,64 \pm 3,30$ ммоль/л).

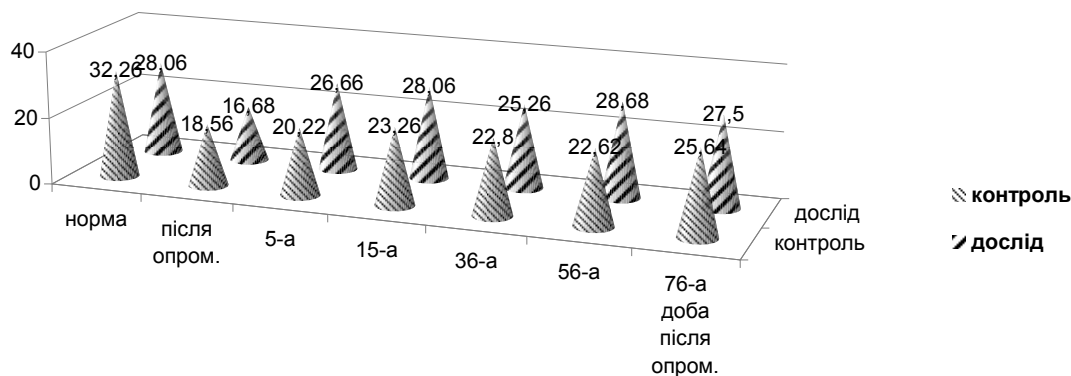


Рис. 2. Вміст олеїнової кислоти в загальних ліпідах найдовшого м'язу спини кролів

Аналіз вмісту олеїнової кислоти загальних ліпідів найдовшого м'язу спини кролів дослідної групи показує, що він був меншим в порівнянні з контрольною групою лише на 5-у і на 36-у добу дослідження, а на решта днів дослідження був більшим від контрольної групи. Так, на 5-у добу вміст олеїнової кислоти в дослідній групі становив $26,66 \pm 4,64$ ммоль/л, а у контрольній – $22,28 \pm 2,88$ ммоль/л, на 15-у, відповідно $28,26 \pm 7,46$ ммоль/л і $23,26 \pm 5,84$ ммоль/л і на 56-у добу – $28,68 \pm 5,02$ ммоль/л і $22,62 \pm 4,48$ ммоль/л. Слід відзначити, що різниця між контрольною і дослідною групами була не вірогідною ($p > 0,05$). Аналогічна картина спостерігалася у вмісті лінолевої та ліноленової кислоти. Гамма-опромінення викликало зменшення вмісту лінолевої та ліноленової кислот загальних ліпідів найдовшого м'язу спини кролів як контрольної, так і дослідної груп. Застосування екзогенного піридоксину не викликало вірогід-

ної різниці вмісту вищезгаданих кислот і протягом дослідження вміст її в контрольній групі був близьким до дослідної, крім умісту ліноленової кислоти на 56-у і 76-у добу, який був не вірогідно вищим у дослідній групі.

На рисунку 3 поданий вміст арахідонової кислоти, який після опромінення був вірогідно більшим у кролів дослідної групи, яким вводили піридоксин на 5-у, 15-у, 36-у, 56-у і 76-у добу ($p < 0,05$). Так, на 5-у добу вміст арахідонової кислоти загальних ліпідів найдовшого м'язу спини контрольної групи становив $1,05 \pm 0,2$ ммоль/л, дослідної $2,10 \pm 0,1$ ммоль/л, на 15-у добу, відповідно $1,0 \pm 0,4$ ммоль/л і $2,11 \pm 0,6$ ммоль/л, на 36-у – $1,06 \pm 0,8$ ммоль/л і $2,10 \pm 0,5$ ммоль/л, на 56-у – $1,05 \pm 0,6$ ммоль/л і $2,13 \pm 0,4$ ммоль/л і на 76-у добу в контрольній групі становив $1,08 \pm 0,4$ ммоль/л, а у дослідній – $2,14 \pm 0,2$ ммоль/л.

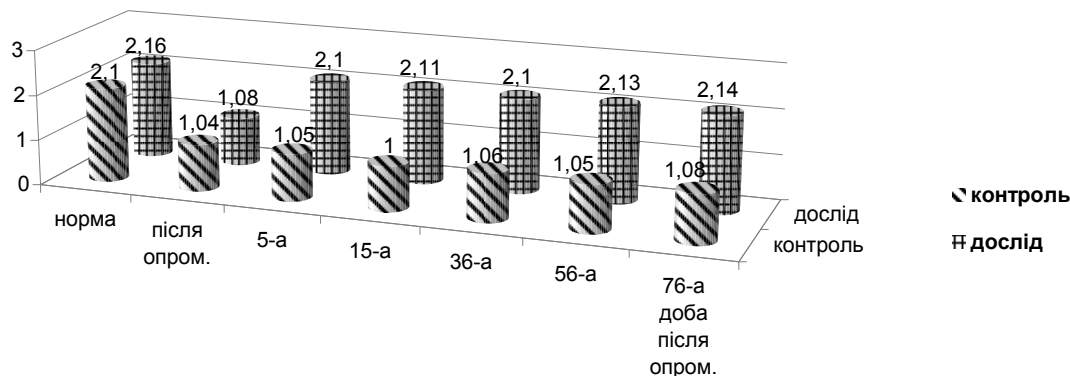


Рис. 3. Вміст арахідонової кислоти в загальних ліпідах найдовшого м'язу спини кролів

Автори [2,5] вказують, що арахідонова кислота бере активну участь в процесі роботи серця, особливо в процесі відкривання неселективних мегаканалів або мітохондріальних пор. З отриманих нами експериментальних результатів концентрація арахідонової кислоти в найдовшому м'язі спини кролів дослідної групи, яким внутрішньом'язово вводили піридоксин гідрохлориду була вірогідно більшою, порівнянно з контрольною групою. Отримані нами експериментальні дані електрокардіограми, які ми тут не подаємо, підтверджують активну участь арахідонової кислоти в роботі серцевого м'язу, так як у кролів дослідної групи електрокардіограма була значно кращою, ніж у контрольній групі.

Оскільки жирні кислоти виконують цілу низку життєвих функцій і забезпечують процеси росту, розвитку й розмноження, то важливе значення цих сполук для ор-

ганізму тварин зумовлене їхньою високою енергетичною цінністю та багатограним впливом на основний обмін і тканинний метаболізм [3, 4], в наших дослідженнях за впливу піридоксину зменшення концентрації зазначених жирних кислот найдовшого м'язу спини було не вірогідним, що позитивно вплинуло на життєві функції кролів дослідної групи.

З отриманих експериментальних даних можна зробити висновок, що гамма-опромінення викликало зменшення вмісту більшості жирних кислот найдовшого м'язу спини кролів, а застосування піридоксину нівелювало негативний вплив радіації на концентрацію жирних кислот найдовшого м'язу спини кролів дослідної групи.

Практичні рекомендації. На основі отриманих експериментальних даних позитивного впливу вітаміну B₆ за гамма-опромінення з метою профілактики та ліку-

вання уражень кролів рекомендуємо вводити внутрішньом'язово піридоксин гідрохлориду в дозі 1 мл на голову. Отримані результати профілактики та лікування гамма-опромінення на лабораторних тварин з застосуванням вітаміну В₆ дозволяють вважати піридоксин радіопротектором і використовувати цю властивість його у виробничих умовах.

Висновки. Гамма – опромінення викликало вірогідне зменшення вмісту стеаринової, олеїнової, арахідонової кислоти. Застосування екзогенного піридоксину нівелювало негативний вплив радіації на вміст стеаринової, олеїнової, арахідонової кислот загальних ліпідів найдовшого м'яза спини кролів. Вірогідна різниця вмісту жирних кислот загальних ліпідів найдовшого м'яза спини кролів між контрольною та дослідною групами встановлена стеаринової кислоти на 36-у, 56-у і 76-у добу, олеїнової кислоти – на 56-у добу і арахідонової кислоти – на 5-у, 15-у, 36-у і 76-у добу ($p < 0,05$).

С. Костюк, канд. биол. наук

НИИ физиологии и экомунологии животных и птицы ЛНУВМ и БТ имени С.З.Гжицкого, Львов,

О. Бусенко, проф.

Национальный университет биоресурсов и природопользования, Киев

ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ОБЩИХ ЛИПИДОВ ДЛИНОЙ МЫШЦЫ СПИНЫ КРОЛЕЙ ПОД ВЛИЯНИЕМ ГАММА-РАДИАЦИИ ПРИ ДЕЙСТВИИ ПИРИДОКСИНА

Установлено, что гамма – облучение привело к уменьшению содержания большинства жирных кислот продолговатой мышцы спины кролей, а применение пиридоксина нивелировало негативное влияние радиации на содержание жирных кислот.

Ключевые слова: гамма – облучение, жирные кислоты, пиридоксин.

S. Kostyuk, PhD.

Institute of Physiology and Animal ekoimmunology S.Z.Hzhytskoho, Lviv,

O. Busenko, Prof

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv

FATTY ACID COMPOSITION OF TOTAL LIPIDS LONGER RABBIT UNDER THE INFLUENCE OF GAMMA RADIATION IN ACTION PYRIDOXINE

Established that gamma irradiation caused a decrease in the content of most fatty acids longest back muscle of rabbits, and the use of pyridoxine graded negative impact of radiation on the content of fatty acids.

Keywords: gamma irradiation, fatty acid, pyridoxine.

УДК 578.828.1:616.98:616-006.52-02:618.146-006.6-055.2-053.81/82-036.22(477)

Г. Артемчук, асп., О. Ковалюк, канд. мед. наук, доц.,

І. Дзюблик, д-р мед. наук, проф., зав. кафедри вірусології

Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л. Шупика МОЗ України, Київ

ОСОБЛИВОСТІ ПОШИРЕННЯ ВІРУСІВ ПАПІЛОМИ ЛЮДИНИ ВИСОКОГО КАНЦЕРОГЕННОГО РИЗИКУ У ЖІНОК ВІКОМ 19-25 РОКІВ В УКРАЇНІ

В статті представлені результати власних досліджень, які свідчать про широке поширення вірусів папіломи людини високого канцерогенного ризику серед жінок віком 19-25 років в Україні. На основі методу полімеразної ланцюгової реакції визначено домінуючі генотипи ВПЛ у ряді регіонів України. Встановлено відсоток моно- та мікст-інфікування вірусами папіломи людини високого та низького канцерогенного ризику.

Ключові слова: віруси папіломи людини, генотипи високого канцерогенного ризику, полімеразна ланцюгова реакція, домінуючі генотипи, рак шийки матки, специфічна профілактика.

Вступ. Віруси папіломи людини (ВПЛ) являють собою групу ДНК-вісних вірусів, що уражують базальні епітеліальні клітини шкірних покривів (шкірні типи ВПЛ), а також слизових оболонок верхніх дихальних шляхів, ротової порожнини і аногенітальної області організму людини (генітальні типи ВПЛ). Генітальні типи ВПЛ спричиняють розвиток папіломавірусної інфекції (ПВІ), основними клінічними формами якої є гострокінцеві кондиломи та диспластичні ураження, що призводять до інвазивного раку. Етіопатогенетична роль тривалої персистенції типів ВПЛ високого канцерогенного ризику (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) у виникненні важких онкогенних уражень епітелію, злаякісної трансформації клітин та розвитку раку шийки матки (РШМ) є науково обґрунтованою та доведеною [1, 2, 3, 4].

Список використаних джерел

1. Дьоміна Е.А. Радіогенні цитогенетичні ефекти у учасників ліквідації аварії на Чорнобильській АЕС 2002 года: автореф. дис. на здобуття вченого ступеня д-ра біол. наук.: спеціальність 03.00.13 "Фізіологія людини і тварин" / Дьоміна Е.А. – Київ, 2002. – 36 с.
2. Шиманська Т.В. Участь метаболітів арахідонової кислоти у розвитку репер фузійних порушень функції серця / Т.В. Шиманська // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія, 2009. – №3. – С.17–22.
3. Янович В.Г. Обмен липидов у животных в онтогенезе / Янович В.Г., Лагодюк П.З. – М.: Агропромиздат, 1991. – 316 с.
4. Influence of dietary conjugated linoleic acids (CLA) and age at slaughtering on meat quality and intramuscular collagen in rabbits / [Corino C., Filetti F., Jambacorta M. e. al.]. – Meat Science, 2003. – Vol.66. – P. 97 – 103.
5. Griffiths E., Halestrap A. Mitochondrial non specific pores closed during cardiocirculatory arrest after open heart surgery / E. Griffiths, A. Halestrap – Biochem. J., 1995. – Vol. 288. – P. 93–98.
6. Maertens L. Fats in rabbit nutrition: a review / Maertens L. – World Rabbit Science, 1998. – Vol.6. – P.341–348.
7. Marounek M. Effect of caprylic, capric and oleic acid growth of rumen and rabbit caecal bacteria / Marounek M., Skivanova V., Savka O. – J. Anim. Feed Sci., 2002. – Vol.11. – P. 507–516.
8. Volpe J. Mechanisms and regulation of biosynthesis of saturated fatty acids / Volpe J., Vagelos P. – Physiol. Rev., 1976. – Vol.56. – P.339–417.

Надійшла до редколегії 17.04.14

найбільш уразливими до інфікування виявились особи від 18 до 29 років. Згідно анкетування підлітків у ряді регіонів Росії, більше 80% опитаних на момент досягнення 19-річного віку були статеві активні [10].

Географічні коливання поширеності ВПЛ характерні не тільки для виявлення ПВІ, але і для розподілу окремих генотипів ВПЛ, особливо високого канцерогенного ризику (ВКР), що є предметом пильної уваги дослідників у багатьох країнах світу [2, 3, 11, 12, 13, 14]. Наявність даних щодо особливостей циркуляції висококанцерогенних генотипів ВПЛ в Україні є необхідною науково обґрунтованою складовою прогнозування ефективності вакцинопрофілактики онкогінекологічної патології з метою подальшого її проведення. Молекулярно-генетичні дослідження, проведені на території України, свідчать про широке поширення ВПЛ серед жінок [15, 16, 17, 18]. Проте, на сьогоднішній день питання особливостей розповсюдження ВПЛ високого канцерогенного ризику серед підлітків та молодих жінок досліджено недостатньо і потребує подальшого детального вивчення.

Метою дослідження було визначення особливостей поширення висококанцерогенних типів ВПЛ, які спричинюють розвиток передракових станів і раку шийки матки, у жінок віком 19-25 років, що проживають в Україні.

Матеріали та методи досліджень. У дослідженні взяли участь 5 закладів охорони здоров'я у різних регіонах України: Дніпропетровський, Донецький, Полтавський, Чернігівський, Київський областях та в м. Києві. Всього було відібрано 1562 зразка клінічного матеріалу (зішкреби епітелію шийки матки). Категорію обстежених склали жінки у віці від 15 до 70 років з фоновою патологією шийки матки, з діагнозом CIN I-III, а також клінічно здорові жінки. Для аналізу спектра і частоти домінуючих типів папіломавірусів ВКР всіх обстежених жінок було за віком поділено на шість груп, а саме: група №1 – 15-18 років; група №2 – 19-25 років; група №3 – 26-35 років; група №4 – 36-45 років; група №5 – 46-55 років; група №6 – 56-70 років. До групи № 2 (основної) були відібрані жінки у віці від 19 до 25 років (середній вік – $22,75 \pm 1,74$ років), які проживають у Дніпропетровській (39 осіб), Донецькій (30 осіб), Полтавській (30 осіб), Чернігівській (31 осіб), Київській областях та в м. Києві (66 осіб). Всього – 196 жінок.

Забір досліджуваного матеріалу проводили за допомогою цервікальної цитощітки. Перед відбором матеріалу з поверхні шийки матки стерильним марлевим тампоном видаляли слиз і виділення піхви, після цього вводили робочу частину цитощітки в цервікальний канал і робили два-три повних оберти за годинниковою стрілкою. Робочу частину цитощітки, що містить клінічний матеріал, поміщали в пробірку з транспортним середовищем з муколітиком (ТСМ "Амплісенс®"). Для проведення досліджень методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) отриманий зішкреб доставляли в лабораторію з дотри-

манням протиепідемічних вимог та умов "холодового ланцюгу" згідно рекомендацій виробника тест-систем.

Були використані такі методи дослідження: розширена кольпоскопія, цитологічний, гістологічний та молекулярно-генетичний методи. Для генотипування ВПЛ застосовували метод мультиплексної ПЛР з гібридаційно-флуоресцентною детекцією. Використано комерційні діагностичні тест-системи "АмпліСенс® ВПЛ ВКР генотип-FL" для виявлення і диференціації ДНК ВПЛ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типів, "АмпліСенс® ВПЛ 6/11-FL" і "HPV квант21". Комплект реагентів "HPV квант 21" використовували для виявлення, типування та кількісного визначення ДНК ВПЛ низького (6, 11, 44) і високого (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 і 82) канцерогенного ризику.

При роботі з тест-системами "АмпліСенс® ВПЛ ВКР генотип-FL" і "АмпліСенс® ВПЛ 6/11-FL" використано ампліфікатор "PalmCycler" (CorbettResearch, Австралія) і флуоресцентний ПЛР-детектор "Ала-1/4" (BioSan, Латвія). Для роботи з тест-системою "HPV квант 21" використано ампліфікатор ДТ-96 ("ДНК Технологія", Росія).

Обробка отриманих даних проводилася в пакеті програм MicrosoftAccess 2010, MicrosoftExcel 2010, Statistica 6.0.

Отримані результати та їх обговорення. У результаті дослідження у групі жінок віком 19-25 років було встановлено значне поширення ВПЛ високого канцерогенного ризику – в середньому $35,71 \pm 0,57\%$ випадків для досліджуваних регіонів. У Дніпропетровській області домінували ВПЛ ВКР 16, 31, 53 типів; у Донецькій – 16 генотипу; у Полтавській – 16, 31 і 18 типів; в Києві та Київській області – 16, 33, 56 типів; у Чернігівській області – 16 генотипу.

ВПЛ ВКР 16 і 31 генотипів склали відповідно 37,14% і 14,29% від загального числа позитивних випадків. В результаті лонгітюдних зарубіжних досліджень групи жінок віком 15-25 років було показано, що саме для 16 та 31 генотипів ВПЛ ймовірність самоелімінації є найменшою. До того ж, ВПЛ-16 пов'язують із 20-кратним збільшенням ризику розвитку цервікальної інтраепітеліальної неоплазії. Зазначена кратність виявилась найвищою серед генотипів високого канцерогенного ризику. ВПЛ-31 пов'язують із 8-кратним збільшенням ризику розвитку інтраепітеліальних неоплазій. Міжнародне перехресне дослідження ролі різних генотипів ВПЛ у розвитку інвазивного раку шийки матки показало, що найбільш розповсюдженими генотипами ВПЛ при зазначеній патології були 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 та 58 [19].

У досліджуваній нами групі жінок інфікування одним генотипом ВПЛ високого канцерогенного ризику (моно-інфекція) спостерігалось в 40% позитивних випадків (28 зразків клінічного матеріалу) (рис.1). Згідно зарубіжним дослідженням, інфікування навіть одним генотипом суттєво збільшує ризик ко-інфікування іншими генотипами ВПЛ [19].

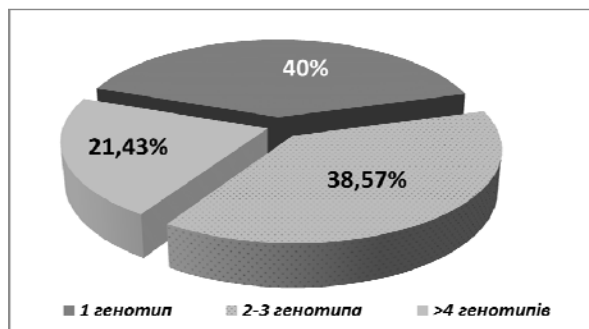


Рис. 1. Частота моно- та мікст-інфікування вірусами папіломи людини жінок віком 19-25 років

Окремо слід зазначити, що у 5 зразках (2,55% загальної кількості дослідженого матеріалу) була виявлена ДНК ВПЛ виключно низького канцерогенного ризику (НКР) (Табл. 1).

Так, по 2-3 генотипи ВПЛ було виявлено у 27 зразках клінічного матеріалу (38,57% загальної кількості позитивних випадків). Серед них 6 зразків (8,57% загальної кількості позитивних випадків) містили ДНК ВПЛ як високого, так і низького канцерогенного ризику.

Таблиця 1. Частота виявлення ВПЛ високого та низького канцерогенного ризику в залежності від кількості одночасно виявлених генотипів

Кількість генотипів	ВКР		ВКР+НКР		НКР	
	n ¹	% ²	n ¹	% ²	n ³	% ⁴
1	28	40±0,93	-	-	5	2,55±0,71
2-3	21	30±1,00	6	8,57±1,14	0	0
>3	5	7,14±1,15	10	14,29±1,11	0	0
Всього	54	77,14±0,57	16	22,86±1,05	5	2,55±0,71

Примітки: 1 – абсолютна кількість зразків клінічного матеріалу серед загальної кількості позитивних зразків клінічного матеріалу, в яких було виявлено ДНК ВПЛ; 2 – частота виявлення ДНК ВПЛ серед загальної кількості позитивних зразків; 3 – абсолютна кількість зразків клінічного матеріалу серед загальної кількості досліджених зразків, в яких було виявлено ДНК ВПЛ виключно низького канцерогенного ризику; 4 – частота виявлення ДНК ВПЛ низького канцерогенного ризику серед загальної кількості досліджених зразків клінічного матеріалу

Більше трьох генотипів ВПЛ було виявлено у 15 зразках клінічного матеріалу (21,43% загальної кількості позитивних випадків), 10 з яких містили також і ДНК ВПЛ низького канцерогенного ризику. Ризик розвитку цервікальної інтраепітеліальної неоплазії I-III ступеню суттєво зростає при інфікуванні декількома генотипами одночасно. Мікст-інфікування декількома генотипами ВПЛ супроводжується суттєво вищим вірусним навантаженням ВПЛ 16 генотипу, ніж при моноінфікуванні 16 генотипом [19].

Представлені результати загалом в деякій мірі відрізняються від даних, отриманих іншими авторами по Східній Європі (Російська Федерація, Польща, Угорщина, Білорусь і Латвія) за 2010 рік. Частота виявлення ВПЛ ВКР серед дівчат молодше 25 років у Східній Європі склала близько 25%. Таким чином, у порівнянні із зазначеним регіоном, в Україні спостерігається достовірно вищий рівень ВПЛ-інфікування жінок вікової групи 19-25 років (35,71%). Разом з тим, домінування зберігається за 16 і 31 генотипами, що збігається з результатами наших досліджень і свідчить на користь широкого застосування профілактичних вакцин проти ПВІ з метою профілактики РШМ та інших ВПЛ-асоційованих патологій.

Висновки

1. Вперше в Україні було визначено особливості поширення високоонкогенних типів папіломавірусів, які спричиняють розвиток передракових станів і раку шийки матки, у жінок віком 19-25 років.

2. Результати проведених досліджень свідчать про широке розповсюдження в Україні вірусів папіломи людини високого канцерогенного ризику (35,71%) серед жінок віком 19-25 років.

3. Визначено домінуючі генотипи ВПЛ (16 та 31) у ряді регіонів України серед жінок репродуктивного віку.

4. Встановлено відсоток мікст-інфікування двома і більше генотипами ВПЛ одночасно (60% позитивних випадків).

Визначення особливостей циркуляції ВПЛ серед жінок різних вікових груп в перспективі дозволить науково обґрунтувати генотип-специфічну та прогнозовану ефективність застосування в Україні вакцинації проти папіломавірусної інфекції.

Список використаних джерел

1. HaraldzurHausen. Papillomaviruses in the causation of human cancers – a brief historical account // Virology. – 2009. – Vol. 384 (Issue 2). – P. 260–265.
2. Xavier Castellsagué. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer // Gynecologic Oncology. – 2008. – Vol. 110. – P. S4–S7.

3. F.X. Bosch et al. Epidemiology and Natural History of Human Papillomavirus Infections and Type-Specific Implications in Cervical Neoplasia // Vaccine. – 2008. – Vol. 26S. – P. K1–K16.

4. Дзюблик В., Ковалюк О. В. Папіломавірусна інфекція: погляд на проблему лікаря-вірусолога // Український хіміотерапевтичний журнал. – 2012. – № 1-2 (25). – С. 98–106.

5. Профілактика рака шийки матки: Руководство для врачей/под ред. акад. РАМН Т.Г. Сухих, проф. В.Н. Прилепской. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: МЕДпресс-информ, 2012. – 192 с.

6. Collins S.I., Mazloomzadeh S., Winter H. Proximity of first intercourse to menarche and the risk of human papillomavirus infection: a longitudinal study // Int J Cancer. – 2005. – Vol. 114. – P. 498–500.

7. Rachel L. Winer, Qinghua Feng, James P. Hughes et al. Risk of Female Human Papillomavirus Acquisition Associated with First Male Sex Partner // The Journal of Infectious Diseases. – 2008. – Vol. 197. – P. 279–282.

8. Satterwhite C.L., et al. Sexually transmitted infections among US women and men: prevalence and incidence estimates, 2008 // Sex Transm Dis. – 2013. – Vol. 40(3). – P. 187–193.

9. М.Р. Рахматулина. Новые возможности комплексной терапии аногенитальной папилломавирусной инфекции // VestnDermatolVenerol. – 2011. – № 2. – С. 79–84.

10. Савельева И.С., Волкова О.И., Городничева Ж.А. Репродуктивное поведение и репродуктивное здоровье глазами подростков: потребности и нужды // Репродуктивное здоровье детей и подростков. – 2006. – № 4. – С. 23–33.

11. Гончаревская З.Л., Теребнева Л.А., Шипулина О.Ю., Роговская С.И. Результаты ВПЧ-генотипирования в скрининге // VIII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием "Молекулярная диагностика-2014", сборник трудов. – 2014. – Том I. – С. 196–197.

12. F. Xavier Bosch*, You-Lin Qiao, Xavier Castellsagué. The epidemiology of human papillomavirus infection and its association with cervical cancer // International Journal of Gynecology and Obstetrics. – 2006. – Vol. 94 (Supplement 1). – P. S8–S21.

13. Еремич В.Ф., Вергейчик Г.И., Гасич Е.Л. и соавт. Генотипы ВПЧ у женщин и детей в Беларуси // VIII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием "Молекулярная диагностика-2014", сборник трудов. – 2014. – Том I. – С. 205–206.

14. Бруснигина Н.Ф., Черневская О.М., Махова М.А. и соавт. Региональные особенности циркуляции вирусов папилломы человека у женщин репродуктивного возраста // VIII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием "Молекулярная диагностика-2014", сборник трудов. – 2014. – Том I. – С. 225.

15. Нікітіна О.Є., Лазаренко Л.М., Нікітін Є.В. таспівавт. Інфікування хворих на передпухлинні захворювання шийки матки папіломавірусами і вірусами простого герпесу // Інфекційні хвороби. – 2013. – № 3 (73). – С. 41–47.

16. Чернышова Л.А. Молекулярные методы диагностики папилломавирусной инфекции и рака шейки матки // Consilium Medicum Ukraina. – 2012. – С. 15–19.

17. Мацас Е.Ю., Михальчук Г.А., Мулькина Е.И., Слободянюк О.Н. Диагностика генотипов вируса папилломы человека при смешанных урогенитальных инфекциях у женщин // VIII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием "Молекулярная диагностика-2014", сборник трудов. – 2014. – Том I. – С. 186–187.

18. Kovaluk O.V., Artemchuk G.P., Kostenko G., Dziublyk I.V. The range and frequency of detection of high-risk on cogenichum an papilloma virus among adolescent girls in Ukraine // Матеріали VII Міжнародної конференції "Біоресурси та віруси", 10-13 вересня 2013, С. 33.

19. Unnop Jaisamram, Xavier Castellsagué, Suzanne M. Garland et al. Natural History of Progression of HPV Infection to Cervical Lesion or Clearance: Analysis of the Control Arm of the Large, Randomised PATRICIA Study // PLoS One. – 2013. – Nov 19;8(11):e79260. doi: 10.1371/journal.pone.0079260.

А. Артемчук, асп., Е. Ковалюк, канд. мед. наук, доц.,
И. Дзюблык, д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой вирусологии
Национальная медицинская академия последидипломного образования имени П.Л. Шупика МЗ Украины, г. Киев

ОСОБЕННОСТИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВИРУСОВ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА ВЫСОКОГО КАНЦЕРОГЕННОГО РИСКА У ЖЕНЩИН В ВОЗРАСТЕ 19-25 ЛЕТ В УКРАИНЕ

В статье представлены результаты собственных исследований, которые свидетельствуют о широком распространении вирусов папилломы человека высокого канцерогенного риска среди женщин в возрасте 19-25 лет в Украине. На основе метода полимеразной цепной реакции определены доминирующие генотипы ВПЧ в ряде регионов Украины. Установлен процент моно-и микстинфицирования вирусами папилломы человека высокого и низкого канцерогенного риска.

Ключевые слова: вирусы папилломы человека, генотипы высокого канцерогенного риска, полимеразная цепная реакция, доминирующие генотипы, рак шейки матки, специфическая профилактика.

H. Artemchuk, PhD stud, O. Kovaliuk, Ph.D., associate professor,
I. Dziublyk, Doctor of Medicine, Professor, Head of the Department of Virology
Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education of Ministry of Health of Ukraine, Kyiv

FEATURES OF DISTRIBUTION OF HIGH CARCINOGENIC RISK GENOTYPES OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS AMONG WOMEN AGED 19-25 YEARS IN UKRAINE

The article presents the results of the studies that indicate widespread occurrence of human papillomavirus of high carcinogenic risk among women aged 19-25 years in Ukraine. Predominant genotypes of HPV are defined for some regions of Ukraine by the use of polymerase chain reaction. The percentage of mono- and mixed-infection with HPV of high and low carcinogenic risk is specified.

Key words: human papilloma virus, genotypes of high carcinogenic risk, polymerase chain reaction, predominant genotypes, cervical cancer, specific prophylaxis.

Наукове видання



ВІСНИК

КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ПРОБЛЕМИ РЕГУЛЯЦІЇ ФІЗІОЛОГІЧНИХ ФУНКЦІЙ

Випуск 1 (17)

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. 9,5. Наклад 300. Зам. № 214-7060.
Гарнітура Arial. Папір офсетний. Друк офсетний. Вид. № Б 4.
Підписано до друку 06.06.14

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