

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 органному 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 УНЦ "Институт биологии" и других научных учреждений. Изложены также новые данные о патофизиологических закономерностях и биохимических механизмах регуляции процессов на клеточном и органном уровнях после воздействия различных физико-химических факторов.

Для преподавателей, научных сотрудников, аспирантов и студентов.

The experimental dates development and function of the plant and animal organisms of research institute and ESC "Institute of Biology". Results of newly pathophysiological aspects and biochemical mechanisms of cell and organism processes regulation under the influence of different factors are presented.

For scientists, professors, aspirants and student.

ВІДПОВІДАЛЬНИЙ РЕДАКТОР РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ	Л.І. Остапченко, д-р біол. наук, проф. Є. О. Торгалло, канд. біол. наук (відп. секр.); С. Є. Вакал, асист. (техн. секр.); С. Сабо, д-р біол. наук, проф. (м. Ірвайн, США. Університет Каліфорнії); О. В. Жолос, д-р біол. наук, проф. (Королівський університет Белфаста, м. Белфаст, Великобританія); М. Шандор, д-р біол. наук, проф. (Західно-Угорський Університет, м. Сомбатхей, Угорщина); С. Юозас, д-р біол. наук, проф. (Інститут ботаніки, м. Вільнюс, Литва); Б. Каленгхем, проф. (м. Кембридж, Великобританія); В. О. Іваниця, д-р біол. наук, проф.; Т. В. Берегова, д-р біол. наук, проф.; Д. Н. Говорун, д-р біол. наук, проф.; Дж. Воллес, д-р біол. наук, проф. (Торонто, Онтаріо, Канада); І. Г. Емельянов, д-р біол. наук, проф.; Е. М. Дзержинський, 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. Макаrchук, 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; www.biovestnik.com ; bulletin.vestnik@gmail.com
Затверджено	Вченою радою ННЦ "Інститут біології" 09.12.15 (протокол № 4)
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
Журнал входить до наукометричних баз / Abstracted and Indexed:	Index Copernicus (з 2012 р. ICV-2013 = 5,93), Cite Factor (з 2014 р.), Research Bible (з 2013 р.). Academic Keys (з 2013 р.), DOAJ (з 2013 р.), EBSCO.EJS (з 2012 р.), Free medical journals list of Geneva Foundation for Medical Education and Research (з 2014 р.); HINARI (з 2013 р.); Medical Journals Links (з 2013 р.); OAJI (з 2012 р.); The Knowledge Network (з 2014 р.); Ulrich's Periodicals Directory (з 2012 р.); WorldCat (з 2013 р.); E-Library.ru (з 2014 р.).

ЗМІСТ

Омельченко Ю., Сокур О., Харченко О., Остапченко Л. Метаболізм оксиду азоту в головному мозку щурів із сформованою алкогольною залежністю	5
Присяжнюк А., Нестерук К., Червінська Т., Толстанова Г. Експресія та локалізація Дз-дофомінових рецепторів за умов експериментального виразкового коліту	9
Авдєєва Л., Хархота М., Хархота Г. Скринінг бактерій роду <i>BACILLUS</i> продуцентів екзополімерних речовин з флокулюючою активністю	11
Раєцька Я., Іщук Т., Коваль Т., Джус О., Савчук О. Експериментальне відтворення моделі кислотного опіку стравоходу II-го ступеню	15
Хошімов Н., Насиров К. Дослідження рівня внутрішньоклітинних Ca^{2+} у синапсосомах мозку щурів в нормі і при хронічній алкогольній інтоксикації	19
Польшакова А., Ящук М., Прибисько І., Кобиляк Н., Фалалєєва Т. Параметри ліпідного обміну при глутамат-індукованому ожирінні у щурів за умов корекції пробіотичними штамами лактобацил та біфідобактерій	21
Хушматов Ш. Двофазний кардіотропний ефект алкалоїда аячина	24
Чернозуб А. Особливості змін концентрації кортизолу в сироватці крові юнаків в умовах силового фітнесу	29
Салига Н., Іскра Р. Супероксиддисмутаза та каталазна активність у тканинах щурів за умов стресу та введення окремих амінокислот	33
Воєйкова Д., Любас Г., Кондро М., Степанова Л., Остапченко Л. Характеристика ліпідного складу внутрішньої мітохондріальної мембрани гепатоцитів експериментальних тварин за умов утримання на висококалорійній дієті	37
Клиś Ю., Верьовка С. Зміни протеолізного балансу плазми крові хворих на запальні захворювання та новоутворення верхніх дихальних шляхів	41
Струтинська Н. Сірководень як сигнальна молекула в серцево-судинній системі	43
Ноздренко Д., Корчинська Л., Мірошніченко М. Вплив фосфорорганічних інсектицидів: піриміфосметилу, діазинону та хлорпірифосу на динамічні параметри скорочення <i>m. tibialis anterior</i>	47
Стамбульська У., Мосійчук Н. Вплив гербіциду 2,4-дихлорфеноксоцтової кислоти та азот фіксуючих бактерій на рослини гороху	53
Ларичева О., Цебржинський О. Вільнорадикальні та антиоксидантні процеси в легенях за умов різних світлових режимів	56
Кондратюк Т. Регуляція розвитку мікроскопічних грибів в приміщеннях із збереженням та знищенням паперових українських банкнот	61
Лещенко І., Скочко Н., Вірченко О., Гаділія О., Фалалєєва Т. Вплив моно-, полі- та комбінованих пробіотиків на розвиток ожиріння, викликане глутаматом натрію	65
Довбинчук Т., Базан А., Толстанова Г., Закордонець Л. Рівень транспортних протеїнів AQP8 та CFTR в слизовій оболонці товстої кишки після введення антибіотика цефтріаксона	68
Купа Л., Філімонова Н., Зима І. Статеві відмінності в активності головного мозку людини при визначенні вербального інтелекту	71
Дворченко К., Берник О., Тіхова Є., Вовк А., Короткий О. Окисна модифікація білків сироватки крові щурів за умов експериментального запалення задньої кінцівки щурів	76
Зінабадінова С., Чайковський Ю., Сегеда Т. Особливості структурно-функціонального стану нирок курячих ембріонів при дії волокон азбесту та вуглецевих нановолокон	79

СОДЕРЖАНИЕ

Омельченко Ю., Сокур О., Харченко О., Остапченко Л. Метаболизм оксида азота в головном мозге со сформированной алкогольной интоксикацией	5
Присяжнюк А., Нестерук К., Червинская Т., Толстанов А. Экспрессия и локализация Дз-дофаминовых рецепторов на фоне экспериментального язвенного колита	9
Авдеева Л., Хархота М., Хархота Г. Скрининг бактерий рода <i>BACILLUS</i> продуцентов экзополимерных веществ с флокулирующей активностью	11
Раецкая Я., Ищук Т., Коваль Т., Джус Е., Савчук А. Экспериментальное воспроизведение модели кислотного ожога пищевода II-й степени	15
Хошимов Н., Насиров К. Исследование уровня внутриклеточного Ca^{2+} в синапсоммах мозга крыс в норме и при хронической алкогольной интоксикации	19
Польшакова А., Ящук М., Прибытько И., Н. Кобыляк., Фалалеева Т. Параметры липидного обмена при глутамат-индуцированном ожирении у крыс в условиях коррекции пробиотическими штаммами лактобацилл и бифидобактерий	21
Хушматов Ш. Двухфазный кардиотропный эффект алкалоида аячина	24
Чернозуб А. Особенности изменений концентрации кортизола в сыворотке крови юношей в условиях силового фитнеса	29
Салыга Н., Искра Р. Супероксиддисмутазная и каталазная активности в тканях крыс при действии стресса и введении отдельных аминокислот	33
Воейкова Д., Любас А., Кондро М., Степанова Л., Остапченко Л. Характеристика липидного состава внутренней митохондриальной мембраны гепатоцитов экспериментальных животных при содержании на высококалорийной диете	37
Клысь Ю., Вережка С. Изменения протеолизного баланса плазмы крови при воспалительных заболеваниях и новообразованиях верхних дыхательных путей	41
Струтинская Н. Сероводород как сигнальная молекула в сердечно-сосудистой системе	43
Ноздренко Д., Корчинская Л., Мирошниченко М. Влияние фосфорорганических инсектицидов: пиримифосметила, диазинона и хлорпирифоса на динамические параметры сокращения m. tibialis anterior	47
Стамбульская У., Мосийчук Н. Влияние гербицида 2,4 дихлорфеноксиуксусной кислоты и азотфиксирующих бактерий на биохимические показатели растений гороха	53
Ларичева Е., Цебржинский О. Свободнорадикальные и антиоксидантные процессы в легких в условиях разных световых режимов	56
Кондратюк Т. Регуляция развития микроскопических грибов в помещениях с сохранением и уничтожением бумажных украинских банкнот	61
Лещенко И., Скочко Н., Вирченко А., Гадилия О., Фалалеева Т. Влияние моно-, поли- и комбинированных пробиотиков на развитие ожирения, вызванное глутаматом натрия	65
Довбинчук Т., Базан А., Толстанов А., Закордонець Л. Уровень транспортных протеинов AQP8 и CFTR в слизистой оболочке толстой кишки крыс после введения антибиотика цефтриаксона	68
Купа Л., Филимонова Н., Зима И. Половые отличия в активности головного мозга человека при определении вербального интеллекта	71
Дворщенко К., Берник О., Тихова Е., Вовк А., Короткий А. Окислительная модификация белков сыворотки крови крыс в условиях экспериментального воспаления задней конечности крыс	76
Зинабадинова С., Чайковский Ю., Сегеда Т. Особенности структурно-функционального состояния почек куриных эмбрионов под воздействием волокон асбеста и углеродных нановолокон	79

CONTENTS

Omelchenko Yu., Sokur O., Harchenko O., Ostapchenko L. Oxide metabolism in rat brain with formed alcohol dependence	5
Pryshchyniuk A., Nesteruk K., Chervinska T., Tolstanova G. D3 localization and expression levels during the experimental ulcerative colitis	9
Avdeeva L., Kharhota M., Kharkhota A. Screening of bacteria of the genus bacillus producers of exopolymeric substances with flocculating activity	11
Raetska Ya., Ischuk T., T. Koval., Dzhus O., Savchuk O. Experimental modeling of an acid esophagus of 2 nd degree in immature rats	15
Hoshimov N., K. Nasirov Research of level of intracellular Ca ²⁺ in synaptosomes of the brain of rats in norm and at chronic alcoholic intoxication	19
Polshakova A., Yaschuk M., Kobylak N., Prybytko I., Falalyeyeva T. Parameters of lipid metabolism in glutamate-induced obesity in rats under correction probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria	21
Hushmatov Sh. Biphasic cardiotropic effect of alkaloid ayacine	24
Chernozub A. Features change in concentration of cortisol young men in the power fitness	29
Salyha N., Iskra R. Superoxide dismutase and catalase activity in tissues of rats under the action of stress and injection of some amino acids	33
Voieikova D., Liubas A., Kondro M., Stepanova L., Ostapchenko L. Characterization of lipid composition in inner mitochondrial membrane of hepatocytes experimental animals under conditions of keeping high-calorie diet	37
Klys' Yu.G., Verevka S. Alterations of proteolytic balance in blood plasma at inflammatory diseases and tumors of upper respiratory tract	41
Strutynska N. Hydrogen sulfide as a signaling molecule in the cardiovascular system	43
Nozdrenko D., Korchinska L., Miroshnychenko M. Effect of organophosphorus insecticides: pirimiphosmethyl, diazinon and chlorpyrifos, on dynamic characteristics of the frog muscle m. tibialis anterior fiber contraction	47
Stambulska U., Mosiichuk N. Effect of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid herbicide and nitrogen – fixing bacteria on biochemical parameters of pea plants	53
Larycheva O., Tsebrzhynskyy O. Free radical and antioxidant processes in lungs under different light regimes	56
Kondratiuk T. Regulation of the development of microscopic fungi in the areas with the preservation and destruction of banknotes Ukrainian paper	61
Leshchenko I., Skochko N., Virchenko O., Gadiliya O., Falalyeyeva T. Effect of mono-, poly- and combined probiotics on the development of obesity caused by monosodium glutamate	65
Dovbynychuk T., Bazan A., Tolstanova G., Zakordonets L. Level and transport proteins AQP8 and CFTR in the lining of the colon of rats after antibiotic therapy	68
Kupa L., Filimonova N., Zima I. Sex differences in human brain activity in determining verbal intelligence	71
Dvorshchenko K., Bernuk O., Tihova E., Vovk A., Korotkiy O. Oxidative modification of proteins of blood serum of rats in experimental inflammation of rat hind limbs	76
Zinabadinova S., Tchaikovskiy Yu., Segeda T. Features of structural and functional conditions of chicken embryo kidneys which are caused by asbestos fibers and carbon nanowires	79

МЕТАБОЛІЗМ ОКСИДУ АЗОТУ В ГОЛОВНОМУ МОЗКУ ЩУРІВ ІЗ СФОРМОВАНОЮ АЛКОГОЛЬНОЮ ЗАЛЕЖНІСТЮ

Досліджено метаболізм оксиду азоту в головному мозку щурів із сформованою алкогольною залежністю. Виявлено активацію NO-синтази на початкових етапах досліджень (4 тиждні) за рахунок індукції як iNOS, так її конститутивних ізоформ (nNOS та eNOS), тоді як довгосистемне споживання алкоголю супроводжується активацією тільки cNOS, яке залежить від концентрації вільних іонів кальцію. Дослідження пулу стабільних метаболітів NO: нітрит- і нітрат аніонів (NO_2^- , NO_3^-) та нітрозотіолів виявило збільшення їх вмісту на всіх етапах досліджень.

Ключові слова: NO-синтаза, мозок, алкогольна залежність.

Вступ. Систематичне вживання алкоголю призводить до ураження органів і тканин, в результаті чого виникають захворювання нервової (алкогольна енцефалопатія), серцево-судинної (алкогольна кардіоміопатія), травної систем (алкогольний гастрит, алкогольний ентероколіт), печінки (алкогольний гепатит, алкогольний цироз печінки, жировий гепатоз), підшлункової залози (алкогольний панкреатит, геморагічний панкреонекроз). Клінічними та експериментальними дослідженнями встановлено, що при дії етанолу в першу чергу змінюється функціональний стан ЦНС. Спектр дії етанолу на обмін речовин і функції мозку доволі широкий і різноманітний за своїми цитохімічними, фізіологічними та морфологічними проявами, а також психічними наслідками [1]. В головному мозку хворих на алкоголізм розвиваються порушення, які характеризуються розширенням судин оболонок мозку, периваскулярним набряком, розладом кровообігу, некрозом. Нейрони неокортексу, ядер гіпоталамуса і мозочка знаходяться в стані гострого набухання з тотальним хроматолізом, різко знижується число клітинних елементів у верхніх шарах кори. Нерідко виявляється церебральна і мозочкова дегенерація, яка є основою розвитку деменції і атаксії [2]. Зміни поведінки, мотиваційно-емоційні розлади, симптоми психопатологічних станів, які характерні для алкоголізму, мають прямий зв'язок з порушенням функціонування нейромедіаторних систем. Проникаючи через гематоенцефалічний бар'єр в мозок, етанол та його метаболіти впливають на біохімічні процеси в нервових клітинах. В першу чергу етанол вражає нейрони нової кори, гіпокампа, зубчастої звивини і півкуль мозочка, впливаючи на нейромедіатори і змінюючи синаптичну передачу. Системна дія етанолу пов'язана з редукцією ГАМК-ергічної передачі і посиленням збуджувачих глутамат- і холінергічних механізмів [3]. Наслідком таких процесів є збільшення проникності плазматичних мембран, порушення кальцієвого гомеостазу, індукція окисного стресу, що у свою чергу призводить до загибелі нервових клітин [4]. Порушення фізіологічних функцій при алкоголізмі пов'язана також із впливом етанолу на NO-ергічну систему мозку. Оксид азоту (NO) приймає участь у формуванні нейрональної пам'яті, модулює процеси синаптичної передачі, впливає на функціональний стан глутаматних рецепторів, відіграє важливу роль в контролі мозкового кровотоку. Джерелом NO в ЦНС є нейрони, нейрогліальні клітини (астроцити), клітини мікроглії та ендотелій кровоносних судин [5]. Існує декілька типів NOS: нейрональна, конститутивна (nNOS), яка каталізує синтез NO в нейронах під впливом глутамату; ендотеліальна, конститутивна (eNOS), яка синтезує NO в ендотеліальних клітинах судин під впливом ацетилхоліну, брадикініну, а також змін тиску й потоку крові в судинах; індукційна (iNOS) ізоформа ферменту в макрофагах, мікроглії, астроцитах, гладенько-м'язових клітинах судин, яка синтезує NO після

активації цитокінами [6]. Основними ланками циклу перетворень NO є його окиснення до NO_2^- та NO_3^- та нітрозилування білків з утворенням нітрозотіолів, які є певним маркером нітрозативного стресу і однією із форм депоновання NO [7-9]. Таким чином, стабільність фізіологічної дії оксиду азоту забезпечує NO-синтазна активність, нітрат- і нітритредуктазна активність та наявність достатнього пулу депонованого NO. Тому, порушення функціонування цієї системи, зміни експресії різних ізоформ NO-синтаз, нестача або гіперпродукція NO призводить до дисбалансу вмісту активних форм азоту та кисню і, як наслідок, до нітрозативного та оксидативного стресу. Метою роботи було з'ясувати особливості метаболізму активних форм азоту в головному мозку щурів із сформованою алкогольною залежністю.

Матеріали і методи. Дослідження проведені на білих неплідних статевозрілих щурах-самцях масою 180-200 г. Проведенні дослідження відповідають основним вимогам щодо утримання та роботи з лабораторними тваринами згідно правил Європейської конвенції щодо захисту тварин, які використовуються в експериментальних дослідженнях та інших наукових цілях (Страсбург, 1986 р.) та згідно етичних норм у відповідності до українського законодавства. Алкогольна залежність у тварин в хронічному експерименті формувалась в умовах вільного вибору між 40 % розчином етанолу та водою протягом 2 місяців [10]. Щурів утримували на стандартному раціоні віварію з вільним доступом до води. Алкогольну залежність формували за наступною схемою: щурів розсаджували в індивідуальні клітки з двома пляшками: одна містила мірну кількість води, а інша – 40% розчину етанолу. Кожної доби протягом місяця проводили вимірювання кількості випитого етанолу. Через місяць після початку експерименту тварин розподіляли на 2 групи. До 1 групи відносили інтактних тварин (контроль), до 2 групи – щурів з сформованою алкогольною залежністю, у яких споживання етанолу протягом доби становило 2 мл та більше. Тварин забивали методом дислокації шийних хребців, декапітували, після чого шляхом розтину черепної коробки мозок тварин видаляли з основи черепа, підрізавши черепно-мозкові нерви, промивали фізіологічним розчином та в подальшому гомогенізували. Інтенсивність окисного перетворення L-аргініну, що супроводжується синтезом оксиду азоту *de novo*, оцінювали за активністю ізоферментів NO-синтаз – кальцій залежної, конститутивної (cNOS) і кальційнезалежної, індукційної (iNOS) синтази [11]. Визначення загальної активності NO-синтази в клітинах мозку щурів проводили стандартним спектрофотометричним методом. Визначення активності NO-синтази засноване на комбінації класичного методу [12] та сучасної його модифікації [11], пристосованої до спектрофотометричного вимірювання одного з продуктів реакції – L-цитруліну. Водночас в гомогенаті головного мозку визначали вміст стабільних метаболітів оксиду

азоту – нітрит-аніонів (NO_2^-) і нітрат-аніонів (NO_3^-). Вміст нітрит-аніонів визначали за допомогою реактиву Гріса за методом Гріна [13]. Вміст нітрат-аніонів обчислювали за бруциновим методом [13]. Для оцінки процесів нітрозильовання визначали вміст нітрозотіолів [13]. Експериментальні дані обробляли методами варіаційної статистики із використанням програми Statistica 7 з визначенням t-критерію Стьюдента. Значення $p < 0,05$ вважали статистично достовірним.

Результати та їх обговорення. Відомо, що за нормальних умов NO постійно утворюється в головному мозку, забезпечує ендотеліальну цитопротекцію, контролює осциляторну активність нейронів, модулює міжнейрональні комунікації, синаптичну пластичність, стан рецепторів, внутрішньоклітинну передачу сигналів, вивільнення нейротрансмітерів [14]. В останні роки продемонстрована провідна роль високих концентрацій NO в патогенезі ішемічних / реперфузійних ушкоджень мозку, нейродегенеративних захворювань ЦНС [14]. Тому, дослідження функціонування NO-ергічної системи мозку має

не тільки теоретичне, але і практичне значення, оскільки надає можливість розробки методів направленої фармакотерапії патологічних станів і корекції метаболічних порушень, викликаних хронічним надходженням етанолу.

У результаті досліджень нами було встановлено, що системне споживання алкоголю призводило до зростання активності NO-синтази в клітинах мозку щурів на 280% (4 тиждень експерименту) у порівнянні із контролем (табл.1). В подальші терміни досліджень (5-8 тиждень) активність ферменту залишалась підвищеною і на 8 тиждень експерименту перевищувала контрольні показники на 170 %.

Механізми ушкодження нейронів при гіперпродукції NO універсальні. Надлишкова кількість оксиду азоту пригнічує ферменти дихального ланцюга, циклу Кребса і синтез ДНК [15]. Фрагментація ДНК стимулює активність ядерного ферменту полірибозосинтетази (PARS), що сприяє швидкому виснаженню енергетики клітини та її загибель шляхом некрозу [16].

Таблиця 1. NO-синтазна активність в головному мозку щурів із сформованою алкогольною залежністю

Групи тварин	Загальна активність NOS (мкмоль цитруліну /хв.·мг білка)	Активність iNOS (мкмоль цитруліну /хв.·мг білка)	Активність cNOS (мкмоль цитруліну /хв.·мг білка)
контроль	2,65±0,18	1,14±0,07	1,51±0,13
4тижні	7,34±0,49*	3,26±0,24*	4,08±0,71*
5 тижнів	6,48±0,32*	2,69±0,25*	3,79±0,35*
6 тижнів	6,05±0,51*	2,33±0,10*	3,71±0,43*
7 тижнів	5,83±0,41*	2,09±0,17*	3,73±0,31*
8 тижнів	4,58±0,38*	0,68±0,05*	3,98±0,43*

Примітка: * – вірогідність відміни показника відносно контрольної групи ($p < 0,05$).

Встановлена нами активація NO-синтази в мозку щурів із сформованою алкогольною залежністю може відбуватись за рахунок індукції різних ізоформ ферменту: iNOS (індуцибельна NO-синтаза), яка продукує значно більше $\text{NO}^{\bullet}$ у порівнянні з конститутивними ізоформами cNOS (eNOS -ендотеліальна NO-синтаза та nNOS -нейрональна NO-синтаза).

Оксид азоту, синтезований різними типами NOS, виконує, відповідно, і неоднакові функції. Зазначимо, зокрема, що активація ендотеліальної NOS спостерігається при підвищенні швидкості кровотоку [17]. Збільшення ендотеліальної продукції NO зазвичай сприятливе для організму, оскільки захищає його від гіпертензії, тромбозів, спазмів судин, вільнорадикального ушкодження. Однак експресія iNOS призводить до гіперпродукції $\text{NO}^{\bullet}$ і токсичних ефектів його надлишку. У такому випадку NO продукує мікроглія і лейкоцити. Відомо, що активність індуктибельної синтази (iNOS) зростає за умов запалення і індукується запальними цитокинами, інтерлейкіном β , інтерфероном γ . Виявлено тісний зв'язок системи NO та транскрипційного ядерного фактора κB (NF- κB). Показано, що опосередкована через гліальні клітини нейротоксичність пов'язана з NF- κB -залежною індукцією iNOS з подальшою продукцією активних форм кисню [21]. Вважають, що синтезований цією формою NOS NO забезпечує антигенний гомеостаз мозкової тканини [15]. Оскільки iNOS не потребує кальцію, то фермент може підтримувати високу активність протягом декількох днів.

В результаті проведених досліджень нами було встановлено, що на 4 тиждень експерименту активність iNOS та cNOS перевищували контрольні показники на 286% і 270% відповідно. Таким чином виявлено активацію як цитокинзалежної iNOS, так і Ca_2^{+} залежних ізоформ NO-синтази (eNOS та nNOS). В подальші терміни досліджень (5-8 тиждень) нами встановлено, що активність iNOS знижувалась і на 8 тиждень експерименту

була нижче контрольних показників на 40%, тоді як активність cNOS перевищувала контроль на 245%-264% відповідно протягом всіх термінів досліджень.

Отже, нами показано, що активація NO-синтази в головному мозку щурів із сформованою алкогольною залежністю на початкових етапах досліджень (4 тиждень) відбувається за рахунок індукції як iNOS, так її конститутивних ізоформ (nNOS та eNOS), тоді як довгосистемне споживання алкоголю супроводжується активацією тільки cNOS, які залежить від концентрації вільних іонів кальцію.

Відомо, що внаслідок активації індуктибельної (iNOS) продукується значна кількість оксиду азоту, який при взаємодії з вільними радикалами кисню (супероксид-аніоном) утворює ще більш потужний цитотоксичний радикал – пероксинітрит ($\text{ONOO}^{\bullet}$) який може самостійно реагувати з компонентами клітини або розкладатись до гідроксирадикалу ($\cdot\text{OH}$) – найбільш реакційноздатного кисневого радикала [22]. Ці сполуки здатні окиснювати білки, нуклеїнові кислоти, мембранні ліпіди, що порушує функції клітини та її цілісність. З іншого боку, утворення $\text{ONOO}^{\bullet}$ призводить до різкого підвищення рівня Ca_2^{+} в цитоплазмі, порушення дихальної функції мітохондрій. Високий рівень оксиду азоту в мітохондріях разом із підвищенням в них вмісту Ca_2^{+} перешкоджає поглинанню кисню, призводить до виснаження енергетичних запасів клітини, знижує утворення та утилізацію АТФ, інактивує комплекс дихального ланцюга та подальшої активації нітрозативного стресу та апоптозу [23,24].

Якщо наномольні концентрації оксиду азоту призводять до зворотного інгібування мітохондріального дихання, то мікромольні концентрації NO, які виникають за участі iNOS, спричиняють незворотні зміни ферментів дихального ланцюга [15].

Саме з активністю iNOS найчастіше пов'язують продукцію великої кількості NO, здатного ініціювати гіпоксичний і вільнорадикальний некробіоз у тканині

головного мозку за умов його гіпоксії, ішемії / реперфузії, запалення [14].

Таким чином, ми можемо припустити, що встановлена нами активація NO-синтази на початкових етапах формування алкогольної залежності пов'язана як з індукцією механізмів запалення, так і посиленого надходження Ca_2^+ до клітинного матриксу. В подальші терміни досліджень нами встановлена активація тільки Ca_2^+ -залежних ізоформ ферменту.

Рядом дослідників було показано, що за умов розвитку хронічної алкогольної інтоксикації відбувається зростання вмісту IL1 та IL6 і посилюється цитокін-індукована експресія iNOS астроцитів. Продемонстровано дозозалежний характер впливу етанолу на активність iNOS гліальних клітин *in vitro*: зростання активності ферменту при введенні низьких доз спирту та зниження при високих дозах. З іншого боку, при гострому введенні етанолу показано зниження полії: C-індукованої NO-відповіді у мікроглії. Вважається, що ефект етанолу на iNOS мРНК відбувається не через накопичення ацетальдегіду і ацетату, а через інгібування ядерного транскрипційного фактора (NF- κ B) і STAT-1 сигнальної системи [25,26].

Подальше інгібування активності iNOS пов'язано також з розвитком гіпоксії головного мозку. Було показано, що в процесі адаптації до гіпоксії відбуваються зміни в експресії генів, які кодують різні ізоформи NO-синтаз. Важка гіпоксія індукуює експресію гена iNOS, тоді як адаптація до неї не впливає на цей процес, а збільшує в мозку і судинах експресію eNOS [17]. Крім того, адаптивна реакція, яка розвивається при хронічній алкогольній інтоксикації супроводжується збільшенням числа NMDA рецепторів на постсинаптичних мембранах нейронів. Надмірна стимуляція NMDA рецепторів приводить до зростання току іонів Ca_2^+ у клітину і запуску механізмів клітинного пошкодження [27]. Тому, найбільш вірогідним є залучення в процеси NO-опосередкованої вазодилатації двох ізоформ ферменту-ендотеліальної і нейрональної.

Основними ланками циклу перетворень NO є його окиснення до NO_2^- і NO_3^- та нітрозильовання білків до

нітрозотіолів. В результаті визначення стабільних метаболітів нітрит- і нітрат-аніонів (NO_2^- , NO_3^-) та нітрозотіолів нами показано збільшення їх вмісту на всіх етапах досліджень. Так, на 4 тижень пул NO_2^- і NO_3^- перевищував контрольні показники в 6,5 і 6 разів. Посилення всіх ланок метаболізму активних форм азоту проявляється також в збільшенні депонування NO у вигляді нітрозотіолів, пул яких зростає в 3 рази. В подальші терміни експерименту (5-8 тиждів) вміст нітрит- і нітрат-аніонів та нітрозотіолів знижувався, але перевищував контрольні показники в 4,4; 3,9 та 2,3 рази відповідно (табл.2).

Крім киснезалежного синтезу NO (окиснення L-аргініну) може активуватись киснезнадаждний реутилізаційний шлях утворення NO (відновлення нітрату нітратредуктазою до нітриту, а останнього нітритредуктазою до NO) [28]. Але, в умовах гіпоксії утворення нітрат-аніона при ферментативному окисненні NO є мало-вірогідним, тому можливо припустити, що його утворення залежить від деградації пероксинітриту [29]. Враховуючи ці факти, а також те, що пероксинітрит утворюється лише при одночасній генерації як NO, так і O_2^- підвищення вмісту нітрат-аніона свідчить не лише про активацію синтезу NO, але і активацію генерації супероксидного аніона (що неминуче призводить до утворення H_2O_2 і OH). Отже, одночасно з нітрозативним розвивається і оксидативний стрес [30]. Збільшення пулів нітрит-аніона, може мати адаптивне захисне значення, спрямоване на нейтралізацію високого вмісту пероксинітриту, що утворюється внаслідок високих рівнів генерації як АФК (оксидативного стресу), так і гіпервисоких рівнів синтезу NO (нітрозативний стрес). За умов хронічного споживання алкоголю зростають пули нітрозотіолів (які є в основному нітрозоглутатионом та нітрозильованими білками), при цьому може знижуватись вміст глутатіону, який є потужним низькомолекулярним антиоксидантом і певним чином зм'якшувати функції білків. Нітрозотіоли розглядають як буферну систему, яка грає важливу роль в збереженні і транспорті оксида азоту, тому нітрозотіоли розглядаються як основне депо NO.

Таблиця 2. Вміст NO_2^- , NO_3^- і нітрозотіолів в головному мозку щурів із сформованою алкогольною залежністю

	NO_2^- пмоль/хв•мгбілка	NO_3^- нмоль/хв•мгбілка	нітрозотіоли пмоль/хв•мгбілка
контроль	168,32±13,60	34,26±3,11	164,40±18,88
4тижні	1088,41±98,31*	209,66±6,15*	529,33±39,89*
5 тижнів	1037,90±82,07*	198,42±13,62*	469,01±28,40*
6 тижнів	957,18±57,14*	181,13±7,80*	427,61±24,77*
7 тижнів	881,87±70,15*	159,64±9,12*	389,22±31,47*
8 тижнів	740,01±56,04*	134,62±11,39*	376,29±17,63*

Примітка: * – вірогідність відміни показника відносно контрольної групи ($p < 0,05$)

Таким чином, отримані в результаті наших досліджень дані про метаболізм оксиду азоту за вмістом нітрит- і нітрат-аніонів (NO_2^- / NO_3^-) та продуктів нітрозильовання АФА- нітрозотіолів (в основному глутатіону і продуктів нітрозильовання SH-груп білків) дають підстави стверджувати, що формування алкогольної залежності супроводжується утворенням пероксинітриту і свідчить про прояви нітрозативного і оксидативного стресу в головному мозку щурів. На нашу думку, гіперпродукція оксиду азоту на початкових етапах формування алкогольної залежності (4 тиждів) може розглядатися як наслідок прямої вазотоксичної дії алкоголю на судини головного мозку та відігравати провідну роль у порушенні судинного тонуусу з формуванням стійкої вазодилатації. Зростання вмісту нітрит- і нітрат-аніонів (NO_2^- / NO_3^-) може розглядатися як індикатор інтенсивно-

сті синтезу NOS (iNOS та cNOS) в макрофагах, ендотелію судин і відповідних відділах головного мозку. За участю нітрат- та нітритредуктазних реакцій в організмі нітрат- та нітрит-аніони відновлюються до NO і таким чином, формується цикл оксиду азоту. Захисною реакцією клітин від ушкоджуючого впливу алкоголю є депонування оксиду азоту у вигляді стабільних метаболітів з накопиченням нітрозотіолів, які виконують функції внутрішньоклітинного депо та міжклітинного транспорту оксиду азоту до клітин-мішеней. Нітрозотіоли, зв'язуючи вільний NO, перешкоджають його взаємодії з аніонами супероксиду и таким чином здатні знижувати рівень утворення пероксинітриту. Але, надмірне утворення NO, нітрозотіолів та пероксинітриту викликає блокаду внутрішньоклітинного дихання, пригнічення активності ферментів циклу Кребса та синтезу ДНК, порушує зв'яз-

зми між компонентами мембран клітин і цитоплазматичних білків та поглиблює енергетичний дисбаланс.

Висновок. Таким чином, за умов хронічного споживання алкоголю в головному мозку щурів активуються відповідні ланки циклу NO: NOS та депонування NO у вигляді нітрозотіолів. Підвищення продукції оксиду азоту може відігравати важливу роль у патогенезі алкогольної інтоксикації, оскільки на фоні розвитку оксидативного і нітрозативного стресу створюються усі передумови до продукції значної кількості пероксинітриту, реалізації його цитотоксичної дії. Про утворення пероксинітриту свідчить зростання рівня нітрат-аніону та нітрозотіолів. В той же час, у подальшому, накопичення оксиду азоту може бути одним із факторів посилення токсичної дії етанолу, який реалізується шляхом вторинного утворення токсичних аніон-радикалів.

Список використаних джерел

1. Анохина И.П. Основные биологические механизмы зависимости от психоактивных веществ / И.П. Анохина // Вопросы наркологии. – 2013. – № 6. – С. 40-59.
2. Пиголкин Ю.И. Судебно-медицинская диагностика отравлений спиртами. – М.: МИА, 2006. – 576 с.
3. Fadda F. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. / F. Fadda, Z.L. Rossetti // Progress in Neurobiology. – 1998. – №4. – P. 385–431. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
4. Dahchour Abdelkader. Effects of acamprosate on excitatory amino acids during multiple ethanol withdrawal periods/ Abdelkader Dahchour and Philippe De Witte // Alcoholism: Clinical and Experimental Research. – 2003. – №3. – p. 465-470. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
5. Bredt D.S. Nitric oxide mediates glutamate linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum / D.S. Bredt, S.H. Snyder // Proceedings of the National Academy of Science. – 1989. – № 86. – p. 9030-9033. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
6. Зозуля Ю. Мультифункциональность и метаболизм оксида азота в центральной нервной системе/ Ю.Зозуля, Л.Сенько // Академія медичних наук України. – 2000. – № 1. – С. 3-26.
7. Реутов В.П. / В.П. Реутов, Е.Г. Сорокина, В.Е. Охотин, Н.С. Косицин / Циклическое превращение оксида азота в организме млекопитающих. – М.: Наука, 1998. – 159 с.
8. Ваннин А.Ф. Динитрозильные комплексы железа и S-нитрозотиолы-две возможные формы стабилизации и транспорта оксида азота в биологических системах / А.Ф. Ваннин // Биохимия. – 1998. – 63, №7. – С. 924-938.
9. Сагач В.Ф. Пригнічення оксидативного та нітрозативного стресу як механізм кардіо- і вазопротекторної дії екдистерону за умов експериментального цукрового діабету I типу / В.Ф. Сагач, Ю.П. Коркач, А.В. Коцюрба, О.Д. Присяжна. // Фізіологічний журнал. – 2008. – Т. 54, №5. – С. 46–54.
10. Харченко Н.К. Роль изменений функциональной активности катехоламиновой и опиатной систем в механизме формирования и развития алкогольной зависимости/ Н.К. Харченко // Архив психиатрии. – 1998. – №1(16). – с. 123-128.
11. Chin S. Increased activity and expression of Ca²⁺ – dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats / S. Chin, K. Pandey, S. Shi [et al.] // American Journal of Physiology. – 1999. – Vol. 277, № 5. – P. 797–804. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
12. Salter Mark. Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent nitric oxide synthases / Mark Salter, Richard G. Knowles, Salvador Moncada // FEBS

Letters. – 1991. – Vol. 291, № 1 – P. 145–149. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

13. Green L. Analysis of nitrate, nitrite and [15N]-nitrate in biological fluids / L. Green, D. Wagner, J. Glogowski [et al.] // Analytical of Biochemistry. – 1982. – Vol. 126, № 1. – P. 131–138. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

14. Куровська В.О. Роль оксиду азоту в ішемічних і ішемічнореверсних ушкодженнях головного мозку/ В.О. Куровська, В.П. Пішак, С.С. Ткачук // Буковинський медичний вісник. – 2008. – Т. 12, №4. – С. 143-149.

15. Максимович Н.Е. Особенности формирования уровня оксида азота в плазме крови крыс при ишемических и реперфузионных повреждениях головного мозга / Н.Е. Максимович // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2004. – № 3. – С. 55-60.

16. Зозуля Ю. Мультифункциональность и метаболизм оксида азота в центральной нервной системе/ Ю.Зозуля, Л.Сенько // Академія медичних наук України. – 2000. – № 1. – С. 3-26.

17. Малышев И. Стресс, адаптация и оксид азота / И. Малышев, Е. Манухина // Биохимия. – 1998. – №7. – С. 992-1006.

18. Горрен А. Универсальная и комплексная энзимология синтазы оксида азота/ А. Горрен, Б. Майер // Биохимия. – 1998. – № 7. – С. 870-880.

19. Башкатова В. Оксид азота в механизмах повреждения мозга, обусловленного нейротоксическим действием глутамата/ В. Башкатова, К. Раевский // Биохимия. – 1998. – № 7. – С. 1020-1028.

20. Викторов И.В. Роль оксида азота и других свободных радикалов в ишемической патологии мозга/ И.В. Викторов // Вестник Российской Академии Медицинских Наук. – 2000. – № 4. – С. 5-10.

21. Сагач В.Ф. Пригнічення оксидативного та нітрозативного стресу як механізм кардіо- і вазопротекторної дії екдистерону за умов експериментального цукрового діабету I типу / В.Ф. Сагач, Ю.П. Коркач, А.В. Коцюрба, О.Д. Присяжна. // Фізіологічний журнал. – 2008. – Т. 54, № 5. – С. 46–54.

22. Coyle J.T. Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders/ J.T. Coyle, P. Puttfarcken // Science. 1993. – Vol. 262. – P. 689-695. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

23. Гарматина О.Ю. Индуцибельная синтаза оксида азота при патологии сердца / О.Ю. Гарматина, М.Н. Ткаченко, А.А. Мойбенко // Журнал АМН Украины. – 2005. – Т. 11. – № 4. – С. 645–659.

24. Зарицька М.В. Участь різних ізоформ NO-синтази в регуляції метаболізму оксиду азоту при стрептозототичному діабеті / М.В. Зарицька, Н.О. Сибірна. // Лабораторна діагностика. – 2001. – № 4. – С. 22–25.

25. Syapin P. J. Alcohol and nitric oxide production by cells of the brain / P. J. Syapin // Alcohol. – 1998. – V. 16. – P. 159–165. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

26. Greenberg S. Ethanol metabolism is not required for inhibition of LPS- stimulated transcription of inducible nitric oxide synthase / S. Greenberg // Alcohol. – 1999. – V. 17. – P. 203–213. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

27. Дереча Л.Н. Алкоголь и его действие на организм: обзор литературы/ Л.Н. Дереча // Вісник Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна. Серія: Біологія. – 2007. – №2. – с. 7-16.

28. Moibenko O.O. Fundamental mechanisms of action of nitric oxide on the cardiovascular system, as the basis of pathogenetic treatment of diseases / O.O. Moibenko, V.F. Sagach, M.M. Tkachenko [et al.] // Fiziologichnij Zhurnal. – 2004. – №1. – с. 11-30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

29. Lee C. I. Regulation of xanthine oxidase by nitric oxide and peroxynitrite / C. I. Lee, X. Lin, J. L. Zweier // The Journal of Biological Chemistry. – 2000. – №3. – P. 9369–9376. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

30. Sharinov R.R. Induction of oxidative stress in heart mitochondria by focal ischemia – reperfusion brain and protective effect of ecdysterone / Sharinov R.R., Kotsiuruba A.V., Kopyak B.S., Sagach V.F. // Fiziologichnij Zhurnal. – 2014. – №3. – P. 11-17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Надійшла до редакції 25.11.2015

Ю. Омельченко, асп., О. Сокур, д-р биол. наук, О. Харченко, канд. биол. наук, Л. Остапченко, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

МЕТАБОЛИЗМ ОКСИДА АЗОТА В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС СО СФОРМИРОВАННОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИЕЙ

Изучено метаболизм оксида азота в головном мозге крыс с сформированной алкогольной зависимостью. Выявлено активацию NO-синтазы на начальных этапах исследований (4 недели) в результате индукции как iNOS, так и ее конститутивных изоформ (nNOS та eNOS), тогда как долгосрочное употребление алкоголя сопровождается активацией только cNOS, которая зависит от концентрации ионов кальция. Исследование пула стабильных метаболитов NO: нитрит- и нитрат анионов (NO₂, NO₃) и нитрозотиолов выявило увеличение их содержания на всех этапах исследований.

Ключевые слова: NO-синтаза, мозг, алкогольная зависимость.

Yu. Omelchenko, PhD stud., O. Sokur, DSc., O. Harchenko, PhD., L. Ostapchenko, DSc.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

OXIDE METABOLISM IN RAT BRAIN WITH FORMED ALKOHOL DEPENDENCE

Identified activation of NO-synthase in the initial stages of the research (4 weeks) as a result of the induction of both iNOS and its constitutive isoforms (nNOS and eNOS), whereas prolonged system alcohol using is accompanied by activation of only cNOS, which depends on the calcium ions concentration. The pools study of stable NO metabolites exposed: nitrite and nitrate anions (NO₂, NO₃) and nitrosothiols revealed an increase in their content at all stages of the research.

Key words: NO-synthase, brain, alcohol dependence.

УДК 616.34-002-02-092+616.833

А. Присяжнюк, асп., К. Нестерук, студ.,
Т. Червінська, канд. біол. наук, Г. Толстанова, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ЕКСПРЕСІЯ ТА ЛОКАЛІЗАЦІЯ Д₃-ДОФАМІНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ВИРАЗКОВОГО КОЛІТУ

Встановлено, що за нормальних умов Д₃-дофамінові рецептори локалізовані на епітеліальних, ендотеліальних клітинах та ентеральних нейронах слизової оболонки товстої кишки щурів. За розвитку запалення товстої кишки, при експериментальному виразковому коліті, рівень експресії Д₃-рецепторів зменшується, а їх основним джерелом є поверхневі колоноцити.

Ключові слова: Д₃-дофамінові рецептори, експериментальний виразковий коліт, дофамін.

Вступ. За останні десять років, що підтверджується експертним оцінюванням Всесвітньої організації охорони здоров'я, простежується чітка тенденція до збільшення захворюваності на запальні захворювання кишечника (ЗЗК), до яких належать виразковий коліт та хвороба Крона [6, 10]. Серед осіб, які хворіють на ЗЗК, приблизно 50% складають особи працездатного віку, що підтверджує соціальну значимість даної патології, яка нерідко призводить до інвалідності. Хворі на ЗЗК потребують госпіталізації, тож стають непрацездатними на період від 10 до 14 днів, а в деяких випадках і більше.

Порушення функціонування дофамінергічної нервової системи викликає ряд патологічних станів, серед яких: шизофренія, хвороба Паркінсона, біполярні порушення, депресії, синдром неспокійних ніг, гіперпролактинемія, пухлини гіпофізу, гіпертензія, гастропарез, нудота та еректильна дисфункція [1; 5], тому і широко розповсюдженими в медичній фармакології є агоністи та антагоністи дофамінових рецепторів. Дофамін опосередковує свій ефект через два класи дофамінових рецепторів D₁- до яких належать D₁ і D₅-підтипи та D₂ – до яких належать D₂, D₃ та D₄-підтипи [1]. Експресію дофамінових рецепторів D₁, D₂, D₃ та D₅-підтипу виявлено в слизовій оболонці як верхніх (шлунок), так і нижніх (тонкій та товстій кишках) відділів шлунково-кишкового тракту (ШКТ) [7].

На сьогоднішній день існують прямі та опосередковані докази, що порушення у дофамінергічній системі можуть впливати на перебіг ЗЗК. Нами показано, що хворі на шизофренію, яка характеризується гіпердофамінергічною активністю, не схильні до ЗЗК [8]. А при хворобі Паркінсона, яка характеризується зниженою дофамінергічною активністю, навпаки, спостерігається підвищений ризик захворюваності на дану патологію [3]. В наших попередніх дослідженнях встановлено зміни експресії D₂-рецепторів в слизовій оболонці товстої кишки пацієнтів з ЗЗК та при експериментальному коліті [4; 9]. Активність D₂-рецепторів прискорювала загоєння уражень при експериментальному коліті за рахунок пригнічення ендотеліальної проникності і, як наслідок, зменшення запалення [9]. D₃-рецептори, також належать до D₂-класу дофамінових рецепторів, які пригнічують аденілатциклазну активність. За норми, D₃-рецептори можуть локалізуватися як на пре-, так і на постсинаптичній мембрані дофамінергічних нейронів, гени, кодуєчі D₃-рецептори, були знайдені як в нервово-м'язовому плетиві, так і в слизовій оболонці товстої кишки [5], що може вказувати на потужну роль D₃-рецепторів у функціонуванні ШКТ. Метою даної роботи, була перевірка гіпотези про залучення D₃-рецепторів у патогенез ЗЗК.

Матеріали і методи. В експерименті були використані щури лінії Вістар масою 170-220 г, що утримувалися на стандартному раціоні віварію. Виразковий коліт викликали загальноприйнятим методом (після дефека-

ції щурам ректально вводили 0,1 мл 6% йодоацетаміду, розведеного в 1% розчині метилцелюлози) [8]. Щури піддавалися аутопсії шляхом цервікальної дислокації через 0,5, 2, 6 годин та 3, 7 та 14 днів від моменту викликання виразкового коліту. Під час аутопсії було видалено 7 см товстої кишки, яка була розрізана вздовж з протилежної від мезентерію боку та промита в холодному натрій-фосфатному буфері. Після чого у частини групи була зібрана слизова оболонка товстої кишки та занурена в рідкий азот для збереження нативної структури білків для наступного аналізу вмісту протеїнів методом Вестерн блот, а у другій частини зразки товстої кишки були використані для імуногістохімічного аналізу. Ізольовану ділянку кишки гомогенізували за допомогою DOUNCE гомогенізатора (Sigma, США) у лізуючому розчині (0,1% SDS, 1% Triton X-100, 2 мкМ PMSF, 1 мкМ ортованадату натрію). Зразки були заізовані в лізис-буфері, що містив інгібітори протеаз та фосфатаз. Загальну концентрацію білків визначали за методом Бредфорда з використанням набору Bio-Rad для білкового аналізу (Bio-Rad, США) [2].

Розділення та визначення білка (100 мкг заг. білку/зразок) методом Вестерн блоту проводили у 8% SDS поліакриламідному гелі з наступним переносом на Hybond-ECL нітроцелюлозну мембрану (Amersham Biosciences, США) згідно зі стандартним протоколом фірми Bio-Rad. Зразки перед нанесенням у гель інкубували при температурі 95°C протягом 5 хв. Антитіла проти D₃-рецептора (1:250) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Німеччина) та бета-актину (1:500); використовували для визначення рівня експресії білків у слизовій оболонці товстої кишки, с наступною інкубацією зі анти-кролячими (анти-D₃ рецептор) та анти-мишачими (анти-бета-актин) вторинними антитілами (1:2500), відповідно, кон'югованим з пероксидазою хрому. Візуалізацію Вестерн-блот проводили ECL-реагентом. Результати не менш, ніж трьох різних експериментів були проаналізовані за допомогою програми Phoretix1D. Рівень експресії досліджуваного білку визначали за числом умовних одиниць флуоресцентного сигналу (у.о.), використовуючи у.о. флуоресцентного сигналу білку бета-актину для стандартизації вихідної кількості білку. Зміни експресії вираховували за різницею числа у.о. флуоресцентного сигналу експериментальної групи до контрольної. Кожен Вестерн блот був повторений двічі.

Імунофарбування: були використані занурені у парафін фрагменти кишки товщиною 5 мкм. Фрагменти були депарафінізовані, гідратовані, заблоковані за допомогою 3% H₂O₂/H₂O та оброблені антиген-вивільнюючим розчином Дако (pH 10.0). Після чого зразки інкубувалися впродовж 12 год. при 4°C з первинними кролячими анти-D₃ рецептор антитілами (1:100), з подальшим біотинілюванням вторинними антитілами та маркуванням стрептавідин-біотин пероксидазою. Далі

зразки були пофарбовані і проявлені за допомогою методу АВС детекції та оцінені за допомогою мікроскопу (Nikon, Японія). Для підтвердження специфічності антитіл як контроль застосовували імуноабсорбцію антитіл.

Статистичний аналіз даних проводили з використанням програми Statistica 8.0. Для кожної з вибірок перевіряли чи є нормальним розподіл досліджуваного показника, застосовуючи критерій Шапіро-Вілка. Для

порівняння вибірок підраховували середнє арифметичне та похибку середнього арифметичного. Достовірність різниці між порівнюваними групами оцінювали за допомогою t-критерію Стьюдента. Статистично значущою для всіх показників вважали різницю $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення.

За допомогою Вестерн блот аналізу нами були встановлені зміни експресії Д3-рецепторів (Рис. 1).

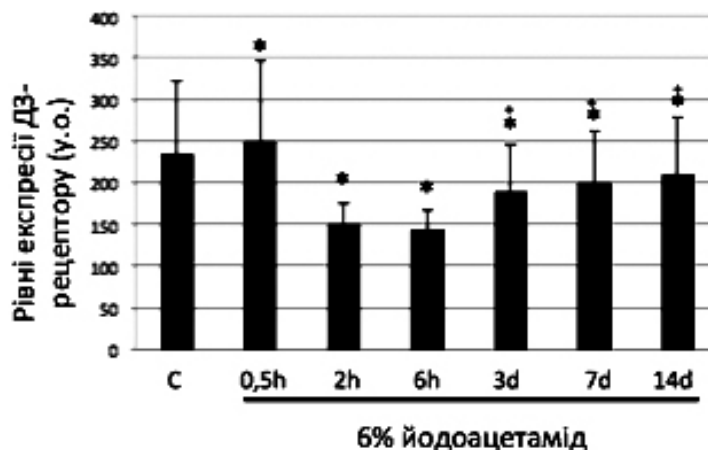


Рис. 1. Рівень експресії Д3 рецепторів у стінці товстої кишки щурів на фоні дії йодоацетамід-викликаного експериментального коліту різних термінів за результатами Вестерн-блот аналізу.
M $\pm$ SD, * – $p < 0,05$ відносно контролю (C). + – $p < 0,05$ відносно 2h та 6h.

Як видно з рисунку 1, експресія Д3-рецепторів зменшувалась ($p < 0,05$) вже через 2 години після введення ЙА, досягала мінімальних значень через 6 годин, підвищувалась через 3, 7 та 14 днів, але так і не досягала контрольних значень.

Як показано в наших попередніх дослідженнях [9], найбільших значень індекс активності захворювання досягає на 3-5 день після введення ЙА. При цьому, спостерігається збільшення експресії протеїну Д2-рецепторів, починаючи з 2 годин, після введення ЙА [9], що має протилежний ефект, порівняно зі зменшенням експресії протеїну Д3-рецепторів. Але, цікаво те, що Д2-рецептори майже не експресувалися в неуразеній слизовій оболонці товстої кишки, у той час, як Д3-рецептори знайдені в значній кількості і в слизовій оболонці тварин контрольної групи (МС) (Рис. 1). Що разом з даними по експресії Д3-рецепторів, вказує на різну роль дофамінових рецепторів у функціонуванні слизової оболонки товстої кишки, а також, протіканні ЙА-викликаного коліту.

За результатами проведеного нами імуногістохімічного дослідження було встановлено, що локалізація Д3-рецепторів відрізняється в нормі та на різних стадіях перебігу запалення при йодоацетамід-індукованому експериментальному виразковому коліті. У контрольній групі (МС) спостерігалася переважно епітеліальна локалізація Д3-рецепторів, причому, вони рівномірно розміщені по всій поверхні крипт (з основи до верхівки) на апікальних та базолатеральних мембранах епітеліоцитів та келихоподібних клітин. У той час, як на фоні 7 діб після введення ЙА спостерігалася помітне збільшення експресії Д3-рецепторів в м'язовій частині слизової оболонки товстої кишки та їх локалізація зсунулася ближче до верхівки крипт на апікальну мембрану епітеліоцитів, а експресія Д3-рецепторів на келихоподібних клітинах помітно зменшилася.

За літературними даними, гени, що кодують Д3-дофамінові рецептори (як і інші рецептори даної групи, окрім Д4) виявлені по всій довжині травного тракту, починаючи від шлунка, закінчуючи товстою кишкою. При цьому, транскрипти до Д3-рецепторів знайдені в слизовій оболонці і в нервово-м'язовому плетиві [6]. Це вказує на те, що дофамін може опосередковувати свою дію через Д3-рецептори у ШКТ. Але яку саме роль відіграє даний тип рецептора, залишається невідомим. Зміна локалізації Д3-рецепторів на переважно епітеліальну на поверхні крипт на фоні розвитку запалення на фоні ЙА-викликаного коліту, вказує на можливість захисну роль даних рецепторів. У будь-якому разі, дана гіпотеза потребує подальших досліджень та експериментального доведення.

Висновки. Було встановлено, що за нормальних умов Д3-рецептори локалізовані на епітеліальних, ендотеліальних клітинах та ентеральних нейронах слизової оболонки товстої кишки щурів. Вперше встановлено, що за умов розвитку експериментального коліту спостерігається зменшення рівня протеїну Д3-рецепторів. При цьому вони локалізовані переважно на поверхневих колоноцитах, що може вказувати на захисну роль даного типу дофамінових рецепторів в патогенезі ЗЗК.

Список використаних джерел

1. Beaulieu J.M. The physiology, signaling and pharmacology of dopamine receptors / J.M. Beaulieu, R.R. Gainetdinov // Pharmacology Review. – 2011. – Vol. 63. – №1. – P. 182-217.
2. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // Analytical Biochemistry. -1976. – Т. 72. – №. 1. – С. 248-254.
3. Devos D. Colonic inflammation in Parkinson's disease / D. Devos, T. Leboviev, B. Lardeux [et al.] // Neurobiology Disease. – 2013. – Vol. 50. – P. 42-48.
4. Kernychnyi V. Impaired peripheral dopaminergic system in patients with ulcerative colitis / V. Kernychnyi, N. Dziubenko, A. Prysiazniuk [et al.] // The FASEB Journal. -2015. – Vol. 29. – №1. – Suppl. LB544.

5. Li Z.S. Physiological Modulation of Intestinal Motility by Enteric Dopaminergic Neurons and the D₂ Receptor: Analysis of Dopamine Receptor Expression, Location, Development, and Function in Wild-Type and Knock-Out Mice / Z.S. Li, C. Schmauss, A. Cuenca [et al.] // *The Journal of Neuroscience*. – 2006. – Vol. 26. – №10. – P. 2798-2807.

6. Mizoguchi A. Inflammatory bowel disease, past, present and future: lessons from animal models / A. Mizoguchi, E. Mizoguchi // *Journal Gastroenterology*. – 2008. – Vol. 43. – №1. – P. 1-17.

7. Satoh H. New ulcerative colitis model induced by SH blockers in rats and the effects of anti-inflammatory drugs on the colitis / H. Satoh, F. Sato, K. Takami [et al.] // *Japan Journal Pharmacology*. – 1997. – Vol. 73. – P. 299-309.

8. Tolstanova G. New molecular mechanisms of the unexpectedly complex role of VEGF in ulcerative colitis / G. Tolstanova, T. Khomenko, X. Deng [et al.] // *Journal Gastroenterology*. – 2010. – Vol. 138. – №5. – S-264.

9. Tolstanova G. Role of Dopamine and D₂ Dopamine Receptor in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease / G. Tolstanova, X. Deng, A. Ahluwalia [et al.] // *Digestive Diseases Science*. – 2015. – Vol. 60. – №10. – P. 2963-2975.

10. Xavier R.J. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease / R.J. Xavier, D.K. Podolsky // *Nature*. – 2007. – Vol. 448. – №7152. – P. 427-434.

Надійшла до редколегії 02.12.15

А. Присяжнюк, асп., К. Нестерук, студ., Т. Червинская, канд. биол. наук, А. Толстанова, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ЭКСПРЕССИЯ И ЛОКАЛИЗАЦИЯ D₃-ДОФАМИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА ФОНЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЯЗВЕННОГО КОЛИТА

Было показано, что при нормальных условиях D₃-дофаминовые рецепторы расположены на эпителиальных, эндотелиальных клетках, а также энтеральных нейронах слизистой оболочки толстого кишечника крыс. Про воспалительном процессе толстого кишечника на фоне экспериментального язвенного колита уровень экспрессии D₃-рецепторов уменьшался, а их основным источником выступали поверхностные колонocyты.

Ключевые слова: D₃- дофаминовые рецепторы, экспериментальный язвенный колит, дофамин.

A. Prysiazniuk, PhD stud, K. Nesteruk, stud, T. Chervinska, PhD, G. Tolstanova, DSc
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

D₃R LOCALIZATION AND EXPRESSION LEVELS DURING THE EXPERIMENTAL ULCERATIVE COLITIS

It was observed that in healthy colon D₃ receptors are mainly localized on epithelial, endothelial cells and enteric neurons of rat's colon mucosa. During the development of inflammation in colon, in experimental ulcerative colitis, the D₃ expression levels decreased and its expression was observed mostly on surface colonocytes.

Key words: D₃R, experimental ulcerative colitis, dopamine.

УДК 579.66

Л. Авдєєва, д-р мед. наук, М. Хархота, канд. біол. наук, Г. Хархота, пров. інж.
Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, Київ

СКРИНІНГ БАКТЕРІЙ РОДУ *BACILLUS* ПРОДУЦЕНТІВ ЕКЗОПОЛІМЕРНИХ РЕЧОВИН З ФЛОКУЛЮЮЧОЮ АКТИВНІСТЮ

Серед 400 штамів бактерій роду *Bacillus* проведено скринінг продуцентів екзополімерних сполук з флокулюючими властивостями. Встановлено, що з усіх досліджених штамів бацил 40,9 % та 14,0 % продукують екзополімери полісахаридної та поліамінної природи відповідно, при культивуванні на агаризованих поживних середовищах. З найбільшою частотою продуценти полісахаридних та поліамінних речовин виділялись серед ґрунтових штамів бацил – 55,34 та 47% від усіх активних штамів відповідно. Для подальших досліджень відібрано перспективні штами, флокулююча активність екзополімерів яких складала 75-78 %.

Ключові слова: бактерії роду *Bacillus*, скринінг, біофлокулянти, екзополісахариди, поліаміни.

Вступ. На сьогодні, через антропогенний вплив на довкілля, значною проблемою стало забруднення водних ресурсів [1, 2]. В промисловості для очистки води використовують флокулянти неорганічної та органічної природи. Проте неорганічні флокулянти, а саме сполуки алюмінію, можуть викликати хворобу Альцгеймера та дитячу слабоумість, органічні – синтетичні похідні поліакриламідів – важко розкладаються в природі, а їх мономері мають нейротоксичну та канцерогенну дію [1]. Біофлокулянти (БФ), на відміну від останніх, безпечні для людей, тварин та навколишнього середовища, біодеградабельні [3].

Відомо, що БФ різної хімічної будови синтезуються стрептоміцетами, простішими, грампозитивними та грамнегативними мікроорганізмами. Деякі з них продукують екзополімери лише полісахаридної будови (*Klebsiella mobilis*), інші – полісахарид-білкові комплекси (*Nannocystis* sp. NU-2, *Aspergillus parasiticus*). Незважаючи на значну кількість досліджень, присвячених вивченню флокулюючої здатності мікробних біополімерів, існує всього декілька повідомлень про промислове виробництво і практичне використання білкових флокулянтів з *Rhodococcus erythropolis* S-1 [6] і *Bacillus* sp DP-152 [7]. У першу чергу, це пов'язано з тим, що деякі штами-продуценти, такі як *K. pneumoniae*, *Proteus*

mirabilis, *A. parasiticus* та інші можуть бути патогенними для людини, а синтезовані ними БФ мають більш високу собівартість, порівняно з неорганічними та органічними синтетичними флокулянтами.

Тому актуальним є пошук штамів-продуцентів високоефективних БФ, що можуть мати промислове значення. У зв'язку з цим особливу увагу привертають грампозитивні бактерії роду *Bacillus*, оскільки ці мікроорганізми не вибагливі до ростових субстратів, непатогенні, мають високу швидкість росту, що дозволяє використовувати їх у біотехнологічних процесах отримання БФ для очистки води. Також на сьогодні недостатньо досліджено механізми флокуляції речовин з розчинів бактеріальними екзополімерами, закономірності їх біосинтезу тощо.

Метою нашої роботи було проведення скринінгу штамів бацил продуцентів екзополімерних речовин з флокулюючою активністю

Матеріали та методи роботи. Об'єктами дослідження були 400 штамів бактерій роду *Bacillus*, що виділені з різних екологічних місць: вода (n = 63), ґрунти (n = 235), шлунково-кишковий тракт тварин та птахів (n = 52) та колекційні штами (n = 53). Штами отримані з колекції відділу антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

Скринінг штамів бацил-продуцентів БФ проводили в два етапи: на першому – відбирали штами бацил, що здатні синтезувати екзополімерні сполуки на агаризованому середовищі, на другому – визначали флокулюючу активність культуральної рідини.

Скринінг штамів бацил-продуцентів екзополісахаридних флокулянтів проводили на середовищі наступного складу (г/л): глюкоза – 10,0; пептон – 0,5; сечовина – 0,5; K_2HPO_4 – 5,0; $MgSO_4$ – 0,2; $NaCl$ – 0,2; KH_2PO_4 – 2,0; агар-агар – 12,0, pH – $7,0 \pm 0,2$. Пошук продуцентів поліамінів проводили на середовищі (г/л): L-глутамат – 10,0; $MgSO_4$ – 0,25; $CaCl_2$ – 0,2; $FeCl_3$ – сліди; NH_4Cl – 3,0; K_2HPO_4 – 5,0; глюкоза – 10,0; агар-агар – 12,0, pH – $7,0 \pm 0,2$. Штами вирощували протягом 18-24 год при температурі 37 °C. Позитивним результатом вважали утворення культурами слизу. Інтенсивність екзометаболізму визначали за 5 бальною системою: "-" – синтез екзополімеру відсутній, "++++" та "+++" – висока активність синтезу екзополімеру (значна кількість слизу, неможливо або складно розрізнити окремі колонії), "++" – помірна активність (значна кількість слизу, чітко видно окремі колонії), "+" – низька активність утворення слизу (незначна кількість слизу, чітко видно окремі колонії).

Для глибинного культивування відібраних штамів використовували рідке поживне середовище відповідного складу. Культури вирощували протягом 24 год при 37°C, потім центрифугували 20–30 хв при 8000g для отримання безклітинного супернатанту (культуральної рідини). Визначення флокулюючої активності культуральної рідини проводили за допомогою каолінового тесту [6]. Для цього до 45 мл розчину каоліну (5 г/л) додавали 2,5 мл розчину $CaCl_2$ (10 г/л), перемішували протягом 5 с та додавали 1,0 мл центрифугату культуральної рідини. У контрольному варіанті центрифугат культуральної рідини замінювали на відповідну кількість поживного середовища. Отриману суміш знову перемішували протягом 30 с та залишали осідати 5 хв при кімнатній температурі. Оп-

тичну густину верхньої частини суспензії вимірювали фотоколориметрично при довжині хвилі 540 нм. Флокулюючу активність розраховували за формулою:

$$ФА = \frac{ОГ_д - ОГ_к}{ОГ_к} \times 100\%$$

де: ФА – флокулююча активність; ОГ_д – оптична густина суспензії каоліну в досліді; ОГ_к – оптична густина суспензії каоліну в контролі.

Всі досліді проводили в 3 кратній повторності. Для оцінки достовірності експериментальних даних, використовували параметричні критерії нормального розподілу, обчислюючи середнє арифметичне ($\bar{X}$ сер.), середню квадратичну похибку (Sx сер.), при рівнях значимості 0,05 чи 0,01.

Результати досліджень та обговорення. За екологічними нішами, з яких були виділені бацили, останні були нами умовно поділено на 4 групи: штами виділені з ґрунтів, з води, з шлунково-кишкового тракту (ШКТ) тварин і птахів та колекційні штами. Остання група певною мірою штучно створена, оскільки штами, що до неї входять були в свій час теж виділені з певних екологічних ніш. Проте, виділення такої групи є доцільним та виправданим, бо згідно даних літератури [3], при тривалому зберіганні мікроорганізми можуть втрачати свої біологічні властивості, зокрема, здатність до синтезу екзополісахаридів, які як відомо є головними компонентами БФ.

Нами встановлено, що при культивуванні на твердих середовищах з усіх досліджуваних штамів бацил 40,9 та 14,0 % здатні продукувати екзополімери полісахаридної та поліаміної природи, відповідно. Переважну більшість штамів-продуцентів полісахаридних речовин, а саме 55,3 % від усіх активних штамів, було виділено з ґрунтів, найменша їх частина (11,9 %) належала до колекційних штамів. Розподіл штамів за інтенсивністю синтезу екзополімерних сполук представлено на рис. 1.

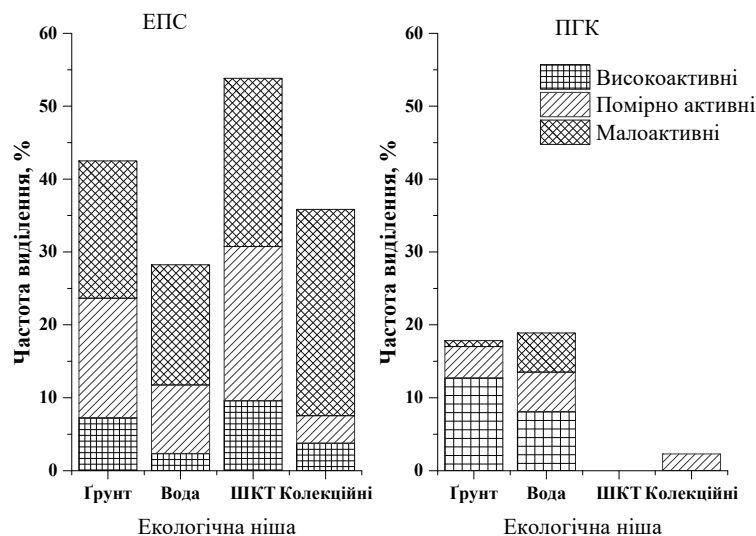


Рис. 1. Частота виділення продуцентів екзополімерних сполук з різних екологічних джерел

Згідно отриманих даних, з найбільшою частотою високо та помірно активні штами-продуценти екзополісахаридів (ЕПС) виділялися з ґрунтів (7,2 % та 16,4 % від загальної кількості штамів з даної екониші відповідно) та ШКТ (9,6 % та 21,2% відповідно). Слід зазначити, що серед колекційних штамів було зареєстровано най-

меншу кількість високо та помірно активних і, навпаки, найбільшу (28,3%) – низько активних продуцентів БФ.

Серед ґрунтових штамів бацил найбільшу кількість високоактивних продуцентів екзополімерів виділено з екосистем Мертвого моря (25% від загальної кількості штамів з даної екосистеми), найменшу – з Антарктиди (взагалі не виділено) (рис.2.).

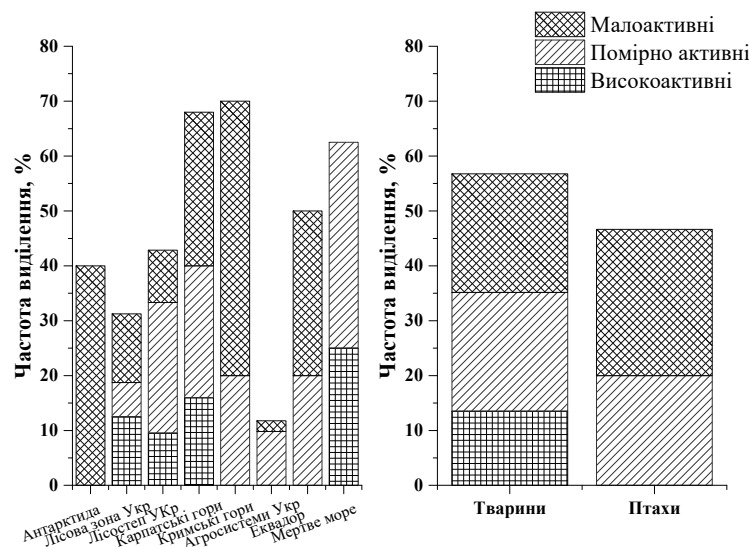


Рис. 2. Частота виділення продуцентів екзополімерних сполук з різних типів ґрунтів та ШКТ тварин

Одночасно відмічалася виділення значної кількості штамів-продуцентів з ґрунтів Карпатських та Кримських гір. Найменше продуцентів ЕПС виділено з агроєкосистем. Особливої уваги також заслуговують продуценти, виділені з ШКТ тварин та птахів. Нами відмічено, що ізоляти з ШКТ птахів порівняно з штамми, виділеними з ШКТ тварин, проявляють значно нижчу полісахарид-синтезуючу активність.

Інша перспективна група БФ – γ -поліглутамінова кислота (ПГК), продуценти якої, головним чином, належать до бактерій роду *Bacillus*. Серед усіх досліджених нами штамів найбільша кількість продуцентів цього біо-

полімеру була відмічена серед ґрунтових та водних штамів бацил (71,4% та 25,0 % від усіх продуцентів відповідно). Серед штамів, виділених з ШКТ, продуцентів ПГК нами не було виявлено (рис. 1). Переважна більшість штамів-продуцентів ПГК серед ґрунтових бацил була виділена з наземних екосистем Мертвого моря.

Таким чином, в результаті першого етапу скринінгу продуцентів БФ нами було відібрано 26 штамів бацил з високою ЕПС-синтезуючою активністю та 10 – з ПГК-синтезуючою активністю. У подальшому було визначено ФА екзополімерних речовин, що продукуються даними штамми (Таблиця 1).

Таблиця 1. Флокулююча активність культуральної рідини штамів *Bacillus* – продуцентів екзополісахаридних речовин

Штам	Джерело виділення	Флокулююча активність, %	Штам	Джерело виділення	Флокулююча активність, %
<i>Bacillus</i> sp M12 ₆	Ґрунт	57,5 $\pm$ 1,5	<i>Bacillus</i> sp M18 ₇	Ґрунт	27,5 $\pm$ 2,1
<i>Bacillus</i> sp Kp 3	Ґрунт	25,0 $\pm$ 1,0	<i>Bacillus</i> sp SD3 ₅	Ґрунт	32,5 $\pm$ 3,1
<i>Bacillus</i> sp SC1 ₁₅	Ґрунт	25,0 $\pm$ 2,0	<i>Bacillus</i> sp 16.3	Ґрунт	10 $\pm$ 1,6
<i>Bacillus</i> sp SD 2 ₂₁	Ґрунт	12,5 $\pm$ 2,1	<i>Bacillus</i> sp SD2 ₂₀	Ґрунт	0
<i>Bacillus</i> sp CV 5 _a	Вода	12,5 $\pm$ 1,5	<i>Bacillus</i> sp M20 ₇	Ґрунт	55,3 $\pm$ 2,1
<i>Bacillus</i> sp CS2 _{8a}	Ґрунт	12,5 $\pm$ 2,0	<i>Bacillus</i> sp M7	Ґрунт	17,6 $\pm$ 1,7
<i>Bacillus</i> sp M2	Ґрунт	0	<i>Bacillus</i> sp M9 ₂	Ґрунт	0
<i>Bacillus</i> sp M 11 ₆	Ґрунт	42,5 $\pm$ 1,0	<i>Bacillus</i> sp M13 ₈	Ґрунт	78,6 $\pm$ 3,2
<i>Bacillus</i> sp SC2 _{8b}	Ґрунт	30,0 $\pm$ 2,4	<i>Bacillus</i> sp M6 ₁	Ґрунт	0
<i>Bacillus</i> sp 16.2	Ґрунт	0	<i>Bacillus</i> sp M15 ₈	Ґрунт	68,8 $\pm$ 3,0
<i>Bacillus</i> sp 4.4	Ґрунт	51,5 $\pm$ 2,4	<i>Bacillus</i> sp M22 ₃	Ґрунт	27,5 $\pm$ 1,7
<i>Bacillus</i> sp Kp 4	Ґрунт	25,0 $\pm$ 1,5	<i>Bacillus</i> sp CV 2	Вода	22,5 $\pm$ 1,9
<i>Bacillus</i> sp CV 4	Вода	0	<i>Bacillus</i> sp CV 3	Вода	27,5 $\pm$ 3,0

Флокулююча активність культуральної рідини штамів-продуцентів ЕПС в наших дослідках коливалась від 0 до 78%. А штам *Bacillus* sp M2, CV 4, M6₁, M9₂ та SD2₂₀ продукують ЕПС, що не проявляють ФА. Культуральна рідина штамів-продуцентів ПГК характеризувалась ФА на рівні 43,4–77,8 % (Рис. 3.).

Найбільшу ФА серед штамів продуцентів ЕПС, а саме 78,6% проявляла культуральна рідина штаму M13₈, а серед штамів продуцентів ПГК – M7, ФА якої складала 77,6%. Слід відзначити, що штам *Bacillus* sp M12₆, CS2_{8a}, M 11₆, 4.4, M20₇, M7, M13₈, M15₈ здатні продукувати екзополімерні речовини при вирощуванні як на середовищах, що стимулюють синтез ЕПС, так і на тих, що є оптимальні для продукції ПГК.

Отже, найбільшу кількість штамів продуцентів ЕПС біофлокулянтів нами було виділено з ґрунтових екосис-

тем помірного клімату та Мертвого моря. Даному явищу є цілком логічне пояснення. По-перше, діє закон зонального різноманіття, згідно якого кількість видів та штамів бацил збільшується від високих широт до максимуму в помірних, та знову зменшується до екватора. Екосистеми Мертвого моря та Екватору розташовані близько екватора. Проте, якщо в перших зонах умови існування екстремальні і значна кількість штамів для свого виживання синтезує ЕПС, то кліматичні умови Екватору більш сприятливі для виживання бацил тому і кількість ЕПС-синтезуювальних штамів значно менша, ніж серед штамів, виділених з наземних екосистем Мертвого моря. Низьку кількість ЕПС-синтезуювальних штамів в агроєкосистемах можна пояснити бідністю видового різноманіття штамів бацил в окультурених ґрунтах.

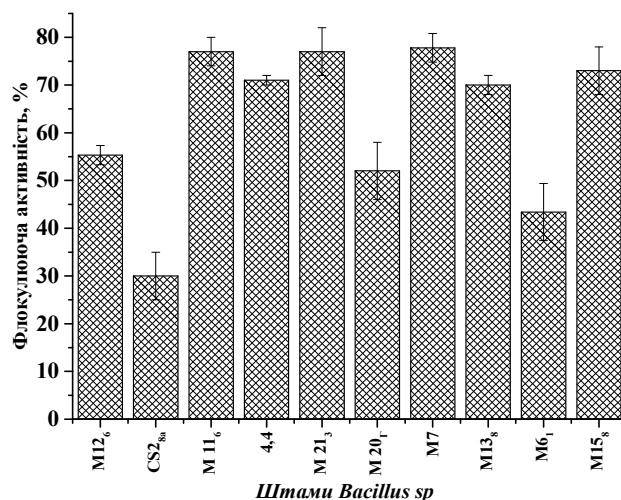


Рис. 3. Флокулююча активність культуральної рідини штамів бацил-продуцентів ПГК

При дослідженні синтезу ЕПС штамами, виділеними з ШКТ тварин та птахів, нами було відмічено наступні закономірності: штами, виділені з ШКТ птахів порівняно з ізолятами з ШКТ тварин проявляють меншу здатність до синтезу полісахаридів. Дане явище, можливо, пояснюється тим, що в ШКТ тварин умови існування для штамів бацил більш несприятливі (більші коливання значень рН кишкового вмісту та жовчі), а екзополімери, перш за все, виконують функцію захисту від несприятливих умов середовища. Даних про зв'язок синтезу ПГК та географічне чи екосистемне поширення продуцентів нами не знайдено, проте слід відмітити, що в переважній більшості випадків штами бацил-продуцентів виділені з ґрунтів та ферментованих продуктів (боби natto).

Біологічне значення процесів флокуляції для мікроорганізмів-продуцентів не зовсім зрозуміле. Існує припущення, що процес флокуляції допомагає у виживанні мікроорганізмів в олігонітрофільних умовах, оскільки при цьому акумулюються поживні частки (речовини). Олігонітрофільні умови, у першу чергу, характерні для водних екосистем, однак в наших дослідках штами, виділені з них не проявляли високу флокулюючу активність. Імовірно, це пояснюється тим, що річки та озера України, з яких нами були виділені штами, багаті на органічні речовини. Теорія пристосування до життя в олігонітрофільних умовах зовсім не пояснює існування поліамінних біофлокулянтів, синтез яких у переважній більшості відбувається за наявності високих концентрацій амінокислот попередників, зокрема глутамінової кислоти.

На нашу думку, значна кількість продуцентів БФ, виділених з ґрунтів, пояснюється тим, що завдяки цій здатності мікроорганізми мають перевагу у виживанні, оскільки БФ збільшують цупкість ґрунтової міцели та беруть участь у біоплівкоутворенні.

Використані нами поживні середовища індукують продукцію бацилами переважно екзополісахаридних та поліамінних БФ відповідно. Однак, дані, згідно яких культуральна рідина ряду досліджених нами штамів (див. табл. та рис.3.) проявляла ФА при їх вирощуванні на обох типах поживних середовищах, може свідчити про косинтез ПГК та ЕПС [8]. Загалом, за даними літератури, для бактерій роду *Bacillus* характерний синтез БФ різної хімічної будови (полісахаридної, білкової чи поліамінної природи) незалежно від видової чи штамової належності. Наприклад, штам *B. licheniformis* CGMCC 2876 продукує глікопептидні біофлокулянти з

високою активністю [9]. Також відомо, що БФ MBF3-3, синтезований *Bacillus sp*, переважно складається з кислого полісахариду (66.1 %) та білку (29.3 %). Причому ФА цієї речовини головним чином, забезпечується кислим полісахаридом. Штам *Bacillus subtilis* DYU1 продукує біополімер DYU500, головними компонентами якого є цукри, уронові кислоти, білки та поліаміни [9]. Флокулянти поліамінної природи синтезують *B. licheniformis* [4], *B. subtilis* DYU1 [8] і *B. subtilis* [2], а *B. mucilaginosus* [1] синтезує полісахаридний біофлокулянт. Проте, слід відмітити, що серед усіх різновидів БФ саме ПГК і поліамінні флокулянти вважаються найкращими завдяки високому рівню синтезу та високій ФА щодо широкого спектру органічних і неорганічних речовин [2].

Отже, враховуючи можливість косинтезу різних типів БФ бацилами та широке різноманіття їх хімічного складу, попереднє наше розділення продуцентів на екзополісахаридних та поліамінних сполук може виявитися хибним і для свого підтвердження потребує виділення БФ в чистому вигляді та встановлення їх хімічної природи.

Максимальний рівень ФА досліджуваних штамів становив 77-78%, хоча за даними літератури він може сягати у БФ бацил 90 – 98% [9]. Слід відзначити, що на ефективність флокуляції може впливати ряд не врахованих нами чинників, а саме: рН реакційної суміші, концентрація БФ та катіонів Ca^{2+} . Наприклад, занадто високий вміст БФ в середовищі може призвести до повної відсутності флокуляції [5, 10]. Що свідчить про необхідність визначення оптимальних умов для прояву ФА екзополімерних сполук, що синтезуються досліджуваними штамами бацил. Інтенсивність біосинтезу БФ можна значно підвищити варіюванням складу поживного середовища та фізико-хімічними умовами культивування продуцентів [2].

Висновки. Отже нами встановлено, що бацили-продуценти полісахаридних екзополімерів, зустрічалися частіше, ніж продуценти поліамінів в 2,85 рази у досліджених нами еконишах. Переважна більшість біосинтетично активних штамів виділялася з ґрунтових еконіш. Для подальших досліджень відібрано ряд штамів-синтетиків екзополімерів полісахаридної та поліамінної природи, що проявляють ФА на рівні 75-78%.

Список використаних джерел

1. Daolun Feng L. Characterization of bioflocculant MBF3-3 produced by an isolated *Bacillus sp.* / Daolun Feng L., Shihong Xu H. // World Journal Microbiol Biotechnolgy. – 2008. – № 24. – С.1627–1632.

2. Sonny S. A heavy metal biotrap for wastewater remediation using poly- γ -glutamic acid / Sonny S. Mark, Theodore C. Crusberg, Christopher M. DaCunha, Alexander A. Di Iorio // *Biotechnology Progress Journal* – 2006. – № 22. – С. 523–531.
3. Ololade O. Purification and characterization of bioflocculant produced by *Bacillus amyloliquefaciens* ABL 19 isolated from Adeti Stream, Ilesa, Osun state, Nigeria / Ololade Omolara Ogunsade, Mufutau Kolawole Bakare, Isaac Olusanjo Adewale. // *Nature and Science*. – 2015. – №13, T. 2. – С. 54 – 64.
4. Ishwar B. Flocculation properties of poly- γ -glutamic acid produced from *Bacillus subtilis* isolate / Ishwar B. Bajaj, Rekha S. Singhal // *Food and Bioprocess Technology*. – 2011. – V. 4, № 5. – P. 745-752.
5. Jun Y. Removal of Cr(III), Ni(II) and Cu(II) by poly(γ -glutamic acid) from *Bacillus subtilis* NX-2 / Jun Yao, Hong Xu, Jun Wang, Min Jiang & Pingkai Ouyang // *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. – 2007. – V. 18, № 2. – P. 193 – 204.
6. Kurane R. Production of a bioflocculant by *Rhodococcus erythropolis* S-1 grown on alcohols / Kurane R., Hatamochi K., Kakuno T.,

- Kiyohara M., Hirano M., Taniguchi Y. // *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. – 1994. – T. 58. – №. 2. – С. 428-429.
7. Suh H. Characterization of bioflocculant produced by *Bacillus* sp. DP-152 / Suh H. // *Journal of Fermentation and Bioengineering*. – 1997. – T. 84. – № 2. – С. 108 – 112.
8. Wu J. Y. Characterization and flocculating properties of an extracellular biopolymer produced from a *Bacillus subtilis* DYU1 isolate / Wu J. Y., Ye H. F. // *Process Biochemistry*. – 2007. – T. 42. – №. 7. – С. 1114. – 1123.
9. Xiong Y. Production and characterization of a novel bioflocculant from *Bacillus licheniformis* / Xiong Y., Wang Y., Yu Y., Li Q., Wang H., Chen R., He N. // *Applied and environmental microbiology*. – 2010. – T. 76. – №. 9. – С. 2778 – 2782.
10. Yan Z. Production and characteristics of a bioflocculant produced by *Bacillus* sp. F19 / Yan Z., Zhi-Long Y., Xu-Liang F., Ya-Hong L., Wei-Min C. // *Bioresource Technology*. – 2008. – № 99, – С. 7686 – 7691.

Надійшла до редколегії 02.09.15

Л. Авдеева, д-р мед. наук, М. Хархота, канд. биол. наук, Г. Хархота, вед. инж.
Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев, Украина

СКРИНИНГ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS* ПРОДУЦЕНТОВ ЕКЗОПОЛИМЕРНЫХ ВЕЩЕСТВ С ФЛОКУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ

Проведен скрининг среди 400 штаммов бактерий рода *Bacillus* продуцентов экзополимерных соединений с флокулирующими свойствами. Установлено, что среди всех исследованных штаммов бацилл 40,9% и 14,0% продуцируют экзополимеры полисахаридной и полиаминной природы соответственно при культивировании на агаризованных питательных средах. С наибольшей частотой продуценты полисахаридных и полиаминных веществ выделялись среди грунтовых штаммов бацилл – 55,34 и 47% от всех штаммов соответственно. Для дальнейших исследований отобраны перспективные штаммы, флокулирующих активность экзополимеров которых составляла 75-78%.

Ключевые слова: бактерии рода *Bacillus*, скрининг, биофлокулянты, экзополисахариды, полиамины.

L. Avdeeva, DSc., M. Kharhota, PhD., A. Kharkhota, Lead Engineer
Zabolotnogo Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

SCREENING OF BACTERIA OF THE GENUS *BACILLUS* PRODUCERS OF EXOPOLYMERIC SUBSTANCES WITH FLOCCULATING ACTIVITY

It was screened the producers of exopolymers with flocculating properties among 400 strains of bacteria of the genus *Bacillus*. It was found that under cultivation on agar nutrient mediums only 40,9 % and 14,0 % of all investigated strains produced exopolymers of polysaccharide and polyamine nature respectively. The producers of polysaccharide and polyamine substances were isolated with greatest frequency among soil strains of bacilli – 55 and 47 % of all strains, respectively. For further research were selected perspective strains with 75-78 % flocculated activity of exopolymers

Keywords: bacteria of the genus *Bacillus*, screening, bioflocculants, exopolysaccharides, polyamines.

UDC 616.329-001.37-053

Ya. Raetska, PhD, T. Ischuk, PhD student, T. Koval, engineer.,
O. Dzhush, PhD student, O. Savchuk, DSc
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

EXPERIMENTAL MODELLING OF AN ACID ESOPHAGUS BURN OF 2ND DEGREE IN IMMATURE RATS

In the experiments, we reproduced an acid esophageal burn model of 2nd degree in rats. The changes of basic blood biochemical parameters to confirm acid burn of esophagus in experimental animals. Our approach can be used for study molecular mechanisms of pathogenesis of 2nd degree.

Key words: an acid esophageal burn, biochemical parameters.

Introduction. Corrosive esophageal burns constitute a serious and widespread health problem during childhood [5,8]. The most common burns are oral of mucosa, pharynx, esophagus, especially in childhood. Acetic acid, vinegar essence, acid cleaning product are cause of almost 42,3% percent of an acid esophageal burns. Esophageal burns as a result of accidental swallowing of caustic material are seen frequently in children ages 1 to 8 years. [5,6]. The depth of an esophageal burn depends on the concentration chemical substance, nature and the amount and contact time with the mucosal.

There are many pathologies and complications following an acid esophageal burns: swelling of the larynx, toxic shock syndrome [11, 14, 18], necrosis of esophageal and stomach tissue, dysmotility [2], scar stricture, esophageal deformations, corrosive esophagitis, gastroesophageal reflux [10, 19], candidiasis [12], malignization in a remote period [20] and others. Thereby the burn disease is an important issue that needs solution immediately.

Today there are a number of experimental models of an acid esophagus burns (AEB) which require the use of chemicals for their creation where, in itself, they affect the certain biochemical parameters [13, 15, 16, 20], which complicates the interpretation and analysis of the experimental results. Therefore, in our researches it was a guideline to develop a new model of burn, which we could use for broad spectrum research of burns pathogenesis especially in children ages from 1 to 8 years.

Materials and methods. In our experiments we used nonlinear immature white rats (1 month) weighing 90-110g, which were kept on a standard vivarium diet. The animals were experimentally simulated with the AEB with 30% solvent of CCl_3COOH ; it was injected into the esophagus via the broach. The broach was placed at a depth of 4.0 cm whereupon 0.2 ml of 30% CCl_3COOH solution was slowly injected through it. The control rats were administered once orally for injection of 0.2 ml water [9].

The control of the esophageal mucosa was carried out at 1, 3 and 7th day after injection of acid. The choice of terms was caused by the pathological process development in chemical burns of the esophagus [1]. At the end of the experiment the animals were sacrificed by the dislocation of cervical vertebrae. The resulting esophagus was cut longitudinally, washed with cold saline. We used slices of esophageal length of about 1.5 cm for morphological studies. They were fixed in 12% formalin solution and embedded in paraffin. Dewaxed sections of 5 microns thickness were stained with hematoxylin – eosin for Van Hizonom. The research of the esophagus status was carried out visually. The number and destruction area were determined grossly with a magnifying glass in bright light.

Biochemical indexes determined in the serum of blood. The biochemical parameters (total protein, albumin, the level of urea, creatinine, K⁺ ions and ALT, AST activity) were determined with analyzer Humalyser 3000 with use of appropriate sets.

Separation of protein fractions serum rats were determined by method disc electrophoresis in 10% polyacrylamide gels (PAGE) with sodium dodecyl sulfate (SDS) by method Lemmli with modifications [17]. For

estimate the results of electrophoresis used the program Totalab 2.01

The statistical analysis of the obtained results was performed using the methods of variation statistics and correlation analysis using the computer program Excel. To determine the reliability of the differences between the two samples we used the Student test (t). Whereby differences $P < 0.05$ were deemed reliable.

Results and discussion. It is known that acetic acid, due to its chemical structure, has an expressed soluble effect on lipids as well as resorptive effect. The dissolution of intercellular lipids causes rapid penetration of acetic acid from the gastrointestinal tract into the vascular bed whereas the dissolution of lipids of cell membranes causes the penetration of acetic acid into the cell as a molecule where they are subjected to dissociation with the formation of acidic ions. The acetic acid effect on mucous tissue is protein folding, takes water from them and leads to the formation of coagulation necrosis with a dense surface crust [7].

We have shown that the 30 % CCl_3COOH penetrates the tissue and results in significant mucosal lesions of the esophagus (Figure 1). It was revealed edema, congestion, damage to the superficial layers of the epithelium, hemorrhages into submucosa.

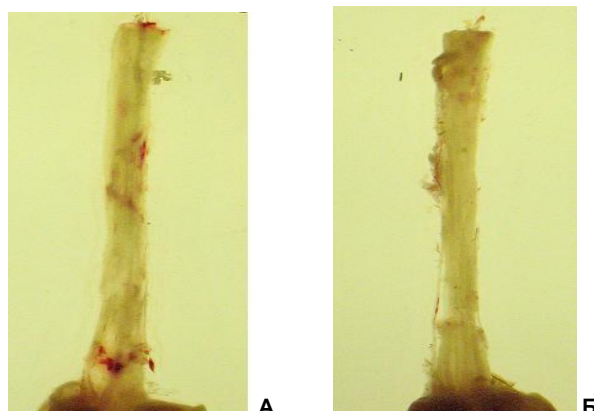


Figure 1. Macrophotography of the rats esophageal mucosa after experimental simulation of an acid burn with 30% CCl_3COOH (A-1st day, B – 7th days)

The micrograph of the esophageal (Figure 2) mucosal lesions demonstrates damage to the esophagus tissues in rats under experimental simulation of AEB through 30% CCl_3COOH : fibrinous, erosive esophagitis (damage to the

mucosa and submucosa). The comparison of the detected lesions and researches of status of the esophageal mucosa of children with 2nd degree burns specified the experimental model conformity [1].

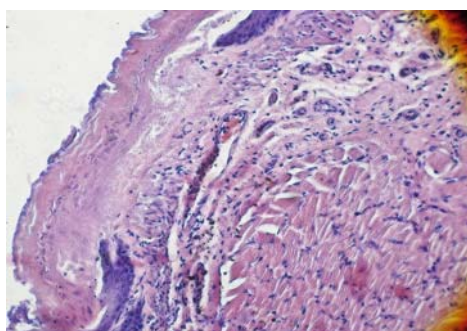


Figure 2. The micrograph of the rat esophageal mucosa after experimental simulation of an acid burn with 30% CCl_3COOH

It is known, the esophagus burn is accompanied with prolonged disturbances of carbohydrate, lipid and protein metabolism leading to the pathological changes into the functioning of various organs and systems [3]. Therefore, one of the major diagnostic criteria of the AEB severity is to determine biochemical parameters. We selected the

following indicators as the level of total protein, albumin, urea, potassium ions, creatinine, AST, ALT, which are the main biochemical parameters of blood serum. They describe a functional state of the organism and assess the degree of metabolic disorders under studied pathology.

We have determined the concentration of total protein in blood serum of rats with chemical burns (30%

CH₃COOH) of the esophagus. In the process, we have obtained the following submitted data in table 1.

Table 1. Biochemical parameters in blood serum of rats under experimental modeling of an acid esophagus burn with 30% CCl₃COOH (M ± m, n = 10)

Parameter	Control	AEB, 30% CCl ₃ COOH		
		1 st day	3 rd day	7 th day
Total protein, (g/l)	64,4±0,2	47,11±2,0*	48,13±1,01*	51,13±1,12*
Albumin, (g/l)	36,5±0,01	16,01±1,36*	20,19±1,9*	21,22±2,01*
Urea, (mmol/l)	8,9±0,11	19,32±2,01*	16,7±2,01*	14,1±1,23*
Creatinine, (μmol/l)	88,9±0,1	175,1±2,3*	171,9±2,1*	145,01±2,9*
K ⁺ , (mmol/l)	5,1±0,01	13,8±1,3*	13,4±1,01*	8,0±1,1*
ALT, (U/l)	27,1±1,0	87,8±1,55*	74,1±0,93*	67,6±2,23*
AST, (U/l)	55,1±1,0	68,1±1,63*	63,1±1,85*	60,09±1,9*

*- $P < 0,05$ compared to control.

It was defined that the experimental burns of the esophagus through 30% CCl₃COOH leads to the significant changes in a total protein content. On the 1, 3 and 7 day of supervisions its content decreased in 1.4; 1.3 and 1.2 times respectively, comparing with control values.

It is defined that on the 1, 3 and 7 days there is decreasing of albumin in 2.3; 1.8 and 1.7 times respectively, comparing with control values. So there is hypoproteinemia, which occurs mainly by reducing the amount of albumin.

The definition of the content of the final products of protein metabolism plays an important role in the clinical laboratory diagnosis, which are viewed as a system of residual nitrogen. Almost a half of the components of this system are provided by urea. The rate of urea is critical for diagnosis of kidney disease in clinic. In the context of chemical burns through 30 % CCl₃COOH, we observed an increase: the level of urea increases on the 1, 3 and 7th day in 2.2; 1.9 and 1.6 times respectively, which may indicate the development of severe disease process. We have determined the level of creatinine in the blood serum of experimental animals. In the process of study we have obtained the following data (table 1), which indicates that the experimental esophageal burn on the 1, 3 and 7th days causes the significant changes of the creatinine, which is usually used as a marker of toxic body effect and may indicate kidney failure. The experimental burn of esophagus predetermined the increase of creatinine in blood serum in the course of the whole period of the study, on the 1, 3 and 7th days in 1.98; 1.93 and 1.63 times compared with control values corresponding literature data. So burn disease are characterized with an acute intoxication, violation of body water and salt metabolism, which often leads to kidney damage [17-19]. The research of the level of K⁺ ions in blood serum of the rats with an acid esophagus burns permitted to determine its increase in 2.7; 2.6; 1.5 times at all time. Modeling esophageal burns the description of aminotransferase activity in blood serum of the rats showed that the ALT was raised in 3.2; 2.7 and 2.5 times as well as the activity of the AST increased in 1.2; 1.1; and 0.9 times, respectively, on the 1, 3, 7 day of the experiment. In case of the acid burns the determined changes indicate significant carbohydrate, lipid and protein metabolism, which may be a proof of formation of a steady state of the 2nd degree-level esophagus burns in the animal experiments.

So, in terms of simulated the 2nd degree-level acid burns – the level of the studied biochemical parameters (total protein, albumin, urea, creatinine) and the activity of AST and ALT levels most varied on the 1st day of the research. Obtained results correspond to literature data and have shown significant damage of water-salt, nitrogen metabolisms and biochemical parameters of liver function at the shock stage (1 day). It can confirm of formation the

stable state an acid esophagus burns of 2nd degree in experimental animals [4].

Electrophoretic analysis of serum protein composition of experimental animals showed in all studied samples, both in control and in conditions of AEB 2 degree, presence of protein fractions with molecular masses from 15 to 168 kDa (Table 2). Conducted researches did not show qualitative changes of protein levels in serum, but it is possible to determine their quantitative changes. Thus, we have shown a growth of protein levels in fractions with m.m. 167 kDa on the 1, 7, and 21st days of experimental acid burns by 15%, 40% and 19% respectively, and reduce on the 15th by 7%. Also, we have established an increase of protein levels in fraction with m.m. 150 kDa on the 7, 15 and 21st days of the experiment by 24% and 37% and 52% respectively compared with control values. These protein stripes correspond to IgG fraction, and in view of obtained data on fluctuations of their levels, of some interest are analysis of their levels and a more detailed study. Increased level of this fraction of immunoglobulins indicates the activation of the immune system and appearance in the bloodstream of "defective" protein molecules, to which antibodies are formed. Analysis of electrophoretograms showed a growth of protein fraction levels with m.m. 130 kDa on the 1th day by 19%, and reduce on the 15th and 21st by 93% and 287% compared with control values after modeling of AEB. We have shown increased levels of the fraction m.m. 113 kDa on the 1th and 15th days by 8% and 13%, and compared with control values This fraction can correspond C-reactive protein, which is a central component of markers of the acute phase of inflammation. Elevated levels of the shown fraction on the 15th day indicate addition of bacterial infection or inflammation caused by non-infectious parts of necrotic tissues. Shown reduction in level of albumin fraction (67 kDa) after modeling of an acid esophagus burn on the 1, 7, 15 and 21st day by 13%, 71%, 50% and 20% respectively compared with control values. We have determined reduction of fraction 55 kDa after modeling of acid burns, which corresponds prealbumin on the 1, 7, 15 and 21st day by 80%, 69%, 125% and 86% respectively. Obtained data may indicate suppression of protein-synthetic function of the liver due to burn injuries. The results of investigations showed that in experimental animals after modeling of chemical burns of the esophagus, the level of postalbumin fraction ~ 40 kDa is reduced on the 1, 7, 15 and 21st days level of this fraction by 170%, 200%, 289% and 324% respectively compared with control values. Level of postalbumin fraction ~ 25 was significantly decreased on the 1, 7, 15 and 21st days by 97%, 104%, 293% and 204% respectively after modeling of acid burns. We have determined reduction level of postalbumin fraction ~ 15 kDa on the 1, 7, 15 and 21st day by 40%, 311%, 310% and 251% respectively compared with control values. Quantitative changes in postalbumin

factions may be associated with increase of degradation processes of tissue proteins due to increase of activity of proteolytic enzymes of different specificity or traumatic effect of chemical factors.

So, after modeling of chemical burns of the esophagus one may talk of hypoproteinemia, which occurs mainly due to reduction in the amount of albumins and activation of humoral immune response.

Table 2. Relative content of proteins fraction in blood serum after modeling of an AEB ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein) with 30% CCl_3COOH ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein), ($M \pm m$, $n=3$)

Proteins fraction m.m. (kDa)	Control	1 st day	7 th day	15 th day	21 st day
γ - globulin fraction – 168	86,8 $\pm$ 2,5	101,6 $\pm$ 0,8*	143,0 $\pm$ 6,9*	80,8 $\pm$ 3,8*	106,0 $\pm$ 4,2*
γ - globulin fraction – 150	156,7 $\pm$ 3,7	152,7 $\pm$ 5,9	203,9 $\pm$ 7,9*	247,0 $\pm$ 8,1*	323,0 $\pm$ 12,9*
130	449,2 $\pm$ 28,9	548,9 $\pm$ 20,3*	468,4 $\pm$ 16,4	231,6 $\pm$ 7,1*	115,9 $\pm$ 3,2*
113	60,8 $\pm$ 2,8	66,0 $\pm$ 3,4	58,5 $\pm$ 2,3	69,4 $\pm$ 2,8*	30,6 $\pm$ 1,4*
103	185,2 $\pm$ 11,7	61,2 $\pm$ 2,5*	42,8 $\pm$ 1,7*	25,7 $\pm$ 1,02*	46,6 $\pm$ 1,9*
89	126,0 $\pm$ 9,1	96,9 $\pm$ 1,4*	84,0 $\pm$ 0,2*	98,0 $\pm$ 0,4*	46,0 $\pm$ 1,8*
Albumin fraction – 67	325,3 $\pm$ 16,7	287,4 $\pm$ 11,5*	189,3 $\pm$ 7,6*	216,0 $\pm$ 16,9*	270,0 $\pm$ 10,8*
Postalbumin fraction ~ 55	221,0 $\pm$ 9,7	122,6 $\pm$ 4,9*	130,1 $\pm$ 5,2*	97,8 $\pm$ 3,9*	118,2 $\pm$ 4,7*
Postalbumin fraction ~ 40	145,0 $\pm$ 0,9	53,7 $\pm$ 2,1 *	48,3 $\pm$ 1,9*	37,2 $\pm$ 0,69*	34,1 $\pm$ 0,96*
Postalbumin fraction ~ 25	79,8 $\pm$ 3,1	40,4 $\pm$ 1,7*	39,1 $\pm$ 2,6*	20,3 $\pm$ 0,4*	26,2 $\pm$ 0,05*
Postalbumin fraction ~ 15	74,5 $\pm$ 1,9	53,2 $\pm$ 2,1 *	18,1 $\pm$ 0,72 *	18,5 $\pm$ 0,74 *	21,2 $\pm$ 0,85 *

* $p < 0,05$ compared with control value

Conclusions. Thus, we have reproduced the model of 2nd degree AEB using 30% CCl_3COOH which was accompanied by corresponding morphological lesions of esophageal mucosa and changes in basic biochemical parameters. This approach may be used in the study of biochemical and immunological mechanisms of pathogenesis of the 2nd degree an acid esophageal burns of on animals.

References

1. Ванцян Э. Н. Лечение ожогов и рубцовых сужений пищевода / Э. Н. Ванцян, Р. А. Тошаков. – Москва, 1971. – 260 с.
2. Волков С. В. Химические ожоги пищевода и желудка. / С. В. Волков, А. С. Ермолаев, Е. А. Лужников. – Москва: Медпрактика, 2005. – 119 с.
3. Гонський Я. І. Біохімія людини. / Я. І. Гонський, Т. П. Максимчук. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2001. – 736 с.
4. Гложик І. З. Деякі біохімічні показники в динаміці опікових хвороб та застосування масажу і ЛФК реабілітації опікових хворих / І. З. Гложик. // Вісник Чернігівського нац. пед. ун-ту імені Т.Г. Шевченка. Серія: Педагогічні науки. Фізичне виховання та спорт. – 2011. – Т. 2, №86. – С. 45 – 48.
5. Доржиев Б. Д. Экспериментальная модель химического ожога пищевода и желудка современными агрессивными химическими агентами. / Б. Д. Доржиев, М. Л. Тыхенова, К. Д. Пунсуков. // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2012. – Т. 86, №4. – С. 46.
6. Ивашкин Т. В. Болезни пищевода. / Т. В. Ивашкин, А. С. Трухманов. – М: Трида-Х, 2000. – 179 с.
7. Лужников Е. А. Клиническая токсикология : учебник. / Е. А. Лужников. – М: Медицина, 1994. – 255 с. – (2-е изд., перераб. и доп.).
8. Разумовский А. Ю. Эволюция взглядов на хирургическое лечение детей с химическими ожогами пищевода / А. Ю. Разумовский, Р. В. Обьеденнова, Н. В. Куликова [и др.]. // Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии. – 2011. – №11. – С. 51–59.
9. Раецька Я. Б. . Відтворення експериментальної моделі хімічного опіку стравоходу у щурів І-го ступеню / Я. Б. Раецька, Т. В. Ішук, О. М. Савчук [та ін.]. // Медична хімія. – 2013. – Т.15, №4. – С. 116–120.
10. Салахов Э. С. Лечение химических ожогов пищевода у детей : дис. канд. мед. наук / Салахов Э. С. – 2008. – 22 с.
11. Сапожникова М. А. Химические ожоги пищевода и их отдаленные исходы при различных методах лечения: : дис. докт. мед. наук / Сапожникова М. А. – Москва, 1978. – 31 с.
12. Черноусов А. Ф. Выбор метода эзофагопластики при доброкачественных заболеваниях пищевода. / А. Ф. Черноусов, В. А. Адрианов, С. А. Домрачев [и др.]. // Анналы хирургии. – 1998. – №1. – С. 48–50.
13. Bustamante T. F. The use of mitomycin C in caustic esophagitis in rats / T. F. Bustamante, P. L. Lourencao, K. L. Higa. // The use of mitomycin C in caustic esophagitis in rats [et al.]. – 2013. – Vol. 28, №2. – P. 136–141. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
14. Dakshesh H. P. Pediatric Thoracic Surgery. / H. P. Dakshesh, C. C. David, W. A. Alexander [et al.]. – Rothenberg: London Limited, 2009. – 601 p. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
15. Ekingen G. Effect of the prostacyclin derivate iloprost in experimental caustic esophageal burn. / G. Ekingen, M. Ozden, S. Sözübir [et al.]. // Pediatric Surgery International – 2005. – Vol 21, №6. – P. 441–444. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
16. Guven A. The efficacy of ozone therapy in experimental caustic esophageal burn. / A. Guven, G. Gundogdu, S. Sadir [et al.]. // Journal Pediatric Surgery. – 2008. – Vol 43, №9. – P. 1679–84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
17. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / Laemmli. – 1970. – №227. – P. 680–685. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
18. Mattos G. M. Effects of time of contact and concentration of caustic agent on the injuries / G. M. Mattos, D. D. Lopes, R. C. Mamede [et al.]. // Laryngoscope. – 2008. Vol. 116– №3. – P. 456–460. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
19. Mutaf O. Treatment of corrosive esophageal strictures by long-term stenting / Mutaf. // Journal Pediatric Surgery. – 1996. – Vol 31, №5. – P. 681–685. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
20. Ocakci A. Role of caffeic acid phenethyl ester, an active component of propolis, against NaOH-induced esophageal burns in rats / A. Ocakci, M. Kanter, M. Cabuk [et al.]. // International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology. – 2006. – №10. – P. 1731–1739. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
21. Ziegler M. M. Operative pediatric surgery / M. M. Ziegler, R. G. Azizkhan, T. R. Weber. – New York: McGraw-Hill, 2003. – 568 p. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Надійшла до редколегії 02.09.15

Я. Раецька, канд. біол. наук, Т. Ішук, асп., Т. Коваль, інж.,
О. Джус, асп., О. Савчук, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВІДТВОРЕННЯ МОДЕЛІ КИСЛОТНОГО ОПІКУ СТРАВОХОДУ II-ГО СТУПЕНЮ

В експерименті на щурах відтворено модель опіку стравоходу II-го ступеню, що викликана введенням 30% CCl_3COOH . Модель опіку стравоходу підтверджена біохімічними показниками крові піддослідних тварин. Запропонований підхід може бути використаний у дослідженні біохімічних та імунологічних механізмів патогенезу опіку стравоходу.

Ключові слова: кислотний опік стравоходу, біохімічні показники.

Я. Раецкая, канд. биол. наук, Т. Ишук, асп., Т. Коваль, инж., Е. Джус, асп., А. Савчук, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВОСПРОИЗВЕДЕНИЕ МОДЕЛИ КИСЛОТНОГО ОЖОГА ПИЩЕВОДА II-Й СТЕПЕНИ

В эксперименте на крысах воспроизведена модель ожога пищевода II-й степени, вызванная введением 30% CCl_3COOH . Модель ожога пищевода подтверждена биохимическими показателями крови подопытных животных. Предложенный подход может быть использован в исследовании биохимических и иммунологических механизмов патогенеза ожога пищевода.

Ключевые слова: кислотный ожог пищевода, биохимические показатели.

УДК: 616.8;577.2.04;612.8

Н. Хошимов, млад. науч. сотруд., К. Насиров, д-р биол. наук
Институт биоорганической химии имени Академика А.С. Садыкова, Ташкент, Республика Узбекистан**ИССЛЕДОВАНИЕ УРОВНЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО Ca^{2+} В СИНАПСОСОМАХ МОЗГА КРЫС, В НОРМЕ И ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ**

В статье рассмотрены механизмы действия этанола на ионные каналы синапсом мозга крыс. Исследовано влияние глутамата на уровень внутриклеточного кальция в синапсосамах мозга контрольных крыс, вызванное глутаматом, что обусловленным в первую очередь активацией мембранной проницаемости, перемещением Ca^{2+} внутрь клетки и освобождением Ca^{2+} из внутриклеточных депо.

Ключевые слова: синапсосома, глутамат, NMDA, глицин, магни, аргиролатин, этанол.

Введение. Алкоголизм и наркомания являются одними из наиболее важных и актуальных проблем современной медицины. Алкоголь изменяет активность глутаматергической системы мозга. Данные о том, что этанол тормозит активность глутамата (торможение возбуждения), находятся в соответствии с результатами экспериментов, что этанол потенцирует активность ГАМК (усиление торможения). Глутамат осуществляет свое возбуждающее действие по крайней мере через три типа рецепторов, описываемых как каинатные, квисклататные и NMDA по типу миметического действия возбуждающих рецепторы агонистов [1]. При этом обнаружено, что алкоголь осуществляет свои эффекты на глутаматергическую передачу, в основном, через NMDA-рецепторы.

Следует отметить, что мишенью этанола являются в основном рецепторы NMDA-подтипа, функционально связанные с кальциевыми каналами [2, 3]. NMDA-рецептор представляет собой целый рецепторно-ионофорный комплекс, включающий в себя:

1. сайт специфического связывания медиатора (L-глутаминовой кислоты);
2. регуляторный, или коактивирующий, сайт специфического связывания глицина;
3. аллостерические модуляторные сайты, расположенные на мембране (полиаминовый) и в ионном канале (сайты связывания фенциклидина, двухвалентных катионов и потенциалзависимый Mg-связывающий участок).

Ионы Mg^{2+} селективно блокируют активность рецепторов при высокой гиперполяризации или деполяризации. Глицин усиливает ответы NMDA-рецептора, увеличивая частоту открывания канала. При полном отсутствии глицина рецептор не активируется L-глутаматом [4, 5].

Цель исследования: Исследование уровня внутриклеточного Ca^{2+} в синапсосамах мозга крыс, в норме и при хронической алкогольной интоксикации.

Материалы и методы исследования. Модельные эксперименты проводили на 20 беспородных белых

крысах самцах массой (200-250 г.) содержащиеся на стандартном рационе вивария. Все эксперименты выполняли в соответствии с требованиями "Всемирного общества защиты животных" и "Европейской конвенции по защите экспериментальных животных" [6]. Подсчитывали по каждой группе фоновые среднесуточные потребления 15% этанола на 1 кг веса. Контрольной группе животных в аналогичных условиях опыта вводили дистиллированную воду. Синапсосомы выделяли из мозга крыс методом двухэтапного центрифугирования [7]. Вся процедура выделения осуществлялась при 4 °C.

Для измерения количества цитозольного Ca^{2+} в синапсосамах, выделенных из мозга крыс с хронической алкогольной интоксикацией помещенным в среду, аналогичную, той которая использовалась для выделения клеток, добавляли 20 мкМ хлортетрациклина (ХТЦ). Инкубировали 60 мин для достижения максимального взаимодействия ХТЦ с мембраносвязанным Ca^{2+} , как на плазматической, так и внутриклеточных мембранах. Длина волны возбуждения ХТЦ – 405 нм, регистрации – 530 нм. Результаты выражали в процентах, принимая за 100% разность между максимальным значением интенсивности флуоресценции (флуоресценция красителя, насыщенного Ca^{2+}) и минимальным ее значением (флуоресценция индикатора в отсутствие Ca^{2+}), полученным после добавления этиленгликоль-бис-аминоэтил-тетраацетат ЭГТА.

Измерение проводились с помощью флуориметра (Hitachi, Япония) и (Ocean Opticsinc., Firstin PhotonicsTM. USB 2000.США, 2010.). Статистическую значимость различий между контрольными и опытными значениями определяли для ряда данных, используя парный t-тест, где контрольные и опытные значения взяты вместе, и непарный t-тест, если они взяты раздельно. Значение $P < 0,05$ указывало на статистически значимые различия.

Полученные результаты статистически обработаны на Origin 6.1 (OriginLab Corporation, США).

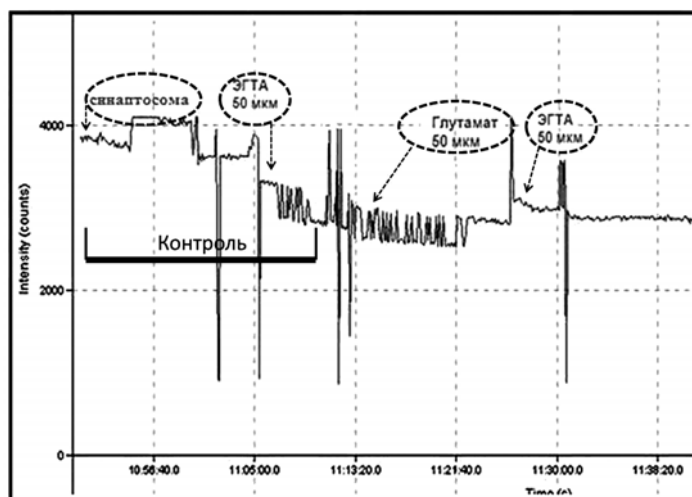


Рис.1. Влияние глутамата и ЭГТА на уровень внутриклеточного кальция в синапсосамах мозга крыс (оригинальная запись)

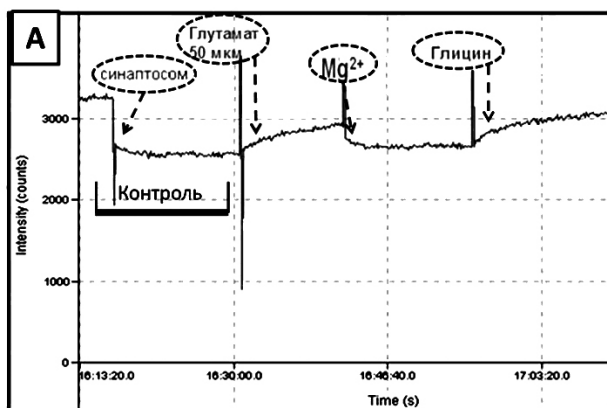
Результаты и обсуждение. Исследовано влияние глутамата на уровень внутриклеточного кальция в си-

напсосамах мозга контрольных крыс. Предварительно с помощью Ca^{2+} -чувствительного зонда хлортетрациклина-бис-аминоэтил-тетраацетат ЭГТА.

© Хошимов Н., Насиров К., 2015

на (ХТЦ) установлено отношение флуоресценции, возбуждаемой светом с длинами волн 340 и 380 нм (F_{340}/F_{380}) в синапсомемах. При удалении Ca^{2+} из внеклеточной среды, преинкубирование ЭГТА приводил к снижению флуоресценции на 5%. В присутствии в инкубационной среде ЭГТА, глутамат в концентрациях 1-100 мкМ дозозависимо увеличивает уровень флуоресценции на 5-10%, что свидетельствует об увеличении концентрации Ca^{2+} в цитозоле ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), вызванное глутаматом, обусловленным в первую очередь активацией мембранной проницаемости, перемещением Ca^{2+} внутрь клетки и освобождением Ca^{2+} из внутриклеточных депо (рис.1.).

Известно, что ионы Mg^{2+} селективно блокируют активность NMDA-рецепторов. Глицин усиливает ответы NMDA-рецептора, увеличивая частоту открывания канала. При полном отсутствии глицина рецептор не активируется L-глутаматом.



В частности компоненты, выделенные из яда паука *Argiope lobata*, A-V-2 (м.м. 637 Да) конкурентно ингибируют связывание глутамата, а аргиолобатин (AV-7-7 - м.м. 657 Да) увеличивает связывание L- ^3H -глутамата с синаптическими мембранами подобно агентам, углубляющим десенситизацию глутаматных рецепторов.

Действительно, добавление в инкубационную среду 5мкМ глицина усиливало глутамат-зависимое увеличение флуоресценции на 15-20%. В то же время ионы Mg^{2+} (50мкМ) ингибировали глутамат-индуцируемое освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо (рис. 2.A).

В ранее проведенных нами исследованиях в целях поиска новых блокаторов глутаматного рецептора из яда пауков семейства *Araneidae* выделен ряд низкомолекулярных компонентов (~1000Да). Последние подавляли токи, индуцируемые глутаматом, действуя на уровне рецептор-канального комплекса глутаматного рецептора.

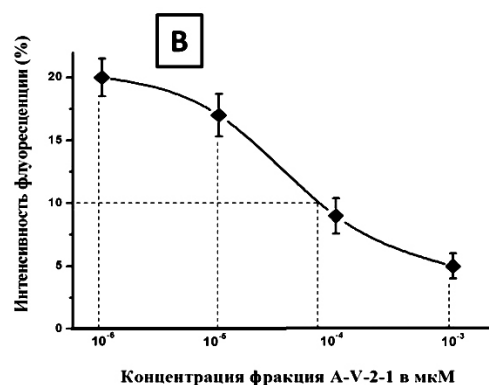


Рис. 2. А) Влияние ионов магния и глицина на глутамат-индуцированное изменение уровня внутриклеточного кальция. Изменение флуоресценции при добавлении глутамата (50 мкМ), магния (50 мкМ) и глицина (5 мкМ).

В) Влияние фракции AV-2-1 на связывание [^3H]-МК-801 с фракцией синапсомембранных из мозга крыс

Примечание: во всех случаях $P < 0,05$ ($n=6$)

При этом было установлено, что оба токсина взаимодействуют с NMDA-рецепторами. Токсин AV-2-1 в микромолярных концентрациях проявляет ингибирующее действие на связывание [^3H]-МК-801 (NMDA-антагонист) с фракцией синаптических мембран. При этом AV-2-1 полностью снимает стимулирующий эффект глутамата. Из этого можно сделать вывод, что

токсин AV-2-1 конкурентно взаимодействует с глутаматными участками NMDA-рецепторов (рис.2.B).

В отличие от AV-2-1, аргиолобатин в разных концентрациях проявлял двухфазный характер действия, т.е. как потенцирующим, так и ингибирующим действием, специфически взаимодействуя с Ca^{2+} -каналами L-типа NMDA-рецептора.

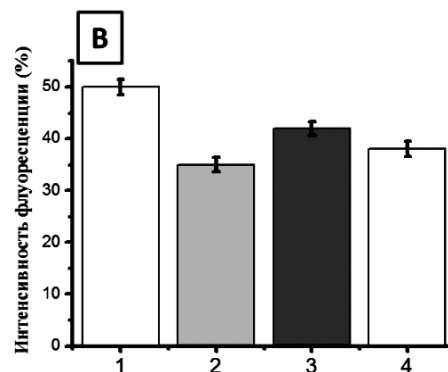
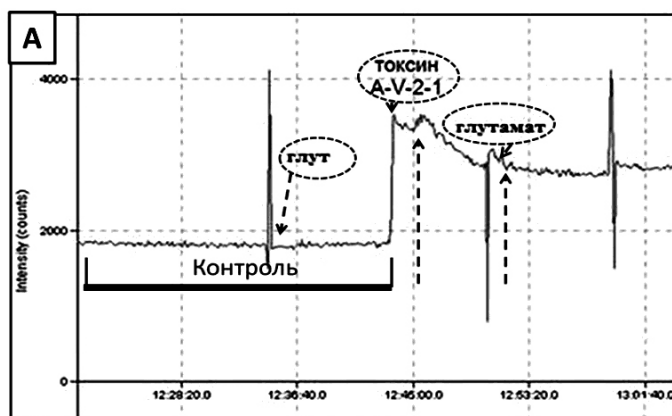


Рис.3. А) Влияние токсина AV-2-1 на глутамат-индуцированное изменение уровня внутриклеточного кальция.

В) Влияние этанола на изменение мембраносвязанного Ca^{2+} в синапсомемах мозга крыс.

1 – контроль, показание флуоресценции комплекса ХТЦ-синапсомема, интактных крыс.

2 – флуоресценция комплекса ХТЦ-синапсомема мозга крыс при хронической алкогольной интоксикации;

3 – при добавлении 50 мкМ глутамата; 4 – при добавлении 5 мкМ глицина

В дальнейших экспериментах была проверена специфичность взаимодействия глутамата с синапсомемами мозга крыс, в присутствии токсинов AV-2-1 и а-

ргиолобатина. Преинкубирование синапсомема с токсинами AV-2-1 и аргиолобатина, затем добавление глутамата не приводило к увеличению флуоресценции, и

соответственно к увеличению уровня цитозольного кальция (рис.3.А).

Полученные результаты показывают, что токсины AV-2-1 и аргиолобатин блокируют связывание глутамата с NMDA-рецепторами.

Исследование уровня внутриклеточного Ca^{2+} в синапсосах мозга крыс при хронической алкогольной интоксикации показало, что уровень флуоресценции комплекса ХТЦ-синапсоса ниже по сравнению с контролем. Добавление в инкубационную среду 50 мкМ глутамата не приводило к значительным изменениям флуоресценции соответственно клеточного метаболизма, обусловленным в первую очередь активацией мембранной проницаемости, перемещение Ca^{2+} внутрь клетки. Добавление в инкубационную среду 5 мкМ глицина также не влияло на уровень внутриклеточного Ca^{2+} (рис.3.В).

Таким образом, полученные результаты показывают, что хроническая алкогольная интоксикация приводит к повышению чувствительности NMDA-рецепторов и усилению кальциевого тока, что в свою очередь приводит к повышению внутриклеточной концентрации ионов кальция.

Результаты показывают, что методом флуоресценции, используя в качестве инструмента флуоресцентные зонды ХТЦ и Fura 2AM, блокаторы NMDA-рецепторов, AV-2-1 и аргиолобатин, можно исследовать механизмы регуляции глутаматергической нейромедиаторной системы.

Выводы. Результаты показывают, что токсины AV-2-1 и аргиолобатин блокируют связывание глутамата с NMDA-рецепторами. Хроническая алкогольная интоксикация приводит к повышению чувствительности

NMDA-рецепторов и усилению кальциевого тока, что в свою очередь приводит к повышению внутриклеточной концентрации ионов кальция.

Acknowledgements. Работа выполнена при финансовой поддержке Программы прикладных исследований АН РУз по проекту ФА-А10-Т086 – "Разработка новых методов профилактики и лечения алкоголизма и связанных с ним осложнений". Конфликт интересов не заявляется.

Список использованных источников

1. Watkins J.C. Agonists and antagonists for excitatory amino acid receptors/ Watkins J.C., Olverman H.J.// Trends Neuroscience, Vol. 10. 1987. page – 265-272. Available from: <http://www.sciencedirect.com>
2. Devaud L.L. Ethanol dependence has limited effects on GABA or glutamate transporters in rat brain/ Devaud L.L.// Alcohol Clinical. Experimental Research – 2001. – Vol. 25, № 4. – p. 606-611. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
3. Maragos W.F. Anatomic correlation of NMDA [3H]-TCP-labelled receptors in rat brain/ Maragos W.F., Penney J.B., Young A.B. // Journal Neuroscience – 1988. – Vol. 8, N 2. – p. 493-501. Available from: www.jneurosci.org
4. Tsai G.E. The role of glutamatergic neurotransmission in the pathophysiology of alcoholism/ Tsai G.E., Coyle J.T.// Annual Review. Medicine Select Topical Clinical Science – 1998. –Vol. 49. – p.173-184. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
5. Бонитенко Ю. Ю. Острые отравления этанолом и его суррогатами. – СПб.: Изд-во "ЭЛБИ-СПБ", 2005. – 225 с. Available from: <http://www.booksmed.com>
6. "Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях". Страсбург, 18 марта 1986 года. Available from: <http://conventions.coe.int>
7. Weiler, M.H. Choline uptake and acetylcholine synthesis in synaptosomes: Investigations using two differently labelled variants of choline / Weiler, M.H., C.B. Gundersen., D.J. Jenden. // Journal Neurochemistry – 1981, № 36. – p.1802-1812. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com>

Надійшла до редколегії 02.09.15

Н. Хошимов, молод. наук. співроб., К. Насиров, д-р біол. наук
Інститут біоорганічної хімії ім. академіка А.С. Садикова, Ташкент, Республіка Узбекистан

ДОСЛІДЖЕННЯ РІВНЯ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННИХ Ca^{2+} У СІНАПСОМАХ МОЗКУ ЩУРІВ В НОРМІ І ПРИ ХРОНІЧНІЙ АЛКОГОЛЬНІЙ ІНТОКСИКАЦІЇ

У статті розглянуто механізми дії етанолу на іонні канали синапсомозку щурів. Досліджено вплив глутамату на рівень внутрішньоклітинного кальцію в синапсосах мозку контрольних щурів, викликане глутаматом, що обумовлене в першу чергу активцією мембранної проникності, переміщенням Ca^{2+} в середину клітини і звільненням Ca^{2+} з внутрішньоклітинних депо.

Ключові слова: синапсоси, глутамат, NMDA, глицин, магній, аргиолобатин, етанол

N. Hoshimov, junior researcher., K. Nasirov, DSc
Institute of Bioorganic Chemistry. Academic A. S. Sadykov, Tashkent, Republic of Uzbekistan

RESEARCH OF LEVEL OF INTRACELLULAR Ca^{2+} IN SYNAPTOSOMES OF THE BRAIN OF RATS, IN NORM AND AT CHRONIC ALCOHOLIC INTOXICATION

Studying of mechanisms of effect of ethanol on ionic canals synaptosome a brain of rats. Influence of a glutamate on the level of intracellular calcium in the synaptosomes of a brain of control rats is investigated. Caused by the glutamate caused first of all by activation of membrane permeability, movement of Ca^{2+} in a cage and release of Ca^{2+} from intracellular depots.

Key words: synaptosomes, glutamate, NMDA, glycine, magnesium, argiolobatin, ethanol.

УДК:579.083.13;616.39:613.24

А. Польшакова, студ., М. Яшук, студ., І. Прибитько, канд. біол. наук, Т. Фалалєєва, д-р біол. наук
Київський національний університеті мені Тараса Шевченка, Київ,
Н. Кобиляк, канд. мед. наук
Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ

ПАРАМЕТРИ ЛІПІДНОГО ОБМІНУ ПРИ ГЛУТАМАТ-ІНДУКОВАНОМУ ОЖИРІННІ У ЩУРІВ ЗА УМОВ КОРЕКЦІЇ ПРОБІОТИЧНИМИ ШТАМАМИ ЛАКТОБАЦИЛ ТА БІФІДОБАКТЕРІЙ

Дослідили вплив пробіотикотерапії на ліпідний обмін щурів, яким після народження вводили глутаматнатрію. Ожиріння викликали шляхом неонатального введення глутамату натрію (4 мг/г, підшкірно) на 2, 4, 6, 8, 10 день життя. Введення пробіотиків починали через 4 тижні після народження та продовжували двотижневими курсами з перервами у 2 тижні. Через 4 місяці у щурів всіх груп було визначено вміст холестерину, тригліцеридів, ліпопротеїдів високої щільності, ліпопротеїдів низької щільності, ліпопротеїдів дуже низької щільності сироватки крові. Неонатальне введення глутамату натрію призводило до зростання вмісту тригліцеридів, холестерину, ліпопротеїдів дуже низької щільності та зниження вмісту ліпопротеїдів високої щільності. Періодичне введення комбінованих пробіотиків запобігало суттєвим порушенням ліпідного обміну у щурів з ожирінням гіпоталамічного генезу. Найбільш значний ефект мав комбінований пробіотик на основі штамів *Lactobacillus casei* IMVB-7280, *Bifidobacterium animalis* VKL, *Bifidobacterium animalis* VKB. Періодичне введення пробіотичних штамів біфідобактерій та лактобацил запобігало порушенню ліпідного обміну, що викликане ожирінням гіпоталамічного генезу.

Ключові слова: ожиріння, обмін речовин, цукровий діабет 2 типу, пробіотики.

Вступ. Обмін речовин є одним з найважливіших процесів для підтримання життєдіяльності і гомеостазу

організму. Відомо, що здоров'я формується в дитячому віці, і багато функціональних порушень, що спостеріга-

ються в дитинстві, з роками трансформуються у хронічні захворювання. Це повною мірою відноситься і до гастроентерологічних захворювань, які за поширеністю і зверненнями за медичною допомогою займають лідируючі позиції в структурі захворюваності дитячого населення України. Між тим, характер харчування дітей і підлітків у наші дні викликає серйозну стурбованість: все зростає споживання продуктів "fastfood", що супроводжується зниженням частки в денному раціоні овочів, фруктів, молочних і кисломолочних продуктів серйозним чином відбивається на стані здоров'я дітей. Глутамат натрію (E 621) – найрозповсюдженіша харчова добавка (посилувач смаку). Важко знайти консерви, напівфабрикати або готові продукти, вироблені промисловим шляхом, в яких не було б глутамату натрію. При цьому допустимі норми можуть бути значно перевищені, що може призводити до захворювань травного тракту та ожиріння [1].

В сучасній науковій літературі все частіше дискутується питання взаємозв'язку ожиріння і порушення мікробіоценозу товстої кишки. При аналізі бактеріального генома (мікробіома) у мишей, які страждають спадковим ожирінням, виявлено різке зниження в кишечнику частки бактерій з групи *Bacteroidetes* в порівнянні зі звичайними мишами, тоді як частка бактерій з групи *Firmicutes*, навпаки, підвищена [5]. Схожі зміни були виявлені і у людей: при обстеженні 12 пацієнтів з ожирінням виявлено, що в їх кишечнику менше *Bacteroidetes* і більше *Firmicutes* в порівнянні з контрольною групою худих людей. Потім пацієнтам була запропонована низькокалорійна дієта з обмеженням жирів або вуглеводів, а дослідники протягом року стежили за змінами їх кишкової флори. Виявилося, що дієта призводить до значного зниження чисельності *Firmicutes* і зростання чисельності *Bacteroidetes*, причому ці зміни корелювали зі ступенем зниження маси тіла [4].

Незважаючи на те, що *Bacteroidetes* і *Firmicutes* є домінуючими мікроорганізмами в кишковому біоценозі, там також присутні метаногенні бактерії, серед яких переважає *Methanobrevibacter smithii*. Ці мікроорганізми виділяють метан підвищують ефективність засвоєння їжі мікробним співтовариством, оскільки вони утилізують водень та інші кінцеві продукти, які утворюються внаслідок ферментації полісахаридів. При подвійній колонізації кишечника безмікробних мишей *Methanobrevibacter smithii* було встановлено, що вилучення енергії з полісахаридів їжі ефективніше, ніж при роздільній колонізації, і супроводжується збільшенням маси жирової тканини [8].

Нормалізація ваги відіграє важливу роль у лікуванні та профілактиці ЦД 2-го типу. Очевидно, що зміна способу життя та якості харчування в поєднанні зі збільшенням рухової активності (тобто створення енергетичного дефіциту) представляється основним засобом корекції ожиріння [3]. І хоча роль мікробіоценозу кишечника в регуляції енергетичного обміну не до кінця зрозуміла, вплив на кишкову мікрофлору може сприяти корекції ожиріння і компенсації ЦД 2-го типу.

У зв'язку з вище вказаним метою роботи було дослідити вплив пробіотикотерапії на ліпідний обмін щурів, яким після народження вводили глутамат натрію.

Методи досліджень. Дослідження проведені на 60 щурах-самцях з дотриманням нормативів Конвенції з біоетики Ради Європи 1997 року, Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей, загальних етичних принципів експериментів на тваринах,

ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 року), інших міжнародних угод та національного законодавства у цій галузі. Тварин утримували в умовах акредитованого віварію згідно зі "Стандартними правилами по упорядкуванню, устаткуванню та утриманню експериментальних біологічних клінік (віваріїв)". Прилади, що використовувалися для наукових досліджень, підлягали метрологічному контролю.

Щури були розділені на 6 груп по 10 тварин в кожній. Новонародженим щурам I групи підшкірно у об'ємі 8 мкл/г вводили плацебо (фізіологічний розчин). Новонародженим щурам II та III груп підшкірно у об'ємі 8 мкл/г вводили глутаматнатрію (4 мг/г) відповідно на 2, 4, 6, 8, 10 день життя [6]. Впродовж 4 місяців після народження щури знаходилися на звичайному харчовому раціоні. Група II відповідно отримувала 2,5 мл/кг води (в/ш). III, IV, V, VI групи відповідно отримували 2,5 мл/кг водного розчину суміші пробіотиків (2:1:1 *Lactobacillus casei* MVB-7280, *Bifidobacterium animalis* VKL, *Bifidobacterium animalis* VKB; *Bifidobacterium animalis* VKL; *Bifidobacterium animalis* VKB; *Lactobacillus casei* MVB-7280 відповідно) у дозі 5×10^9 КУО/кг (50 мг/кг) (внутрішньошлунково, в/ш). Введення починали через 4 тижні після народження та продовжували двотижневими курсами з перервами у 2 тижні. Вміст холестерину, тригліцеридів, ліпопротеїдів високої щільності (ЛПВЩ), ліпопротеїдів низької щільності (ЛПНЩ), ліпопротеїдів дуже низької щільності (ЛПДНЩ) у сироватці крові визначали ензиматичним спектрофотометричним методом з використанням біохімічних наборів Pointe Scientific Inc. (США).

Результати. Загально відомим є факт, що за умов ожиріння відбуваються зміни ліпідного обміну: в крові зростає рівень тригліцеридів, холестерину ліпопротеїдів дуже низької щільності (ЛПДНЩ) та знижується вміст ліпопротеїдів високої щільності (ЛПВЩ). Зазначені показники були нами виміряні за умов ожиріння гіпоталамічного генезу, викликаного неонатальним введенням глутамату натрію. За використаної моделі показник вмісту тригліцеридів підвищувався в 3 рази ($p < 0,01$), загального холестерину на 57,0% ($p < 0,01$) щодо інтактних щурів (табл. 1). Реєстрували зміщення концентрації ліпопротеїдів в бік ЛПДНЩ, концентрація яких збільшувалася в 3,1 рази ($p < 0,01$) порівняно з інтактними тваринами, а ЛПНЩ при цьому зростала на 84,1% ($p < 0,01$) у щурів з ожирінням. Разом з тим у цих тварин спостерігали суттєве зменшення ЛПВЩ на 37,7 ($p < 0,01$) у порівнянні з інтактними щурами. Отримані дані свідчать про погіршення ліпідного обміну у щурів з ожирінням гіпоталамічного генезу.

Періодичне введення пробіотиків двотижневими курсами здійснювало суттєвий вплив на обмін ліпідів у дослідних тварин. Значення рівня тригліцеридів були меншими при введенні моноштамних пробіотиків, проте, це зменшення не мало статистично значущої різниці порівняно з контрольними щурами з ожирінням. Проте, застосування пробіотичної суміші *Bifidobacterium animalis* VKL і VKB та *Lactobacillus casei* MVB-7280 (1:1:2) призвело до зниження рівня тригліцеридів на 17,1% ($p < 0,05$) щодо щурів з ожирінням. Хоча концентрація тригліцеридів цій групі тварин перевищувала показники інтактних щурів в 2,48 рази (табл.1).

Таблиця 1. Біохімічні показники ліпідного обміну в сироватці крові щурів за умов глутамат-індукованого ожиріння та корекції пробіотиками (M±m, n=10 у кожній групі)

Показники	Інтактні щури	Щури з ожирінням				
		Контрольні щури з ожирінням	<i>B. animalis</i> VKL і VKB та <i>L. casei</i> MVB-7280 (1:1:2)	<i>B. animalis</i> VKL	<i>B. animalis</i> VKB	<i>L. casei</i> MVB-7280
Тригліцериди, ммоль/л	1,17±0,09	3,52±0,16**	2,91±0,23*#	3,11±0,19*	3,07±0,19*	2,80±0,18*#
Загальний холестерин, ммоль/л	4,54±0,09	7,12±0,06 **	4,75±0,12 ##	5,19±0,13 ***	5,50±0,15 ***	4,93±0,15 ***
Ліпопротеїди дуже низької щільності, ммоль/л	0,51±0,04	1,57±0,03 **	1,09±0,12 *#	1,23±0,13 *#	1,25±0,12 *#	1,21±0,11*#
Ліпопротеїди низької щільності, ммоль/л	2,36±0,07	4,34±0,07 **	2,98±0,15 ***	3,58±0,16 *#	3,27±0,14 *#	3,11±0,13 *#
Ліпопротеїди високої щільності, ммоль/л	1,65±0,05	1,03±0,06 **	1,44±0,04 *#	1,20±0,04 *#	1,26±0,04 *#	1,31±0,04 *#

*, ** - $p < 0,05$, $p < 0,001$ порівняно з інтактними щурами

#, ## – $p < 0,05$, $p < 0,001$ порівняно з контрольними щурами з ожирінням

Концентрація холестерину в сироватці крові щурів після курсів пробіотикотерапії значно знижувалася. Так, монопробіотики зменшували даний показник на 27,2% ($p < 0,01$), 22,8% ($p < 0,01$) та 30,8% ($p < 0,01$) при застосуванні *Bifidobacterium animalis* VKL, *Bifidobacterium animalis* VKB та *Lactobacillus casei* MVB-7280 відповідно. При цьому відновлення до показників інтактних щурів не було виявлено: при введенні *Bifidobacterium animalis* VKL вміст холестерину був вищий на 14,3% ($p < 0,05$), при введенні *Bifidobacterium animalis* VKB – на 21,2% ($p < 0,05$), при введенні *Lactobacillus casei* MVB-7280 – на 8,6% ($p < 0,05$) щодо інтактних тварин. Найбільш виражений вплив на рівень холестерину здійснював трьохштамний пробіотик, який зменшував даний показник на 33,2% ($p < 0,01$) порівняно зі щурами з ожирінням. Варто зауважити, що значущих відмінностей між цією групою тварин та інтактними щурами не було виявлено, отже, рівень холестерину в групі тварин, що отримували комбінований пробіотик був в нормі.

Концентрація ЛПДНЩ у групах тваринах, яким вводили монопробіотики, знаходилася приблизно на одному рівні і була нижчою на 21,6% ($p < 0,05$) при введенні *Bifidobacterium animalis* VKL, на 20,5% ($p < 0,05$) при введенні *Bifidobacterium animalis* VKB та 23,3% ($p < 0,05$) при введенні *Lactobacillus casei* MVB-7280 в порівнянні з контрольними тваринами з ожирінням (табл. 1). Схожа тенденція була виявлена і для показника ЛПНЩ, який зменшувався в групі тварин, що отримувала *Bifidobacterium animalis* VKL на 17,5% ($p < 0,05$), *Bifidobacterium animalis* VKB – на 24,7% ($p < 0,05$), *Lactobacillus casei* MVB-7280 – на 28,3% ($p < 0,05$) порівняно з показниками щурів з ожирінням. Проте відновлення ЛПДНЩ та ЛПНЩ до показників інтактних щурів при введенні монопробіотиків не було виявлено. Рівень ЛПВЩ частково підвищувався при введенні моноштамів: *Bifidobacterium animalis* VKL на 16,2% ($p < 0,05$), *Bifidobacterium animalis* VKB – на 22,6% ($p < 0,05$), *Lactobacillus casei* MVB-7280 – на 27,7% ($p < 0,05$) порівняно з тваринами, у яких моделювали ожиріння. Вміст даного ліпопротеїду при введенні *Bifidobacterium animalis* VKL був меншим на 27,6% ($p < 0,05$) щодо інтактних щурів, при введенні *Bifidobacterium animalis* VKB – на 23,5% ($p < 0,05$), *Lactobacillus casei* MVB-7280 – на 20,4% ($p < 0,05$).

Найбільш значний вплив на рівень ліпопротеїдів був виявлений в групі щурів, яким вводили трьохштамний пробіотик *Bifidobacterium animalis* VKL і VKB та *Lactobacillus casei* MVB-7280 (1:1:2). ЛПДНЩ та ЛПНЩ при введенні комбінованого пробіотика зменшувалися на 30,7% ($p < 0,05$) та 31,3% ($p < 0,01$) відповідно порівняно з контрольними щурами з ожирінням. Показник концентрації ЛПВЩ при застосуванні цього пробіотика зби-

льшувався на 40,3% ($p < 0,05$). Незважаючи на високу ефективність біохімічні параметри ліпідного обміну не нормалізувалися до рівня інтактних щурів. Так, ЛПДНЩ перевищував контрольні показники в 2,14 рази ($p < 0,05$), ЛПНЩ – на 26,3% ($p < 0,05$), а рівень ЛПВЩ був нижчим на 12, 5% ($p < 0,05$).

Отже, підсумовуючи одержані результати, можна стверджувати, що періодичне введення пробіотичних штамів запобігало суттєвим порушенням ліпідного обміну у щурів з ожирінням гіпоталамічного генезу. Найбільш виражений вплив був виявлений у групі щурів, яким вводили комбінований пробіотик *Bifidobacterium animalis* VKL і VKB та *Lactobacillus casei* MVB-7280 (1:1:2), який значно зменшував концентрацію тригліцеридів, нормалізував рівень холестерину, знижував рівень ЛПДНЩ, ЛПНЩ та підвищував концентрацію ЛПВЩ практично до показників інтактних тварин. Щодо механізму цієї дії пробіотиків, то встановлено, що кишкова мікробіота синтезує велику кількість глікозидних гідролаз, які розщеплюють складні рослинні полісахариди до моносахаридів та коротколанцюгових жирних кислот (КЛЖК)- ацетату, пропіонату і бутирату. КЛЖК беруть участь у секреції слизу, регуляції іонного обміну, пригнічують ріст умовно-патогенної мікрофлори, інактивують шкідливі метаболіти та ферменти, відіграють важливу роль в енергетичному і конструктивному обміні кишкового епітелію, активують місцевий імунітет та блокують адгезію до епітелію агресивної мікрофлори. КЛЖК є важливим джерелом енергії для ліпогенезу та є лігандами для рецепторів вільних жирних кислот (FFAR)- Gpr41(FFAR3)(Gpr41-G-protein-coupled receptors) та GPr43 (FFAR2) в ентероендокринних клітинах кишечника [2,7].

Висновок: Періодичне введення пробіотичних штамів біфідобактерій та лактобацил запобігає порушенню ліпідного обміну, що викликане ожирінням гіпоталамічного генезу.

Робота містить результати досліджень, проведених при грантовій підтримці Держаного фонду фундаментальних досліджень за конкурсним проектом "Механізми профілактично-лікувальної дії пробіотиків за умов розвитку ожиріння гіпоталамічного генезу" (2015 р., № держреєстрації 0115U004862).

Список використаних джерел

1. Фалалеева Т.М. Вплив тривалого введення глутамату натрію на структурно-функціональний стан шлунка та масу тіла щурів / Фалалеева Т.М., Кухарський В.М., Берегова Т.В. // Фізіологічний журнал – 2010. – Т. 56, № 4. – С. 102-110.
2. Canfora E.E. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity/ Canfora E.E., Jocken J.W., Blaak E.E. // Natural Review Endocrinology. 2015 Oct;11(10):577-591.
3. Kerner J. To eat or not to eat-how the gut talks to the brain / Kerner J., Leibel R. I. // The New England Journal of Medicine. 2003; 349 (10): 926-928.

4. Ley R. E. Microbiome ecology: human gut microbes associated with obesity. / Ley R. E., Turnbaugh P. J., Klein S., Gordon J. I. // Nature. 2006; 444 (7122): 1022–1023.

5. Ley R. E. Obesity alters gut microbiome ecology/ Ley R. E., Buckhed F., Turnbaugh P. J., Lozupone C. A., Knight R. D., Gordon J. I. // Proceedings of the National Academy Science USA. 2005, Aug 2; 102 (31): 11070–11075.

6. Oida K. Plasma lipoproteins of monosodium glutamate-induced obese rats. / K. Oida, T. Nakai, T. Hayashi [et al.] // International journal of obesity. – 1984. – Vol. 8, No. 5. – P. 385–91.

7. Remely M. Effect of short chain fatty acid producing bacteria on epigenetic regulation of FFAR3 in type 2 diabetes and obesity/ Remely M, Aumüller E, Merold C, Dworzak S, Hippe B, Zanner J, Pointner A, Brath H, Haslberger AG // Gene. 2014 Mar 1; 537 (1): 85–92.

8. Samuel B. S. A humanized gnotobiotic mouse model of host archaeal-bacterial mutualism/ Samuel B. S., Gordon J. I. // Proceedings of the National Academy Science USA. 2006, Jun 27; 103 (26): 10011–10016.

Надійшла до редколегії 08.12.15

А. Польшакова, студ., М. Яшук, студ., І. Прибытько, канд. биол. наук, Т. Фалалеева, д-р биол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,

Н. Кобыляк, канд. мед. наук

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ, Україна

ПАРАМЕТРЫ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА ПРИ ГЛУТАМАТ-ИНДУЦИРОВАННОМ ОЖИРЕНИИ У КРЫС В УСЛОВИЯХ КОРРЕКЦИИ ПРОБИОТИЧЕСКИМИ ШТАММАМИ ЛАКТОБАЦИЛЛ И БИФИДОБАКТЕРИЙ

Изучено влияние пробиотикотерапии на липидный обмен крыс, которым после рождения вводили глутамат натрия. Ожирение вызывали путем неонатально введения глутамата натрия (4 мг/кг, подкожно) на 2, 4, 6, 8, 10 дни жизни. Введение пробиотиков начинали спустя 4 недели после рождения и продолжали двухнедельными курсами с перерывами в 2 недели. Через 4 месяца у крыс всех групп был проведен анализ содержания холестерина, триглицеридов, липопротеидов высокой плотности, липопротеидов низкой плотности, липопротеидов очень низкой плотности в сыворотке крови. Неонатальное введение глутамата натрия приводило к повышению уровня триглицеридов, холестерина, липопротеидов очень низкой плотности и снижению содержания липопротеидов высокой плотности. Периодическое введение комбинированных пробиотиков предотвращало существенное нарушение липидного обмена у крыс с ожирением гипоталамического генеза. Наиболее значительным эффектом обладают комбинированный пробиотик на основе штаммов *Lactobacillus casei* IMVB-7280, *Bifidobacterium animalis* VKL, *Bifidobacterium animalis* VKB. Периодическое введение пробиотических штаммов бифидобактерий и лактобацилл предотвращает нарушение липидного обмена, вызванного ожирением гипоталамического происхождения.

Ключевые слова: ожирение, обмен веществ, сахарный диабет 2 типа, пробиотики.

A. Polshakova, stud., M. Yashuk, stud., I. Prybytko, Phd., T. Falalayeva, DSc.
Taras Shevchenko National University of Kyiv. Institute of Biology, Kyiv, Ukraine,
N. Kobylak, Phd.
Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

PARAMETERS OF LIPID METABOLISM IN GLUTAMATE-INDUCED OBESITY IN RATS UNDER CORRECTION PROBIOTIC STRAINS OF LACTOBACILLI AND BIFIDOBACTERIA

To investigate the effect of probiotic strains on lipid metabolism of rats which were administered after the birth of monosodium glutamate. Obesity was induced by neonatal administration of monosodium glutamate (4 mg/g, s.c.) at 2, 4, 6, 8, 10-day life. The introduction of probiotics started at the end of 4 week after birth and continued intermittently for 2-week courses. After 4 months in rats of all groups were identified cholesterol, triglycerides, high density lipoprotein, low density lipoprotein, low density lipoprotein very serum. Neonatal administration of monosodium glutamate leads to an increase of triglycerides, cholesterol, lipoprotein and very low density reduction and high density lipoprotein. Periodic administration of combined probiotics prevented serious violation of lipid metabolism in obese rats with hypothalamic origin. The most significant effect was revealed in the group of animals treated with the combined probiotic strains *Lactobacillus casei* IMVB-7280, *Bifidobacterium animalis* VKL, *Bifidobacterium animalis* VKB. Periodic administration of probiotic bifidobacteria and lactobacilli strains prevents disturbance of lipid metabolism caused by hypothalamic obesity.

Keywords: obesity, metabolism and type 2 diabetes, probiotics.

УДК: 615.2

Ш. Хушматов, канд. биол. наук
Институт биоорганической химии имени Академика А.С. Садыкова, Ташкент, Республика Узбекистан

ДВУХФАЗНЫЙ КАРДИОТРОПНЫЙ ЭФФЕКТ АЛКАЛОИДА АЯЦИНА

В статье рассмотрены механизмы действия дитерпеноидного алкалоида аяцина на ионные каналы сердечной мышцы крысы.

Ключевые слова: папиллярная мышца, алкалоид, инотропия, ионные каналы, саркоплазматический ретикулум.

Введение. Одной из актуальнейших задач современной фармакологии и медицины является создание нового поколения лекарственных средств, обладающих высокоэффективным и высокоселективным терапевтическим действием и не вызывающих серьезных побочных реакций [1].

А также, поиск новых перспективных кардиотропных препаратов, обладающих селективным действием на активность сократительного аппарата кардиомиоцитов, является необходимым условием совершенствования профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний. В этом плане биологически активные соединения растительного и животного происхождения, большинство из которых обладают уникальными фармакологическими свойствами, и веками использовались в народной медицине, считаются наиболее перспективными для этих целей [2].

С этой целью нами было изучено влияние алкалоида аяцина на функциональную активность папиллярной мышцы сердца крысы. Аяцин ($C_{34}H_{48}O_9$), получен из метилликанотина, основного компонента суммы алкалоидов *Delphinium rotundifolium* [3].

Материалы и методы исследования. Эксперименты проводились в Лаборатории фармакологии при Институте биоорганической химии им. академика А.С. Садыкова АН РУз. Лаборатория располагает необходимым оборудованием и приборами для успешного проведения исследований и тестирования кардиотропных лекарственных препаратов и новых биологически активных веществ. Эксперименты выполнялись в соответствии с "Международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с использованием животных", принятыми Международным советом медицинских научных обществ (CIOMS) в 1985 г.

Эксперименты проводились на препаратах папиллярной мышцы, выделенных из правого желудочка сердца беспородных половозрелых белых крыс (150–200 гр.), выращенных в условиях вивария лаборатории Фармакологии института Биоорганической химии АН РУз при свободном доступе к пище и воде. После декапитации животных препараты папиллярной мышцы помещались в 4-х экспериментальных вертикально установленных ячейках, типа SI-BAM21-LC (WPI, *World Precision Instruments, Inc. 175 Sarasota Center Boulevard, Florida 34240-9258, USA*) специально изготовленных для фармакологических исследований изолированных мышц в условиях *in vitro* с перфузионным физиологическим раствором Кребса–Хенселята следующего состава (мМ): NaCl 118; KCl 4,7; CaCl₂ 2,5; MgSO₄ 1,2; KH₂PO₄ 1,1; глюкоза 5,5; NaHCO₃ 25, pH=7,4, при температуре +36±0,5°C, что позволяет проводить эксперименты в течение ~8–10 часа без изменения амплитуды сократительной силы папиллярной мышцы. Растворы оксигенировали карбогеном (O₂ 95%, CO₂ 5%) при поддержании температуры +36±0,5°C с помощью термостата U1 (Болгария).

Изучение функциональной активности папиллярной мышцы осуществляли стандартным механографическим методом, с помощью преобразователя силы типа SI-KG20 (WPI, USA). Препарат папиллярной мышцы длиной 2–3 мм ($\phi=0,5\text{--}0,7$ мм) закрепляли в экспериментальной камере и один конец подсоединяли к штоку преобразователя силы с помощью специальной проволоочки типа SI-OHO2F (WPI, USA). Мыщцу раздражали с помощью платиновых электродов и стимулятора ЭСЛ-2 (Россия) импульсами прямоугольной формы частотой 0,1–3 Гц, длительностью 10 мс и амплитудой, превышающей пороговую на ~20%. После периода стабилизации (45–60 мин) находили длину препарата, при которой мышца развивает максимальное изометрическое напряжение (L_{max}), и в этих условиях выполняли все эксперименты. Сигнал с датчика натяжения подавался на усилитель (SI-BAM21-LCB, *World Precision Instruments, Inc. USA*) и регистрировался в цифровом формате при помощи 4-канального цифрового преобразователя АЦП/ЦАП (Lab-Trax-4/16, *World Precision Instruments, Inc. USA*) специальным программным обеспечением iWorx LabScribe2 (*iWorx Systems, Inc. One Washington Street, Suite 404 Dover, NH 03820 USA*) ноутбук марки "SAMSUNG" (рис. 1).

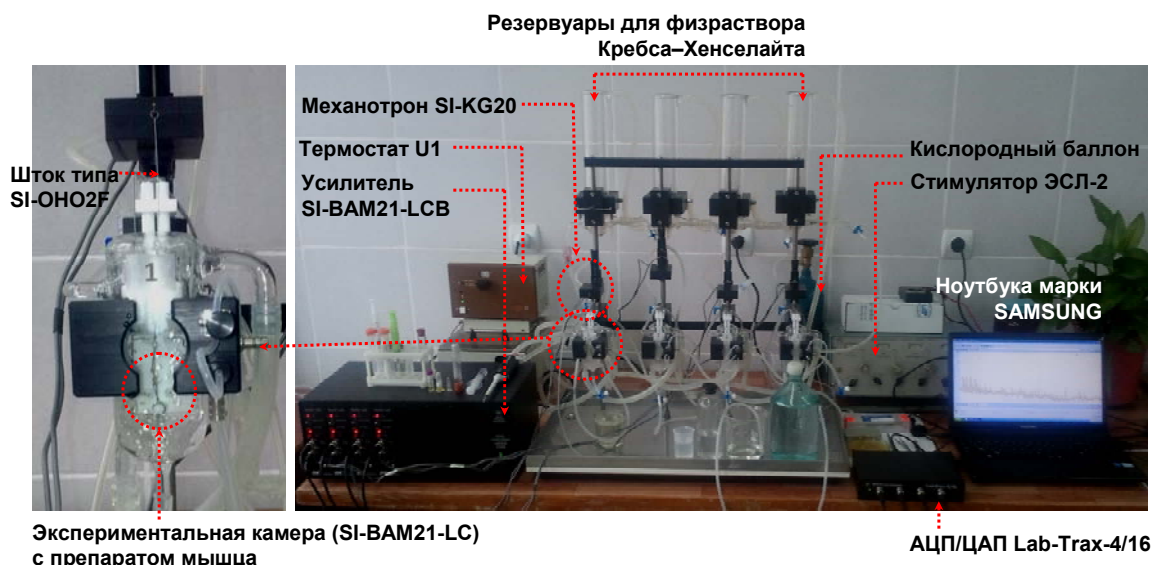


Рис. 1. Установка для для фармакологического исследования изолированных папиллярной мышцы в условиях *in vitro* (WPI, *World Precision Instruments, Inc. USA*)

Для изучения эффектов аяцина было исследовано его действие на потенцирующий эффект паузы (*post-rest potentiation*), феномен характерный для сердечных мышц и отражающий работу Ca²⁺-транспортирующих систем СР, включая RyR.

Статистическая обработка данных производилась при помощи функционального пакета прикладных программ для анализа и обработки экспериментальных данных OriginLab OriginPro v. 8.5 SR1 (EULA, Northampton, MA 01060-4401, USA). Полученные результаты в экспериментах подвергали статистической обработке с использованием *t*-критерия Стьюдента. Данные представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее, m – стандартная ошибка. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. В предварительных экспериментах было обнаружено, что при частоте стимуляции 0,5 Гц аяцин (5 мкМ) первоначально увеличи-

вает силу сокращения мышцы на $17,72 \pm 4,1\%$ относительно контроля. Через 3–5 мин инкубации положительный инотропный эффект аяцина сменялся на отрицательный с уменьшением силы сократительного ответа на $65,15 \pm 5,46\%$ относительно контроля (рис. 2А).

Вместе с тем было обнаружено, что положительный инотропный эффект аяцина не наблюдается при использовании высоких концентраций (в диапазоне концентрации 10–75 мкМ). Аналогично, при частотах стимуляции выше 1 Гц аяцин проявлял только отрицательный инотропный эффект. При этом максимальный отрицательный инотропный эффект аяцина наблюдался при использовании 75 мкМ и частоте 3 Гц, когда сила сокращения мышцы подавлялась на $71,64 \pm 6,23\%$. В этих условиях значение EC₅₀ (концентрация вызывающая подавление силы сокращения на 50%) для аяцина составляло 23,9 мкМ или pD₂ (–log EC₅₀)=4,62 (рис. 2Б).

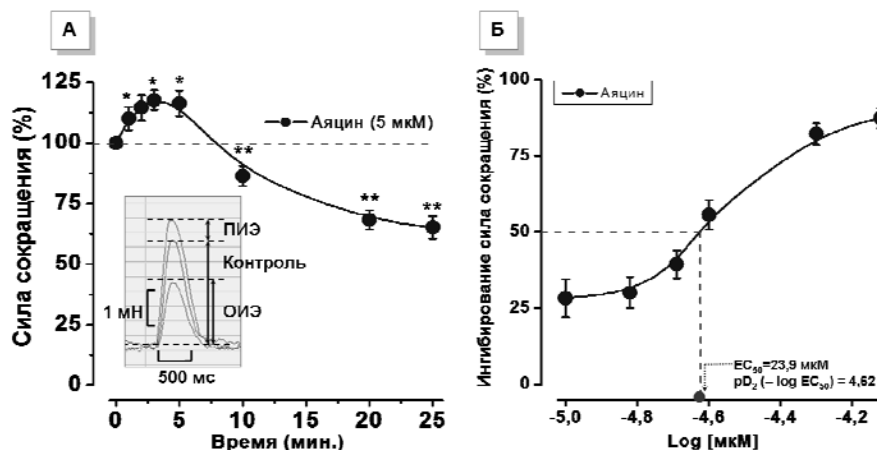


Рис. 2. А. Двухфазный кардиотропный эффект diterпеноидного алкалоида аяцина выделенного из растение рода *Delphinium* L., на функциональная активность миокарде крысы. На фоне показана оригинальная запись отдельного сократительного ответа в контроле и после добавления аяцина (5 мкМ): ПИЭ – положительный инотропный эффект, ОИЭ – отрицательный инотропный эффект. * – $p < 0,01$; ** – $p < 0,05$ ($n = 4-6$). Б. Дозозависимое действие аяцина на сократительную активность папиллярной мышцы сердца крысы. По оси ординат – ингибирование сила сокращения, выраженная в процентах от максимальной. По оси абсцисс – логарифмический показатель концентрации аяцина. Во всех случаях $p < 0,05$ ($n = 4-5$)

Известно, что большинство патологий миокарда сопровождается нарушением процесса электромеханического сопряжения в кардиомиоцитах, который связан с изменением активности Ca^{2+} -транспортирующих систем. Триггером функциональной активности миокарда являются ионы Ca^{2+} , которые поступая в кардиомиоциты по потенциал-зависимым Ca^{2+} -каналам L-типа сарколеммы, активируют рианодиновый рецептор (RyR) и вызывают Ca^{2+} -зависимое высвобождение ионов Ca^{2+} из СР (CICR), активирующих сократительный аппарат [4].

Последующее расслабление кардиомиоцитов обеспечивается закачиванием ионов кальция Ca^{2+} -АТФазой СР и их выведением из клетки с помощью Na^+/Ca^{2+} -обменника и Ca^{2+} -АТФазы сарколеммы [5, 6, 7].

При этом нарушение внутриклеточного гомеостаза ионов $[Ca^{2+}]_i$, в том числе на уровне СР рассматривается как один из важных механизмов аритмогенеза [4].

А также, зависимость функциональной активности сердечных мышц от частоты стимуляции объясняется различными путями увеличения внутриклеточной концентрации ионов $[Ca^{2+}]_i$ в кардиомиоцитах. В частности установлено, что в области низких частот стимуляции ($< 1,0$ Гц) сократительный аппарат кардиомиоцитов активируется в основном ионами Ca^{2+} , выходящими из СР. По мере увеличения частоты стимуляции ведущую роль в обеспечении сократительного процесса кардиомиоцитов начинают выполнять ионы Ca^{2+} , поступающие по потенциал-зависимым Ca^{2+} -каналам частично транспортируемые Na^+/Ca^{2+} -обменником сарколеммы [4].

Учитывая это и анализируя полученные данные, можно предположить, что положительное инотропное действие аяцина в области низких частот стимуляции (< 1 Гц) свидетельствует о его влиянии на системы транспорта Ca^{2+} в СР.

С целью выяснения возможного влияния аяцина на транспорт Ca^{2+} в СР миокарда крыс было исследовано его действие на потенцирующий эффект паузой ("эффект паузы") (*post-rest potentiation*), феномен, характерный для миокарда, и отражающий работу Ca^{2+} -транспортирующих систем саркоплазматического ретикула (СР), который описан в работе [8].

При этом, во время интервала покоя внеклеточный $[Ca^{2+}]_{out}$ продолжает поступать в клетку и накапливаться в СР через Ca^{2+} -АТФазы (SERCA, *sarco/endoplasmic reticulum* Ca^{2+} -ATPase), в результате чего при обновлении стимуляции после паузы, амплитуда первого сокращения увеличивается за счет того, что в цитоплазму высвобождается значительно большее количество Ca^{2+} , чем при первичном ритмическом сокращении [4, 5, 6, 8].

В экспериментах установлено, что прерывание стимуляции мышцы на определенные периоды покоя (5-120 сек) приводит к увеличению силы первого сократительного ответа после возобновления стимуляции с исходной частотой (0,1 Гц). Это увеличение первого ответа после периода покоя является свидетельством того, что в активации сократительного процесса участвует больше ионов Ca^{2+} , накопленных в СР за периода покоя. В наших экспериментах показано, что потенцирующий эффект покоя возрастает с увеличением длительности покоя и достигает максимума ($48,4 \pm 6,36\%$) при 30 сек покоя (рис. 3А).

Предварительная инкубация препаратов папиллярной мышцы с аяцином (5 мкМ) приводила к дополнительному увеличению амплитуды первого сократительного ответа после периода покоя в течении 30 сек на $12,7 \pm 2,41\%$ (рис. 3Б).

Объяснением потенцирующего эффекта аяцина, на амплитуду первого сократительного ответа после периода покоя (30 сек) может быть его влияние на высвобождение ионов Ca^{2+} из СР, которое обеспечивает рианодиновый рецептор (RyR). Как показали результаты экспериментов с рианодином (1 мкМ) – специфическим блокатором RyR, в его присутствии аяцин (5 мкМ) не проявляет положительное инотропное действие, но сохраняет при этом отрицательное инотропное действие.

Эти данные свидетельствуют о том, что положительное инотропное действие аяцина может быть обусловлено его влиянием на RyR СР и активированием высвобождения ионов Ca^{2+} из последнего. При этом, усиление высвобождения Ca^{2+} из СР должно сопровождаться ростом $[Ca^{2+}]_i$ и, как следствие, увеличением

сократительной активности мышцы, что, по-видимому, и лежит в основе положительного инотропного эффекта алкалоида аячина.

А также, в экспериментах было обнаружено, что в присутствии в среде нифедипина (0,01 мкМ) – специфического блокатора Ca^{2+} -каналов L-типа, при частоте стимуляции 1 Гц аяцин (75 мкМ) дополнительно снижа-

ет амплитуду сократительного ответа на $15,65 \pm 5,32\%$ относительно эффекта нифедипина. Эти результаты могут свидетельствовать о том, что отрицательное инотропное действие аячина могут быть обусловлены его взаимодействием с Ca^{2+} -каналами, локализованными в сарколемме кардиомиоцитов (рис. 3В).

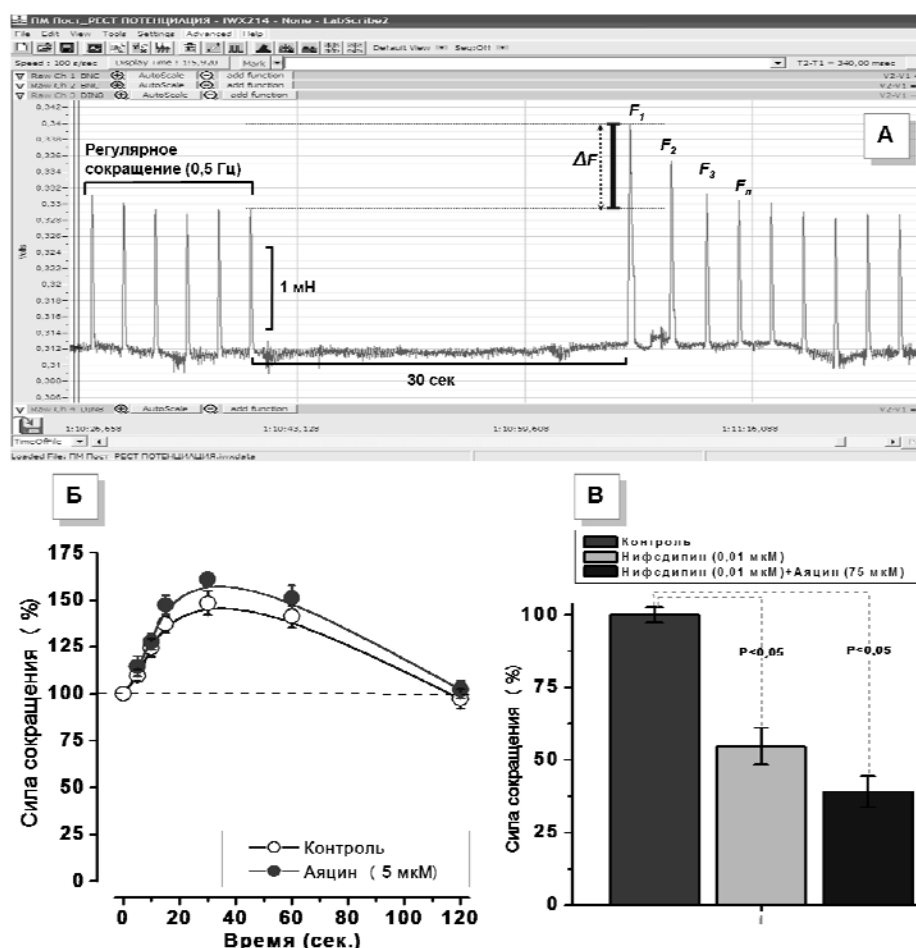


Рис. 3. А. Оригинальная запись потенцирующего эффекта паузы (*post-rest potentiation*) миокарда крысы при частоте стимуляции 0,5 Гц. При этом ΔF – увеличение силы первого сократительного ответа после прерывания стимуляции мышцы на 30 сек и возобновления стимуляции с исходной частотой (0,5 Гц). Б. Влияние аячина на потенцирующий эффект паузы папиллярной мышцы сердца крысы. По оси ординат сила сокращения в процентах от максимальной. По оси абсцисс время периода покоя (сек.). Базальная стимуляция препарата проводилась с частотой 0,5 Гц.

Во всех случаях $p < 0,05$ ($n=5$). В. Влияние нифедипина (0,01 мкМ), блокатора Ca^{2+} -каналов L-типа на эффекты аячина на сократительную активность папиллярной мышцы сердца крысы. Сила сокращения мышцы, выраженная в процентах от максимальной ($n=5$). Стимуляция препарата проводилась с частотой 1 Гц.

Заключение. Таким образом установлено, что ди-терпеноидный алкалоид аячин оказывает влияние на работу Ca^{2+} -транспортирующих систем, локализованных как в сарколемме, так и в мембране CP кардиомиоцитов. Эти данные свидетельствуют о том, что положительное инотропное действие аячина может быть обусловлено его влиянием на RyR CP и активированием высвобождения ионов Ca^{2+} из последнего. А также, отрицательное инотропное действие аячина могут быть обусловлено его блокированием Ca^{2+} -каналов сарколемме кардиомиоцитов (рис. 4).

Данные, полученные в результате изучения механизмов действия алкалоида аячина, имеют важное

практическое значение и могут быть рекомендованы для оптимизации процесса целенаправленного создания нового поколения кардиотропных лекарственных средств.

Acknowledgements. Автор выражает искреннюю благодарность заведующему лабораторией фармакологии института биоорганической химии им. академика А.С.Садыкова АН РУз – канд.хим.наук. У.К.Инагамову за оказанную помощь при проведении экспериментов.

А также, автор приносит глубокую благодарность сотрудникам института ИХРВ АН РУз д-р хим. наук. Б.Т.Салимову за любезное предоставление алкалоида аячина.

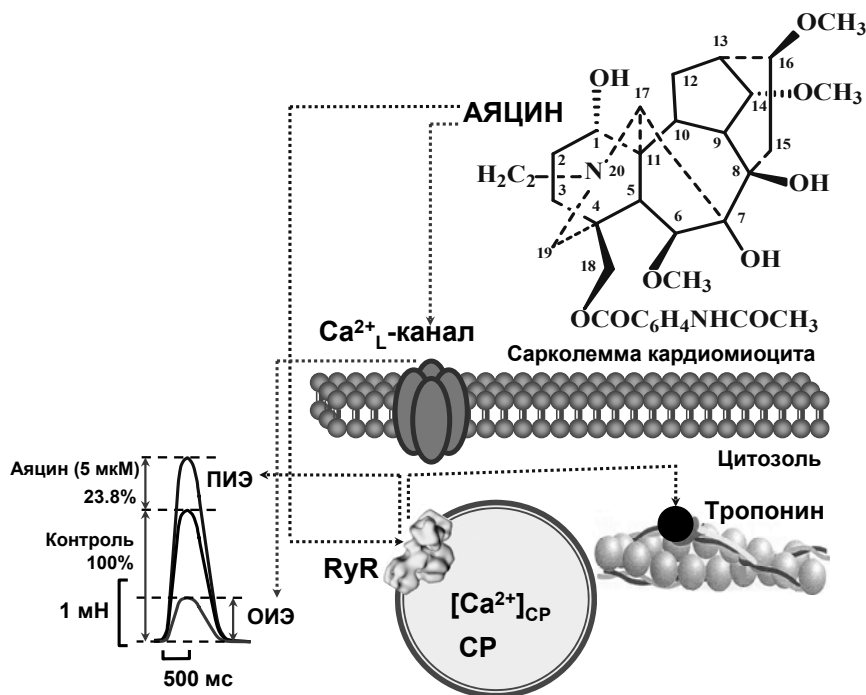


Рис. 4. Гипотетический механизм двухфазного инотропного действия алкалоида аяцина. При этом, ПИЭ – положительный инотропный эффект; ОИЭ – отрицательный инотропный эффект; СР – саркоплазматический ретикулум; RyR – рианодинорный рецептор; $[Ca^{2+}]_{CP}$ – концентрация ионов Ca^{2+} в саркоплазматическом ретикулуме

Список использованных источников

1. Sanz G. Fixed-dose combination therapy and secondary cardiovascular prevention: rationale, selection of drugs and target population / Sanz G, Fuster V. // Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine. – 2009. – № 6. – P. 101-110. Available from: doi:10.1038/npcardio1419
2. Mashour N. Herbal Medicine for the Treatment of Cardiovascular Disease / Mashour NH, Lin GI, Frishman WH. // Clinical Considerations. Archives Internet Medicine. – 1998. – № 158(20). – P. 2225-2234. Available from: doi:10.1001/archinte.158.20.2225.
3. Salimov BT. Diterpene alkaloids plants the genus Delphinium L. Doctoral Thesis, Tashkent, 2007.
4. Bers DM. Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force. [Internet]. Dordrecht: Kluwer Academic Press; 1991. Available from: http://manual172.pinebooks.org/dl.php?id=4867277
5. Bassani R. Mitochondrial and sarcolemmal Ca^{2+} transport reduce $[Ca^{2+}]_i$ during caffeine contractions in rabbit cardiac myocytes/ Bassani R.,

Bassani J., Bers D. // Journal of Physiology. – 1992. – № 453. – P. 591-608. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1464847>

6. Bassani J. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: Species-dependent differences in cellular mechanisms / Bassani J., Bassani R., Bers D. // Journal Physiology. – 1994. – № 476. P. 279-293. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1160440/>

7. Negretti N. The relative contributions of different intracellular and sarcolemmal systems to relaxation in rat ventricular myocytes / Negretti N, O'Neill SC, Eisner DA. // Cardiovascular Research. – 1993. – № 27, P. 1826-1830. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8275530>

8. Андреева ЛА, Накипова ОВ, Сергеев АИ и др. Дисрегуляция NO/cGMP/cADPr/ Ca^{2+} -сигнального пути в сосудах и миокарде спонтанно гипертензивных крыс. Фундаментальные исследования. 2013. – №6(часть6). – Стр.1397-1401. Available from: www.rae.ru/rae/?section=content&op=show_article&article_id=10000958

Надійшла до редколегії 01.09.15

Ш. Хушматов, канд. біол. наук

Інститут біоорганічної хімії ім. академіка А.С.Садикова, Ташкент, Республіка Узбекистан

ДВОФАЗНИЙ КАРДІОТРОПНИЙ ЕФЕКТ АЛКАЛОЇДА АЯЦИНА

У статті розглянуто механізми дії дітерпеноїдного алкалоїда аяцина на іонні канали серцевого м'яза щура.

Ключові слова: папілярна м'яз, алкалоїд, інотроп, іонні канали, саркоплазматический ретикулум.

Sh. Hushmatow, PhD

Institute of Bioorganic Chemistry. Academic A. S. Sadykov, Tashkent, Republic of Uzbekistan

BIPHASIC CARDIOTROPIC EFFECT OF ALKALOID AYACINE

A study of the mechanism of action of ayacine, a diterpene alkaloid on ion channels of rat papillary muscle.

Key words: papillary muscle, alkaloid, inotropy, ion channels, sarcoplasmic reticulum.

УДК 577.175.5:796.015.62

А. Чернозуб, канд. наук з фіз. виховання
Чорноморський державний університет імені Петра Могили, Миколаїв

ОСОБЛИВОСТІ ЗМІН КОНЦЕНТРАЦІЇ КОРТИЗОЛУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ЮНАКІВ В УМОВАХ СИЛОВОГО ФІТНЕСУ

Досліджували особливості змін показника концентрації кортизолу в сироватці крові нетренованих юнаків в умовах силових навантажень різного обсягу та інтенсивності тренувальної роботи. Встановлено, що у відповідь на силові навантаження високої інтенсивності ($Ra=0,71$) та малого обсягу роботи протягом тривалого періоду занять силовим фітнесом, спостерігали підвищення концентрації даного гормону в сироватці крові в межах від 6,5% ($P<0,05$) після другого місяця тренувань до 31,6% ($P<0,05$) в кінці досліджень. При цьому, використання в процесі тренувань режиму навантажень середньої інтенсивності ($Ra=0,64$) з великим обсягом роботи – призводило до зниження рівня концентрації кортизолу в крові після заняття в порівнянні зі станом спокою в межах від 8,3% ($P<0,05$) на початку та на 15,6% ($P<0,05$) в кінці тривалого періоду досліджень.

Ключові слова: концентрація кортизолу в сироватці крові, режими силових навантажень, адаптація, силовий фітнес, нетреновані юнаки.

Вступ. У процесі рухової активності, яка є потужним стимулом для ендокринної системи, основна роль гормонів полягає в підтримці гомеостазу шляхом регуляції взаємодії різних тканин і органів організму з метою протистояння різноманітним видам стресу [1, 2, 7]. Гормональні зміни, які виникають під впливом гострих та тривалих фізичних навантажень, підкреслюють важливу роль ендокринної системи в забезпеченні метаболічних потреб організму спортсменів в процесі тренувальної та змагальної діяльності [5, 6, 9, 14].

Вивчення особливостей змін концентрації стероїдних гормонів в сироватці крові, представником яких є глюкокортикоїдний гормон кори надниркових залоз кортизол, дозволяє краще зрозуміти причини виникнення стресових реакцій в організмі спортсменів в процесі напруженої м'язової діяльності, а так само при стані перенапруги або перетренованості. Режимми м'язової діяльності, які використовуються в силовому фітнесі, залежать від величин показників тренувального навантаження: ваги обтяження, тривалості м'язового напруження, інтенсивності та обсягу роботи. В той же час, вдосконалення тренувального процесу в силовому фітнесі, за рахунок оптимізації адаптаційних реакцій, дозволить не лише підвищувати результативність, але сприятиме зниженню ймовірності розвитку патологічних станів [4, 9, 12].

Незважаючи на значний обсяг публікацій, присвячених вивченню особливостей гормональної відповіді на різні види фізичного навантаження [1, 2, 8, 10, 15], дані, які відображають результати експериментальних досліджень стосовно визначення змін рівня кортизолу в крові нетренованих юнаків в процесі занять силовим фітнесом, практично відсутні.

В основу даної статті положено результати експериментальних досліджень за темою "Захисно-приспосувальні і компенсаторні реакції організму людини в процесі силових навантажень в силових видах спорту" (№ держ. реєстр. 0112U005261; 2012-2015 р.р.).

Метою роботи було – вивчення особливостей змін рівня концентрації кортизолу в сироватці крові нетренованих юнаків в умовах гострого фізичного навантаження та під час тривалого періоду занять силовим фітнесом.

Матеріали та методи дослідження. Обстежено 40 практично здорових, які не займаються атлетизмом або іншими силовими видами спорту, юнаків віком 20-21 років. З даного контингенту було сформовано дві дослідні групи (контрольна та дослідна).

В якості модельної м'язової діяльності, впродовж 3-х місяців тренувань з періодичністю 2-х занять на тиждень, використовувалися навантаження силового характеру. Обстежувані представники контрольної групи виконували фізичне навантаження наступного характе-

ру: кількість силових вправ – 4; в кожній вправі 4 серії по 8 повторень з інтервалом відпочинку між серіями близько 1 хв; темп виконання вправи середній (2/4 – дві сек в концентричному режимі, а 4 сек – в ексцентричному режимі рухової активності); вправи виконувалися з повною амплітудою; маса обтяження, в даних умовах, становила близько 80-82% від максимальної (1 ПМ). У той же час, учасники дослідної групи виконували навантаження наступного характеру: кількість силових вправ – 4; в кожній вправі 4 серії по 4 повторення з інтервалом відпочинку 1 хвилина; темп виконання вправи дуже повільний (3/6 – три сек в концентричному режимі, а 6 секунди – в ексцентричному режимі рухової активності); вправи виконуються з неповною амплітудою (90% від максимальної); маса обтяження, в даних умовах, становила 65-68% від максимальної. Загальна тривалість окремого тренувального заняття для представників кожної з груп становила 29-32 хвилини.

Всі юнаки, які брали участь у дослідженнях, попередньо пройшли повний медичний огляд і комплексний лабораторний контроль (9 показників), за результатами яких не мали медичних протипоказань до участі в експерименті.

Силове навантаження, оцінювали за показниками величини компонентів тренувальної роботи, які використовуються в процесі занять силовим фітнесом. Для цієї мети використовувався метод визначення індексу тренувального навантаження [3]. Реєструвалися параметри максимальної м'язової сили учасників під час виконання тестових вправ, проводився розрахунок показників навантаження: коефіцієнта зовнішнього опору (Ra), відносного ваги обтяження (Wa), величини силового навантаження (Wn), індекс тренувального навантаження (ITNA). Контроль досліджуваних показників проводився чотири рази з інтервалів в один місяць протягом трьох місяців занять силовим фітнесом з використанням різних режимів фізичного навантаження.

Лабораторні дослідження сироватки крові відносно визначення рівня концентрації в ній гормону кортизолу проводили чотири рази протягом трьох місяців тренувань з інтервалом в один місяць. Кожен раз, при щомісячному контролі, було проведено по два забору крові: до тренування (у стані спокою) і відразу після закінчення тренувального заняття. Зразки крові з вени учасників досліджень відбирала медсестра під контролем лікаря з дотриманням усіх необхідних норм стерильності та вимог безпеки. Концентрацію кортизолу в сироватці крові визначали методом твердофазного імуноферментного аналізу з використанням моноклональних антитіл в умовах сертифікованої медичної лабораторії [11, 13].

Матеріали досліджень піддавалися статистичній обробці з використанням пакету програм "Статистика" в

системі "Microsoft Excel-2010", орієнтуючись на фізіологічно допустиму норму концентрації кортизолу в сироватці крові здорових юнаків даного віку в межах 150-660 нмоль/л [11, 13].

Результати досліджень та їх обговорення. У табл. 1 представлені значення параметрів силового навантаження, які використовували юнаки контрольної та дослідної груп протягом трьох місяців досліджень. Аналіз отриманих результатів, вказує на наявність залежності величини параметрів показників силового навантаження від структури тренувального заняття в силовому фітнесі та режимів фізичного навантаження.

Встановлено, що показник коефіцієнта зовнішнього опору (R_a), який відображає рівень інтенсивності фізич-

ного навантаження залежно від структури тренування та умов їх проведення, у юнаків дослідної групи був на 10,9% ($P<0,05$) вищий в порівнянні з результатами, які були виявлені серед осіб контрольної групи. Одночасно, показник індексу тренувального навантаження (ITNA), величина якого відображає поріг стомлення організму спортсменів в процесі силового навантаження, на 22,5% ($P<0,05$) вищий у юнаків дослідної групи в порівнянні з результатами фіксованими у осіб контрольної групи. Отримані результати вказують на те, що юнаки дослідної групи, піддавалися більш інтенсивним силовим навантаженням, що сприяло суттєвому стомленню організму в порівнянні з представниками контрольної групи.

Таблиця 1. Параметри силового навантаження в окремому тренувальному занятті, які були запропоновані особам досліджуваних груп протягом 3-х місяців занять силовим фітнесом, ($M \pm m$, $n=60$)

Показники	Групи учасників	Етапи контролю			
		Вихідні значення	Після місяців тренувань		
			першого	другого	третього
R_a , у.о.	контрольна	$0,64 \pm 0,01$	$0,64 \pm 0,01$	$0,64 \pm 0,01$	$0,64 \pm 0,01$
	дослідна	$0,71 \pm 0,01$	$0,71 \pm 0,01$	$0,71 \pm 0,01$	$0,71 \pm 0,01$
1 ПМ, кг	контрольна	$63,25 \pm 1,91$	$74,53 \pm 2,15^*$	$84,02 \pm 2,72^*$	$90,03 \pm 2,99^*$
	дослідна	$63,41 \pm 2,56$	$80,48 \pm 2,65^*$	$93,15 \pm 2,56^*$	$101,56 \pm 2,55^*$
W_a , кг	контрольна	$40,48 \pm 0,46$	$47,70 \pm 0,51^*$	$53,80 \pm 0,49^*$	$57,62 \pm 0,66^*$
	дослідна	$45,02 \pm 0,34$	$57,14 \pm 0,68^*$	$66,13 \pm 0,59^*$	$72,11 \pm 1,04^*$
ITNA, у.о.	контрольна	$0,71 \pm 0,01$	$0,71 \pm 0,01$	$0,71 \pm 0,01$	$0,71 \pm 0,01$
	дослідна	$0,87 \pm 0,01$	$0,87 \pm 0,01$	$0,87 \pm 0,01$	$0,87 \pm 0,01$
W_n , кг/хв	контрольна	$506,01 \pm 8,64$	$596,25 \pm 7,31^*$	$672,50 \pm 8,31^*$	$720,25 \pm 6,53^*$
	дослідна	$300,13 \pm 8,23$	$380,93 \pm 4,84^*$	$440,86 \pm 5,81^*$	$480,73 \pm 6,33^*$

Примітка: * – $p<0,05$, в порівнянні з показниками попереднього місяця

Протягом трьох місяців досліджень, зміна параметрів показника відносної ваги обтяження (W_a), який відображає найбільш адекватну можливостям організму вагу снаряда в заданих характеристиках силового навантаження, демонструють достовірну позитивну динаміку як серед представників контрольної (підвищення на 17,8% ($P<0,05$) після першого місяця тренувань та 7,1% ($P>0,05$) в кінці досліджень), так і дослідної (в межах від 26,9% ($P<0,05$) до 9,0% ($P<0,05$)) груп. Однак, стрімке підвищення досліджуваного показника за перший місяць тренувань, рівень його динаміки залежить від зростання показників максимальної м'язової сили, з кожним наступним місяцем занять силовим фітнесом стають менш вираженими, що свідчить про можливу адаптацію організму юнаків до силових навантажень даного характеру.

Аналогічну тенденцію до зміни демонструє показник величини силового навантаження (W_n). Даний показник відображає обсяг виконаної роботи за одиницю часу з урахуванням особливостей структури тренувального заняття та характеру силових навантажень. Встановлено, що у представників контрольної групи, первинний показник величини силового навантаження на 68,6% ($P<0,05$) вищий в порівнянні з даними фіксованими у юнаків дослідної групи. Ця обставина вказує на досить істотний вплив умов тренувальної діяльності на різницю в обсязі виконаної роботи учасниками досліджень, незважаючи на те, що первинний рівень розвитку максимальної м'язової сили всіх учасників є практично ідентичний.

На рис. 1-2 графічно представлені результати контролю концентрації кортизолу в сироватці крові нетре-

нованих юнаків обох дослідних груп у спокої та після гострого силового навантаження (тренувального заняття) протягом трьох місяців досліджень.

Аналіз результатів встановлених на початку експерименту свідчить про те, що після гострого силового навантаження, незалежно від рівня інтенсивності та обсягу роботи, спостерігали достовірне зниження концентрації кортизолу в сироватці крові юнаків обох груп. Однак, зниження концентрації досліджуваного гормону в крові у юнаків дослідної групи практично в тричі перевищує результати, які були встановлені у представників контрольної групи.

Відомо, що зниження концентрації кортизолу в сироватці крові відбувається в умовах збільшення обсягу роботи в протилежність інтенсивності тренування, що є ознакою синдрому перетренованості [2, 15].

Однак, на основі аналізу результатів контролю показників силового навантаження виявлено, що параметри обсягу тренувальної роботи фіксовані у юнаків контрольної групи, майже на 68,6% ($P<0,05$) (табл.1) вищі ніж у осіб дослідної. При цьому, показники інтенсивності силового навантаження, навпаки – вищі на 10,9% ($P<0,05$) у представників дослідної групи в порівнянні з результатами виявленими в контрольній. Отриманий факт вказує, що у нетренованих юнаків на даному етапі дослідження, більш істотне зниження на 21,4% ($P<0,05$) концентрації кортизолу в сироватці крові проявляється у відповідь на силові навантаження високої інтенсивності при малому обсязі тренувальної роботи, що досить сильно відрізняється від результатів висвітлених в науковій літературі [4, 8, 9]

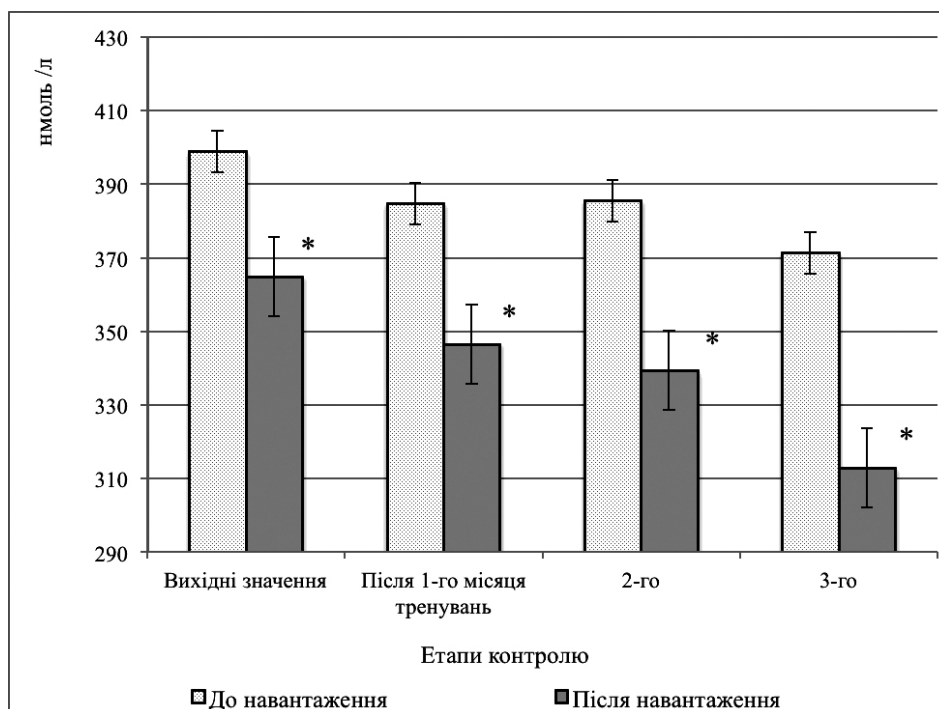


Рис. 1. Концентрація кортизолу в сироватці крові юнаків контрольної групи в умовах силових навантажень середньої інтенсивності та великого обсягу роботи протягом трьох місяців занять силовим фітнесом, $n=20$

Примітка: * – $p < 0,05$, в порівнянні зі станом спокою (до навантаження)

Таким чином, на основі аналізу отриманих результатів та огляду літератури [5, 7] можна припустити, що встановлене на початку досліджень зниження концентрації кортизолу в сироватці крові у відповідь на гостре силове навантаження різного обсягу та інтенсивності – можливо пов'язано з втомою, низьким рівнем тренува-

ності юнаків або недостатньою адаптацією організму до даного виду стресу. При цьому, зниження досліджуваного показника можливо було викликано великими енергозатратами в заданих умовах м'язової діяльності, що призвело до активізації процесу глюконеогенезу в стимуляції якого активно приймає участь кортизол [2, 7].

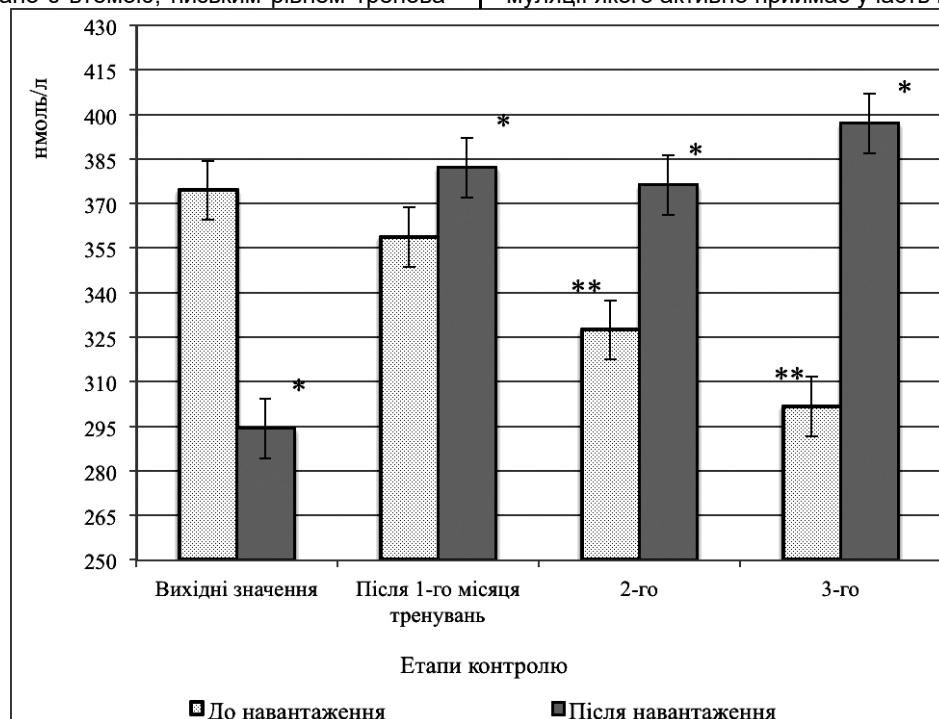


Рис. 2. Концентрація кортизолу в сироватці крові юнаків дослідної групи за умов силових навантажень високої інтенсивності та малого обсягу роботи протягом трьох місяців занять силовим фітнесом, $n=20$

Примітка: 1) * – $p < 0,05$, в порівнянні зі станом спокою (до навантаження);
2) ** – $p < 0,05$, в порівнянні з показниками попереднього місяця.

По закінченню першого місяця занять силовим фітнесом, показники концентрації кортизолу в сироватці крові учасників демонструють різноспрямовану тенденцію у відповідь на силове навантаження різного характеру. Так, у юнаків контрольної групи, при середній ($R_a=0,64$) інтенсивності фізичного навантаження і великому обсязі роботи ($W_n=596,25$), виявлено зниження концентрації кортизолу в сироватці крові на 9,9% ($P<0,05$). Однак, у осіб дослідної групи, при використанні під час занять показників високої інтенсивності фізичного навантаження ($R_a=0,71$) та малого обсягу роботи ($W_n=380,93$), встановлено збільшення рівня досліджуваного гормону в крові на 6,5% ($P<0,05$) у порівнянні зі станом спокою. При цьому, було отримано суттєве збільшення показника відносної ваги обтяження (W_n) у юнаків обох груп (на 17,8% ($P<0,05$) у контрольній та на 26,9% ($P<0,05$) в дослідній), величина якого на пряму залежить від особливостей зростання параметрів максимальної м'язової сили даного контингенту. Даний факт вказує на наявність істотних позитивних зрушень показника розвитку силових можливостей при виконанні тестових вправ, що практично неможливо при стані перенапруження або перетренованості [1, 2, 9, 15].

Після другого місяця тренувань виявлено, що рівень змін показників концентрації досліджуваного гормону в сироватці крові, встановлений після гострого силового навантаження, демонструє практично аналогічну тенденцію результатів, які були отриманим місяць тому, але демонструють більш виражену динаміку. У свою чергу, на тлі незначного зниження темпів зростання параметрів максимальної м'язової сили учасників обох груп, показники силового навантаження продовжують збільшуватися, але з менш вираженою прогресією (табл.1).

Результати досліджень встановлені в обох групах після третього місяця тренувань, демонструють аналогічну тенденцію динаміки контрольованих показників, яка спостерігалася при гострому силовому навантаженні після другого місяця досліджень, але знову з більш вираженою зміною рівня кортизолу в крові після навантаження в порівнянні зі станом спокою. Так, у юнаків контрольної групи спостерігається зниження концентрації даного гормону в сироватці крові на 15,7% ($P<0,05$) після навантаження, а у представників дослідної групи – суттєве підвищення досліджуваного показника на 31,7% ($P<0,05$).

В цілому, аналіз результатів вказує на те, що не дивлячись на зниження (у юнаків контрольної групи) або підвищення (у осіб дослідної) концентрації кортизолу в сироватці крові у відповідь на гостре силове навантаження з різними показниками обсягу та інтенсивності роботи, спостерігали істотне підвищення параметрів максимальної м'язової сили на 42,3% ($P<0,05$) у юнаків контрольної та на 60,2% ($P<0,05$) дослідної груп протягом трьох місяців досліджень. При цьому, базальний рівень кортизолу демонструє тенденцію до зниження на 6,9% ($P<0,05$) в контрольній та на 19,4% ($P<0,05$) в дослідних групах, що можливо обумовлено різним значенням обсягу виконаної тренувальної роботи [4, 10].

Висновки.

1. У результаті дослідження особливостей гормональної відповіді на гостре силове навантаження встановлено, що у нетренираних юнаків, після першого трену-

вання в порівнянні зі станом спокою, спостерігається досить істотне зниження концентрації кортизолу в сироватці крові незалежно від структури тренувального заняття, використовуваного режиму фізичного навантаження, обсягу та інтенсивності виконаної роботи.

2. Виявлено, що у процесі тримісячних занять силовим фітнесом, рівень кортизолу в крові, фіксований після силового навантаження різного характеру, демонструє досить різноспрямовану динаміку. Підвищення концентрації кортизолу в сироватці крові нетренираних юнаків відбувається у відповідь на силові навантаження високої інтенсивності при малому обсязі роботи. При цьому, силові навантаження середньої інтенсивності та з великим обсягом роботи – навпаки, знижують рівень досліджуваного гормону в крові після тренувального заняття в порівнянні зі станом спокою.

Список використаних джерел

1. Волков Н.И. Биохимия мышечной деятельности. / Н.И. Волков, Э.Н. Несен, А.А. Осипенко, С.Н. Корсун. – К.: Олимпийская литература, 2000. – 540 с.
2. Кремер У.Дж. Эндокринная система, спорт и двигательная активность / У.Дж. Кремер, А.Д. Рогол. – Киев: Олимпийская литература, 2008 – 600 с.
3. Патент на корисну модель UA 76705 U, МПК A61B 5/22 (2006.01) Спосіб визначення індексу тренувального навантаження в атлетизмі / Чернозуб А.А. – № И201208376. Заявлений 07.07.2012, надрукований 10.01.2013, офіційний бюлетень №1.
4. Bosco C. Monitoring of strength training: neuromuscular and hormonal profile / C. Bosco, R. Colli, R. Bonomi et al. // Medicine and Science in Sports and Exercise. – 2000. – Vol. 32. – P. 202-208.
5. Charro M. A. Hormonal, metabolic and perceptual responses to different resistance training systems / M. A. Charro, M. S. Aoki, A. J. Coutts, R. C. Araújo, R.F. Bacurau // Journal Sports Medicine Physical Fitness. – 2010. – Vol. 50, N 2. – P. 229-234.
6. Chernozub A. A. Peculiarities of cortisol level changes in the blood of athletes and untrained boys in response to heavy power training loads / A. A. Chernozub // European International Journal of Science and Technology. – Vol. 2, N 9, 2013. – P. 52-57.
7. Durand R. J. Hormonal responses from concentric and eccentric muscle contractions / R. J. Durand, V. D. Castracane, D. B. Hollander [et al.] // Journal of Science and Medicine in Sport. – 2003. – Vol. 35, N 6. – P. 937-943.
8. Goto K. Hormonal and metabolic responses to slow movement resistance exercise with different durations of concentric and eccentric actions / K. Goto, N. Ishii, T. Kizuka, R. R. Kraemer // European Journal of Applied Physiology. – 2009. – Vol. 106, N 5. – P. 731-739.
9. Kraemer R. R. Endocrine alterations from concentric vs. eccentric muscle actions: a brief review / R. R. Kraemer, V. D. Castracane // Metabolism. – 2015. – Vol. 64, N 2. – P. 190-201.
10. Martín-Hernández J. Muscular adaptations after two different volumes of blood flow-restricted training / J. Martín-Hernández, P.J. Marín, H. Menéndez, C. Ferrero, J. P. Loenneke, A. J. Herrero // Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports. – 2013. – Vol. 23, N 2. – P. 114-120.
11. Painter P. C. Reference information for the clinical laboratory / P. C. Painter, J. Y. Cope, J. L. Smith. – Philadelphia, 1999. – 1799 p.
12. Seynnes O. R. Effect of androgenic-anabolic steroids and heavy strength training on patellar tendon morphological and mechanical properties / O. R. Seynnes, S. Kamandulis, R. Kairaitis, C. Helland, E. L. Campbell, M. Brazaitis, A. Skurvydas, M. V. Narici // Journal of Applied Physiology. – 2013. – Vol. 115, N 1. – P. 84-89.
13. Tijssen P. Practice and theory of enzyme immunoassays / P. Tijssen // Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. – 1985. – Vol. 15. – 674 p.
14. Wahl P. Acute metabolic, hormonal, and psychological responses to different endurance training protocols / P. Wahl, S. Mathes, K. Köhler, S. Achtzehn, W. Bloch, J. Mester // Hormone and Metabolic Research Journal. – 2013. – Vol. 45, N 11. – P. 827-833.
15. Zinner C. Acute hormonal responses before and after 2 weeks of HIT in well trained junior triathletes / C. Zinner, P. Wahl, S. Achtzehn, J. L. Reed, J. Mester // International Journal of Sports Medicine. – 2014. – Vol. 35, N 4. – P. 316-322.

Надійшла до редколегії 09.10.15

А. Чернозуб, канд. наук с физ. воспитания

Черноморский государственный университет имени Петра Могилы, Николаев, Украина

ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЙ КОНЦЕНТРАЦИИ КОРТИЗОЛА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЮНОШЕЙ В УСЛОВИЯХ СИЛОВОГО ФИТНЕСА

Исследовали особенности изменений показателя концентрации кортизола в сыворотке крови нетренированных юношей в условиях силовых нагрузок различного объема и интенсивности тренировочной работы. Установлено, что в ответ на силовые нагрузки высокой интенсивности ($R_a=0,71$) и малого объема работы, в течение длительного периода занятий силовым фитнесом, наблюда-

лось повышение концентрации данного гормона в сыворотке крови в пределах от 6,5% ($P<0,05$) после второго месяца тренировок до 31,6% ($P<0,05$) в конце исследований. При этом, использование в процессе тренировок режима нагрузок средней интенсивности ($Ra=0,64$) с большим объемом работы – приводят к снижению уровня концентрации кортизола в крови после занятия по сравнению с состоянием покоя в пределах от 8,3% ($P<0,05$) в начале и на 15,6% ($P<0,05$) в конце длительного периода исследования.

Ключевые слова: концентрация кортизола в сыворотке крови, режимы силовых нагрузок, адаптация, силовой фитнес, нетренированные юноши.

A. Chernozub PhD

Chernomorsky state university of P. Mogily, Nikolaev, Ukraine

FEATURES CHANGE IN CONCENTRATION OF SERUM CORTISOL YOUNG MEN IN THE POWER FITNESS

The features of the changes of the concentration of cortisol in the blood serum of untrained young men in terms of power loads of different volume and intensity of training work. It is found that in response to a power load of high intensity ($Ra=0,71$) and a small amount of work for a long period of power fitness lessons, there was an increase of hormone concentration in serum in the range of 6,5% ($P<0,05$) after the second month training to 31,6% ($P<0,05$) in the end of the study. Thus, the use in training mode loads average intensity ($Ra=0,64$) with a heavy workload – lead to lowering cortisol concentration in the blood after seizure compared with the resting state in the range of 8,3% ($P<0,05$) at the start and 15,6% ($P<0,05$) at the end of a long period of research.

Keywords: concentration of serum cortisol, modes of power loads, adaptation, power fitness, untrained young men.

УДК: 612.398.192:542.49.612.112

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

СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗНА ТА КАТАЛАЗНА АКТИВНІСТЬ У ТКАНИНАХ ЩУРІВ ЗА УМОВ СТРЕСУ ТА ВВЕДЕННЯ ОКРЕМИХ АМІНОКИСЛОТ

Досліджено вплив L-глутамінової кислоти (L-Glu), L-цистеїну (L-Cys) окремо та за спільної дії на активність антиоксидантних ензимів за умов експериментального стресу у тканинах нирок, селезінки, легень та міокарду щурів. Показано, що введення тваринам L-Glu, L-Cys та L-Glu за спільної дії з L-Cys за умов стресу призводить до підвищення супероксиддисмутазної активності у тканинах нирок та легень (друга дослідна група), селезінки (друга та третя дослідні групи), міокарду (друга, третя та четверта дослідні групи). Спостерігали підвищення каталазної активності у тканинах міокарду тварин другої дослідної групи, яка отримувала L-Glu. У тварин, які зазнавали стресу без застосування вищезгаданих амінокислот знижувалась супероксиддисмутазна активність у тканинах нирок, селезінки, легень та міокарду та каталазна активність у тканинах селезінки, легень та міокарду була нижчою порівняно до тварин контрольної групи.

Ключові слова: глутамінова кислота, цистеїн, антиоксидантна система, стрес.

Вступ. Проблема стресу та його впливу на різні функціональні системи організму надалі залишається актуальною. Оскільки стрес може проявляти пошкоджуючу дію на органи та системи, що в кінцевому результаті приводить до розвитку захворювань. Одним з основних пошкоджуючих факторів при стресі, що приводить до розвитку вторинних змін органів та тканин, є інтенсифікація вільнорадикального окиснення. При адаптації організму до стресових умов запускається цілий комплекс біохімічних реакцій [1, 2]. Швидке відновлення організму після стресової реакції зумовлене, у тому числі швидкою мобілізацією систем антиоксидантного захисту [3, 4]. А вищий рівень антиоксидантів є одним з основних чинників, які сприяють у боротьбі з оксидативним стресом.

Об'єктом численних досліджень є амінокислоти, які беруть активну участь у процесах життєдіяльності організму [5-7]. Відомо, що ряд амінокислот, зокрема, L-Glu та L-Cys володіють вираженою антиоксидантною, мембраностабілізуючою та антигіпоксичною активністю [8-10]. Крім того, L-Glu нормалізує функцію мітохондрій при екстремальних впливах на організм, сприяє відновленню кислотно-лужного балансу організму [11-13]. Адаптивні можливості організму значною мірою залежать від стану його антиоксидантної системи, яка забезпечується необхідними ресурсами, зокрема, амінокислотами, що містять Нітроген та Сульфур [14]. У ссавців більшість регуляторних метаболітів є амінокислотами або їх похідними. Накопичується все більше фактів про те, що відновлення рівноваги між про- та антиоксидантами можна здійснити введенням в організм, який піддається будь-якому надпороговому впливу, ряду амінокислот-адаптогенів, зокрема, до таких амінокислот відноситься глутамінова кислота та цистеїн.

Мета роботи полягала у дослідженні впливу амінокислот L-Glu та L-Cys на супероксиддисмутазну та каталазну активності у різних тканинах щурів за умов експериментального стресу.

Матеріали і методи. Дослідження проводили на білих щурах-самцях лінії Вістар масою 200-220 г, які були розділені на групи (контрольна та чотири дослідні). З метою викликати стрес тваринам дослідних груп вводили внутрішньоочеревинно адреналін у дозі 100 мкг/кг 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 фізіологічного 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).

У тканинах визначали супероксиддисмутазну активність (КФ 1.1.15.1.) [15]. Принцип методу полягає у визначенні рівня інгібування ензимом процесу відновлення нітросинового тетразолію при наявності NADH і феназинметасульфату. Для визначення активності СОД спочатку осаджували гемоглобін сумішшю спирту з хлороформом. Для цього до 1 мл гомогенату тканин додавали 0,5 мл етанолу і 0,3 мл хлороформу. Перемішували та центрифугували протягом 15 хв при 2516 g. Супероксиддисмутазну активність визначали у надосадовій рідині, до 0,1 мл якої додавали 0,1 мл 1 мкМ ЕДТА, 0,1 мл 1 % желатину, 0,1 мл 1,8 мкМ розчину феназинметасульфату, 0,1 мл 0,4 мкМ нітротетразолію синього і 0,1 мл 1,0 мМ НАДН. Загальний об'єм суміші доводили до 3 мл фосфатним буфером (0,15 М, рН 7,8) та інкубували при кімнатній температурі у темному місці протягом 10 хв, після чого вимірювали абсорбцію при довжині

хвилі 540 нм. У контрольний зразок замість гомогенату тканини вносили адекватну кількість буферу. Активність СОД виражали в умовних одиницях на 1 мг протеїну.

Каталазну активність (КФ 1.11.1.6) визначали за методом оснований на здатності пероксиду гідрогену утворювати з солями молібдену стійкий забарвлений комплекс [15]. У дослідну пробірку вносили 0,2 мл гомогенату тканин і 2 мл 0,03 % розчину пероксиду гідрогену. У контрольну пробу замість гомогенату тканин вносили 1 мл 4 % розчину молібдату амонію і 2 мл 0,03 % розчину пероксиду гідрогену. Інкубували 10 хв і додавали 1 мл 0,25N H_2SO_4 . Потім у дослідну пробу додавали 1 мл молібдату амонію, а в контроль – 0,2 мл гомогенату тканин. Центрифугували 5 хв при 906 g. Інтенсивність забарвлення вимірювали на спектрофотометрі при довжині хвилі 410 нм проти води. Активність ензиму виражали в мкМоль H_2O_2 /хв на 1 мг протеїну.

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

Результати та їх обговорення. Антиоксидантна система захисту запобігає розвитку реакцій пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ). Відомо, що адреналіновий стрес викликає інтенсифікацію процесів ПОЛ в організмі тварин та людини та зниження активності системи антиоксидантного захисту. Значну роль в інгібуванні процесів вільнорадикального окиснення відіграє супероксиддисмутаза (СОД), оскільки цей ензим забезпечує дисмутацію супероксидного радикала, що є попередником гідроксид радикала. Високий рівень активності супероксиддисмутази міститься у нирках [16]. Як показали наші результати (рис.1) супероксиддисмутазна активність у тканинах нирок була нижчою майже у 2 рази нижчою у тварин першої дослідної групи

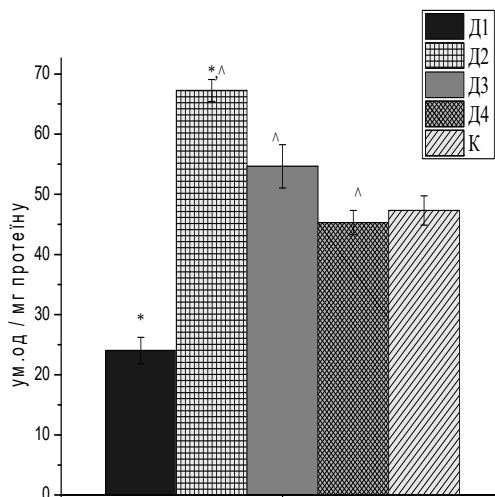


Рис. 1. Супероксиддисмутазна активність у тканинах нирок щурів за дії стресу.

В цьому і наст.рис.: *—вірогідність відносно тварин контрольної групи ($p < 0,05$); ^—відносно тварин першої дослідної групи ($p < 0,05$).

За умов тривалого стресу через певний період відбувалося зниження активності СОД у тканинах легень у тварин, які зазнавали стресу без застосування вищезгаданих амінокислот вірогідно знижувалась на 55,7% порівняно до контролю (рис.3). У тварин другої дослідної групи, які отримували L-Glu супероксиддисмутазна активність була вищою на 36,0% порівняно до контрольної групи тварин. Активність цього ензиму була вірогідно вищою порівняно до першої дослідної групи тварин відповідно у 3,07 рази (друга дослідна група), 2,56 рази (третья дослідна група), 1,77 рази (четверта дослідна група). Можна припустити, що застосування амінокислот дає додаткові можливості організму вийти

($p < 0,05$), які зазнавали дії стресу без застосування амінокислот порівняно до контролю. Зниження активності цього ензиму, ймовірно, пов'язане з вичерпуванням пулу антиоксидантів та нагромадженням продуктів вільнорадикального окиснення. Наслідком цього може бути пошкодження біоструктур клітини. Що стосується тварин дослідних груп, слід зазначити вірогідно вищу супероксиддисмутазну активність на 42,2% у тварин другої дослідної групи, яка отримувала L-Glu порівняно до контролю. Це підтверджує дані про антиоксидантну та мембраностабілізуючу дію L-Glu [8]. Слід зазначити вірогідно вищу супероксиддисмутазну активність у тварин другої, третьої та четвертої дослідних груп порівняно до тварин першої дослідної групи. Супероксиддисмутазна активність у тканинах селезінки (рис.2) вірогідно зростала у тварин другої та третьої дослідних груп на 21,4% та 37,5% відповідно порівняно до контролю. Слід зазначити незначне підвищення супероксиддисмутазної активності у тварин четвертої дослідної групи, що отримувала L-Cys. Ймовірно це пов'язано з адаптивною реакцією супероксиддисмутази як субстратзалежного ензиму на стрес [17]. Тварини першої дослідної групи, котрій вводили адреналін без вищезгаданих амінокислот характеризувались нижчою на 31,1% супероксиддисмутазною активністю порівняно до контролю.

Супероксиддисмутазна активність у тканинах селезінки (рис.2) вірогідно зростала у тварин другої та третьої дослідних груп на 21,4% та 37,5% відповідно порівняно до контролю. Слід зазначити незначне підвищення супероксиддисмутазної активності у тварин четвертої дослідної групи, що отримувала L-Cys. Тварини першої дослідної групи характеризувались нижчою на 31,1% супероксиддисмутазною активністю порівняно до контролю.

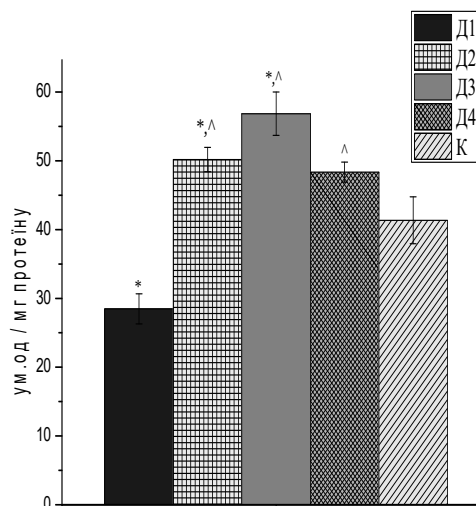


Рис. 2. Супероксиддисмутазна активність у тканинах селезінки щурів за дії стресу

на рівень фізіологічних значень. Активність СОД у тканинах міокарду вірогідно зростала у тварин другої, третьої та четвертої дослідних груп відповідно на 77,8%, 65,4% та 67,5% на фоні вірогідного зниження активності цього ензиму у тварин першої дослідної групи на 57,5%, яка зазнавала дії стресу без застосування амінокислот (рис.4). Варто зазначити, що супероксиддисмутазна активність у тварин другої, третьої та четвертої дослідної групи була вірогідно вищою порівняно до тварин першої дослідної групи. Це говорить про те, що в умовах оксидантного стресу відбувається мобілізація антиоксидантної системи, зокрема, підвищується активність СОД в тканинах нирок, селезінки, легень та міока-

рду. Спостерігається пряма залежність рівня активності цього ензиму від ступеня споживання O_2 [18].

Можна припустити, що однією з причин зниження супероксиддисмутази активності у тварин першої дослідної групи у всіх вищенаведених тканинах може бути накопичення гідрогену пероксиду, що привело до інактивації СОД. При виснаженні енергетичних ресурсів клітин, основну роль починають відігравати катаболічні

процеси. У механізмах стресу задіяні реакції нейроендокринної системи, мобілізація жирів, вуглеводів, амінокислот, катаболічні процеси, що направлені на підвищення резистентності організму і вихід його на адаптивний рівень. Очевидно, мобілізації власних ресурсів організму недостатньо для подолання стресу, який зазнавали тварини першої дослідної групи за дії стресу без застосування амінокислот.

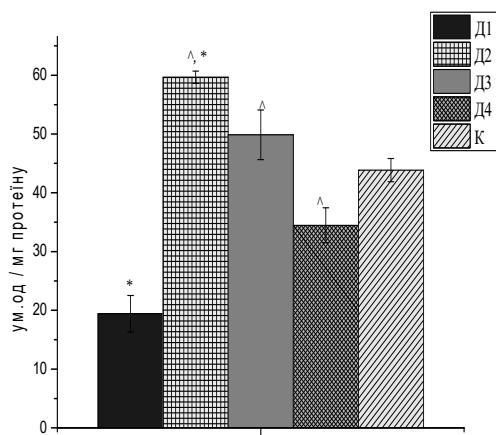


Рис. 3. Супероксиддисмутазна активність у тканинах легень щурів за дії стресу

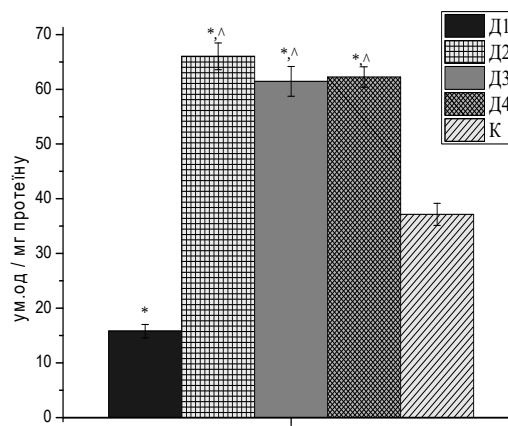


Рис. 4. Супероксиддисмутазна активність у тканинах міокарду щурів за дії стресу

Ознакою ефективності ензимної ланки антиоксидантної системи є збалансованість супероксиддисмутази та каталазної активностей. Пригнічення активності одного з цих ензимів антиоксидантної системи може приводити до накопичення активних форм кисню і деградації клітин. Зміни активностей каталази та СОД взаємозалежні, що може бути пов'язано з переключенням потоку електронів з одного ланцюга транспорту на інший.

Ключова роль в захисті клітин від H_2O_2 належить каталазі. Цей ензим не має високої спорідненості до Гідрогену пероксиду і не може ефективно знешкоджувати цю сполуку при низьких концентраціях, які є в цитозолі [19]. В пероксисомах, де концентрація гідрогену пероксиду висока, каталаза активно руйнує її.

Як показали результати наших досліджень активність каталази у тканинах нирок була вірогідно нижчою у тварин третьої дослідної групи, яка отримувала відповідно L-Cys за спільної дії з L-Glu відповідно на 44,2% порівняно до тварин контрольної групи (Рис.5). Зниження каталазної активності спостерігали і у тварин першої та четвертої групи відносно контролю, але ці дані не були вірогідними. У тварин другої дослідної групи цей показник майже досяг рівня контрольних значень. Стосовно каталазної активності у тканинах селезінки щурів (рис.6), то слід відзначити вірогідне його зниження у тварин усіх дослідних груп порівняно до контролю. Як правило, кількість каталази в клітині достатня, щоб не дозволити невеликій кількості H_2O_2 проявити потенційну токсичність.

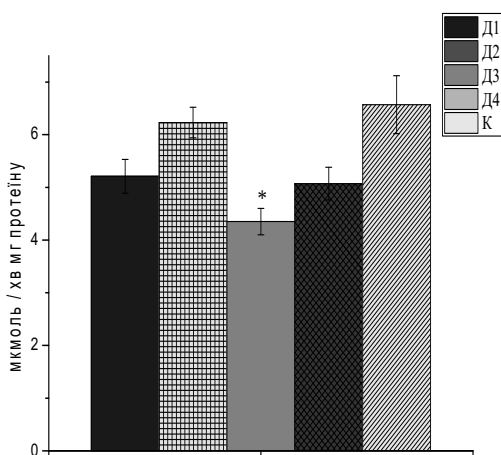


Рис. 5. Каталазна активність у тканинах нирок щурів за дії стресу

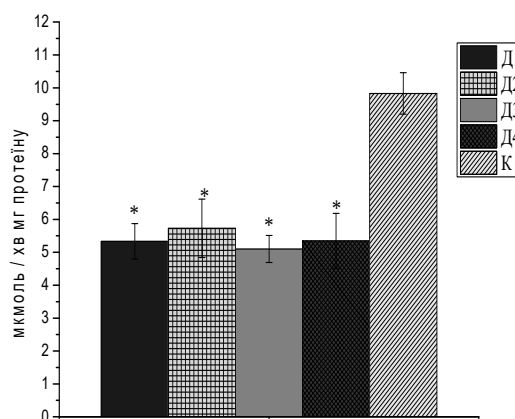


Рис. 6. Каталазна активність у тканинах селезінки щурів за дії стресу

Однак, при стресах, ряді патофізіологічних процесів, а також при додаванні екзогенного гідрогену пероксиду утворюються короткоживучі радикали, які пошкоджують ДНК і викликають мутації.

При аналізі каталазної активності у тканинах легень (рис.7) слід відмітити вірогідне зниження цього показника у тварин першої, третьої та четвертої дослідних груп

відповідно на 48,5%, 66,2% та 47,5% порівняно до тварин контрольної групи. Варто зазначити вірогідно вищу активність каталази у тварин другої дослідної групи, яка отримувала L-Glu стосовно щурів першої дослідної групи. Каталазна активність у тканинах міокарду (рис.8) після дії стресового чинника знижувалась на 31,6% у тварин першої дослідної групи порівняно до контролю.

У тварин третьої та четвертої дослідних груп активність цього ензиму виходила на рівень контрольних значень,

а у тварин другої дослідної групи перевищувала значення контрольної групи на 30%.

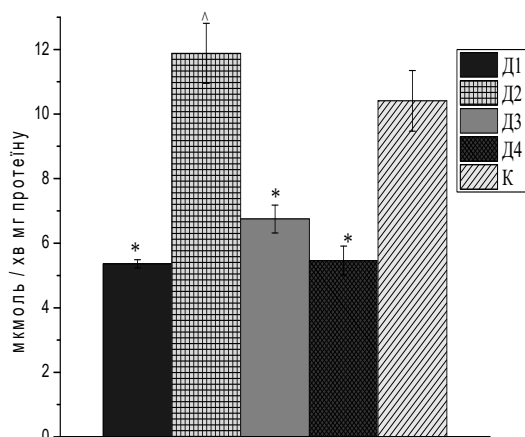


Рис. 7. Каталазна активність у тканинах легень щурів за дії стресу

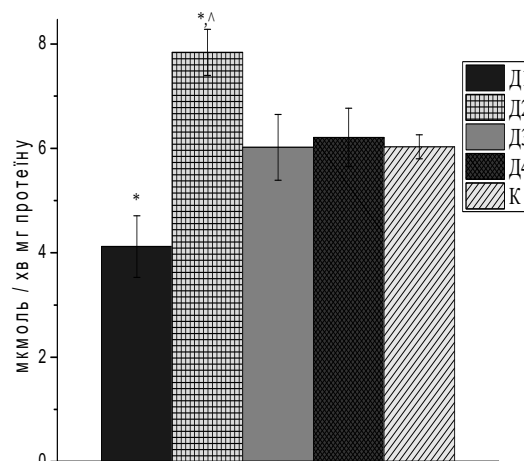


Рис. 8. Каталазна активність у тканинах міокарду щурів за дії стресу

Таким чином, аналіз отриманих нами результатів дозволяє говорити про те, що L-Glu та L-Cys володіють антиоксидантними властивостями, і, тим самим сприяють підвищенню до рівня контрольних значень та вище цього рівня супероксиддисмутази активності у тварин другої, третьої та четвертої дослідних груп та каталазої активності у тварин другої дослідної групи порівняно до контролю. Виявлено зниження супероксиддисмутази активності у тварин першої дослідної групи, яка зазнавала дії стресу без застосування вищезгаданих амінокислот у всіх досліджуваних тканинах.

Висновки. Як показали результати наших досліджень, у тварин, які зазнавали стресу без застосування амінокислот каталазна та супероксиддисмутазна активність практично у всіх тканинах була нижчою від значень даних показників у контрольній групі. Можна припустити, що за умов адреналінового стресу СОД і каталаза діяли як ланки однієї системи утилізації кисню. Застосування L-Glu та L-Cys у комплексі з L-Cys дає можливість швидкого відновлення організму за умов стресу, що супроводжується оксидативним стресом. Аналізуючи дані досліджень варто зазначити, що найвигодніше відрізнялась друга дослідна група тварин, яка отримувала L-Glu.

Список використаних джерел

1. Stadman E. R. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins / E. R. Stadman, R. L. Levine // *Amino Acids*. – 2003. – Vol. 25. – P. 207–218. Available from: <http://www.ncbi.nlm.gov>
2. Van Lente F. Free radicals / F. Van Lente // *Analytical Chemistry*. – 1993. – Vol. 65, № 12. – P. 3748–3778. Available from: <http://www.ncbi.nlm.gov>
3. Haynes T.E. L-glutamine or L-alanyl-L-glutamine prevents oxidant- or endotoxin-induced death of neonatal enterocytes / T.E. Haynes, P. Li, X.L. Li [et al.] // *Amino Acids*. – 2009. – Vol. 37. – P. 131–142. Available from: <http://www.ncbi.nlm.gov>
4. Li P. Amino acids and immune function / P. Li, Y.L. Yin, D. Li [et al.] // *British journal of nutrition*. – 2007. – Vol. 98, № 2. – P. 237–252. Available from: <http://www.ncbi.nlm.gov>
5. Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition / G. Wu // *Amino Acids*. – 2009. – Vol. 37. – P. 1–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.gov>
6. Newsholme P. Glutamine and glutamate: their central role in cell metabolism and function / P. Newsholme, J. Procopio, M.M. Lima [et al.] // *Cell*

Biochemistry and Function. – 2003. – Vol. 21. – P. 1–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.gov>

7. Салига Н.О. Активність глутатионові ланки антиоксидантного захисту та інтенсивність процесів пероксидного окислення ліпідів у тканинах щурів за дії L-глутамінової кислоти / Н.О. Салига // *Український біохімічний журнал*. – 2013. – №4(85). – С.40–47.

8. Roth E. Nonnutritive effects of glutamine / E. Roth // *Journal of nutrition*. – 2008. – Vol. 138. – P. 2025–2031. Available from: <http://www.ncbi.nlm.gov>

9. Hansen A.M. Glutamate joins the ranks of immunomodulators / A.M. Hansen, R.R. Caspi // *Nature medicine*. – 2010. – Vol. 16, №8. – P. 856–858. Available from: <http://www.ncbi.nlm.gov>

10. Салига Н.О. Функціонування антиоксидантної системи щурів за дії L-глутамінової кислоти на фоні експериментального стресу / Салига Н.О. // *Вісник ХНУ ім. Каразіна. Серія біологія*. – 2013. – Вип.17. – №1056. – С. 28–32.

11. Tapiero H., Mathé G., Couvreur P., Tew K.D. Glutamine and glutamate / H. Tapiero, G. Mathé, P. Couvreur [et al.] // *Biomedicine and pharmacotherapy*. – 2002. – Vol. 56(9). – P. 446–457. Available from: <http://www.ncbi.nlm.gov>

12. Brosnan J.T. Glutamate: a truly functional amino acid / J.T. Brosnan, M.E. Brosnan // *Amino Acids*. – 2012. – Vol. 25. – P. 207–218. Available from: <http://www.ncbi.nlm.gov>

13. Manso H.E., Filho H.C., Carvalho L.E. et al. Glutamine and glutamate supplementation raise milk glutamine concentrations in lactating gilts / H.E. Manso, H.C. Filho, L.E. Carvalho [et al.] // *Journal of animal science and biotechnology*. – 2012. – Vol. 3. – P. 1–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.gov>

14. Wu G. Functional Amino Acids in Growth, Reproduction, and Health / G. Wu // *Advances in nutrition*. – 2010. – Vol. 1(1). – P. 31–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.gov>

15. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: Довідник / за ред. В.В.Влізла. – Львів: СПОЛОМ, 2012. – С. 359–363.

16. Zhan C.D. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the spontaneously hypertensive rat kidney: effect of antioxidant-rich diet / C.D. Zhan, R.K. Sindhu, J. Pang [et al.] // *Journal of hypertension*. – 2004. – Vol. 22, № 10. – P. 2025–2033. Available from: <http://www.ncbi.nlm.gov>

17. Michiels C. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress / C. Michiels, M. Raes, O. Toussaint [et al.] // *Free radical biology and medicine*. – 1994. – Vol. 17, № 3. – P. 235–248. Available from: <http://www.ncbi.nlm.gov>

18. Vaziri N.D. Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and NADPH oxidase in lead-induced hypertension / N.D. Vaziri, C.Y. Lin, F. Farmand [et al.] // *Kidney international*. – 2003. – Vol. 63, №1. – P. 186–194. Available from: <http://www.ncbi.nlm.gov>

19. Valko M. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease / M. Valko, D. Leibfriz, J. Moncol [et al.] // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 2007. – Vol. 39, № 1. – P. 44–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.gov>

Надійшла до редколегії 12.10.15

Н. Салига, канд. биол. наук, Р. Искра, д-р биол. наук
Институт биологии животных НААН, Львов, Украина

СУПЕРОКСИДИСМУТАЗНА І КАТАЛАЗНА АКТИВНОСТІ В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ СТРЕССА І ВВЕДЕНИЯ ОТДЕЛЬНЫХ АМИНОКИСЛОТ

Исследовано вплив L-глутамінової кислоти (L-Glu), L-цистеїна (L-Cys) і L-Glu в комплексі з L-Cys в тканинах почек, селезенки, легких і міокарда крыс на активність антиоксидантних ензимів при действии стресса. Показано, что введение животным L-Glu,

L-Cys и *L-Glu* в комплексе с *L-Cys* после действия стресса приводит к повышению супероксиддисмутазной активности в тканях почек и легких (вторая опытная группа), селезенки (вторая и третья опытные группы), миокарда (вторая, третья и четвертая опытные группы). Следует отметить повышение каталазной активности в тканях миокарда животных второй опытной группы, получавшей *L-Glu*. У животных, подвергавшихся воздействию стресса без применения вышеупомянутых аминокислот снижалась супероксиддисмутазная активность в тканях почек, селезенки, легких и миокарда и каталазная активность в тканях селезенки, легких и миокарда по сравнению с животными контрольной группы.

Ключевые слова: глутаминовая кислота, цистеин, антиоксидантная система, стресс.

N. Salyha, PhD, R. Iskra, DSc
Institute of Animal Biology NAAS, Lviv, Ukraine

SUPEROXIDE DISMUTASE AND CATALASE ACTIVITY IN TISSUES OF RATS UNDER THE ACTION OF STRESS AND INJECTION OF SOME AMINO ACIDS

The effect of L-glutamic acid (L-Glu), cysteine (L-Cys) and L-Glu in combination with L-Cys in the tissues of kidney, spleen, lung and myocardium of rats on the activity of some antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) has been studied. It has been found that application of L-Glu, L-Cys and L-Glu in combination with L-Cys under the action of stress leads to increased activity of superoxide dismutase in tissues of kidney and lung (second experimental group), spleen (second and third experimental groups) and myocardium (second, third and fourth experimental groups). It should be noted that catalase activity increased in tissues of myocardium of the second experimental group animals that received L-Glu. It has been shown that in stressed animals without use of these amino acids, activity of superoxide dismutase decreased in tissues of kidney, spleen, lung and myocardium and activity of catalase in tissues of spleen, lung and myocardium compared with the control group of animals.

Key words: glutamic acid, cystein, antioxidant system, stress.

УДК 577.115.083

Д. Воєйкова, асп., Г. Любас, студ., Л. Степанов, канд. біол. наук, Л. Остапченко, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ,
М. Кондро, канд. мед. наук
Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Львів

ХАРАКТЕРИСТИКА ЛІПІДНОГО СКЛАДУ ВНУТРІШНЬОЇ МІТОХОНДРІАЛЬНОЇ МЕМБРАНИ ГЕПАТОЦИТІВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН ЗА УМОВ УТРИМАННЯ НА ВИСОКОКАЛОРИЙНІЙ ДІЄТІ

Використання висококалорійної дієти (ВКД), яка може містити або велику кількість жирів, або велику кількість вуглеводів, показало прямий вплив на кількісний і якісний вміст ліпідів у внутрішній мітохондріальній мембрані. Так, за використання жирів різного походження змінюється співвідношення фосфоліпідів, а при високому вмісті вуглеводів змінюється жирнокислотний склад. Тому, метою наших досліджень було визначити показники ліпідного обміну у внутрішній мітохондріальній мембрані гепатоцитів при утриманні експериментальних щурів на дієті з високим вмістом і жирів, і вуглеводів. Виявилось, що утримання на ВКД з комбінування великої кількості вуглеводів і жирів впливає на вміст ліпідів внутрішньої мітохондріальної мембрани схожим чином, як і у випадку ВКД з жирами різного походження. Сумарно підвищується вміст фосфоліпідів, а також значно підвищується вміст холестеролу поряд зі зниженням вмісту ефірів холестеролу. Також, ліпідний вміст змінюється поступово з найбільшими значеннями на 15-ти тижневому терміні утримання тварин на змінній дієті.

Ключові слова: висококалорійна дієта, мітохондріальна мембрана, фосфоліпіди, холестерол, ефіри холестеролу.

Вступ. Сьогодні відомо, що використання висококалорійних дієт (ВКД) призводить до суттєвих порушень у співвідношенні певних фосфоліпідів та їх жирнокислотного складу у мембрані мітохондрій гепатоцитів [1-3, 11, 12].

Більшість ВКД, які застосовуються в експериментах, характеризуються високим вмістом жирів, як рослинного (рапсова, оливкова, соняшникова або кукурудзяна олія), так і тваринного походження (риб'ячий жир, смалець), які можуть споживатись окремо або у комбінованому вигляді. В зв'язку з тим, що розвиток порушень метаболізму за умов розвитку ожиріння відбувається не тільки за умов споживання надлишкових кількостей ліпідів, але і вуглеводів [1-3, 6] метою наших досліджень було визначити показники ліпідного обміну у внутрішній мітохондріальній мембрані гепатоцитів при утриманні експериментальних щурів на дієті з високим вмістом і жирів, і вуглеводів.

Матеріали і методи. Робота була проведена на 100 білих нелінійних щурах, які перед початком експерименту були поділені на дві групи. Метаболічні порушення у щурів були змодельовані за допомогою використання ВКД # С 11024 (Research Dietes, New Brunswick, NJ), яка складалася з стандартного корму (47 %), згущеного молока (44 %), кукурудзяної олії (8 %), крохмалю (1 %). Щурів першої групи утримували на стандартному кормі та з вільним доступом до води. Щурів другої групи утримува-

ли на дієті # С 11024 і з вільним доступом до води. Після 3, 10, 12, 15 тижнів після початку експерименту з кожної групи відбиралися 10 тварин.

Морфологічно та функціонально інтактні клітини печінки було отримано згідно модифікованого неферментативного методу виділення гепатоцитарної фракції клітин печінки за Петренко А.Ю. зі співав. [8]. Препарати внутрішньої мітохондріальної мембрани отримували за допомогою поетапного ультрацентрифугування [10]. Екстракцію ліпідів проводили за методом Фолча з модифікаціями [9]. Вміст загальних ліпідів визначали за методом Chromy V. et al. [4]. Вміст вільного та етерифікованого холестеролу визначали за методом взаємодії з хлористим залізом [5].

Результати та їх обговорення. Наш експеримент мав за мету показати зміни у вмісті ліпідів внутрішньої мембрани мітохондрій за умов поєднання у дієті тварин високого вмісту вуглеводів і жирів та порівняти характер виявлених змін у щурів, що перебували на різних ВКД. Першим етапом нашого дослідження було визначення загального вмісту ліпідів у внутрішній мітохондріальній мембрані. Встановлено, що за умов утримання на ВКД з поєднанням вуглеводів і жирів, спостерігалось підвищення загального вмісту ліпідів починаючи з 10 тижня експерименту на 29% ($p < 0,05$), 28% ($p < 0,05$) і 32% ($p < 0,05$) в порівнянні з відповідним контролем (рис.1).

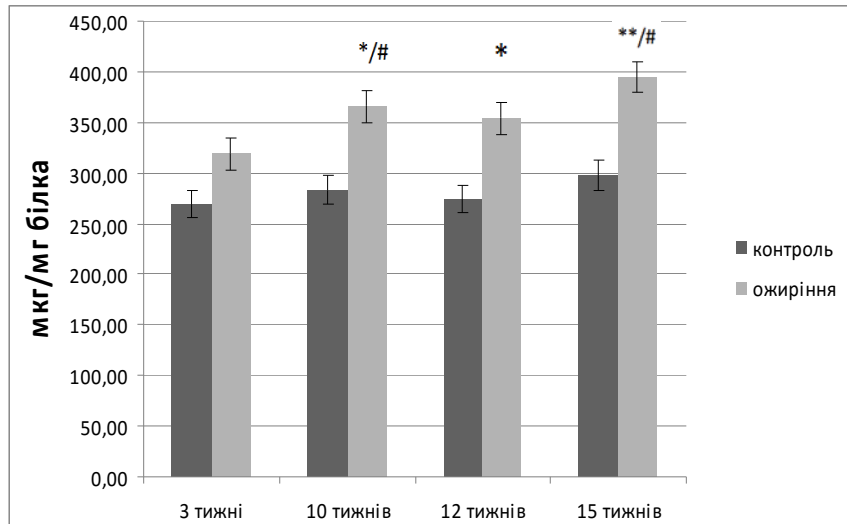


Рис. 1. Загальний вміст ліпідів у фракції внутрішньомітохондріальної мембрани гепатоцитів щурів за умов утримання на ВКД

Примітки: * – $p < 0,05$ відносно відповідного контролю; ** – $p < 0,01$ відносно відповідного контролю; # – $p < 0,05$ у порівнянні з дослідною групою на 3 тижні.

Аналізуючи виявлені зміни ми, також, порівняли між собою дослідні групи і виявили, що на 15-му тижні вміст ліпідів вищий у порівнянні з групою тварин, які утримувались лише 3 тижні на ВКД на 24% ($p < 0,05$).

Визначаючи загальний вміст ліпідів, ми маємо на увазі, що це суміш фосфоліпідів, холестеролу, ефірів холестеролу та мінорних ліпідних форм. Тому, наступ-

ним етапом було визначення, який з типів ліпідів мембран робить внесок у підвищення їх загальної кількості у мембрані. Виявилось, що тривале утримання на ВКД спричинює підвищення вмісту фосфоліпідів у внутрішній мітохондріальній мембрані починаючи з 10 тижня на 25% ($p < 0,05$), на 12 тижні на 31% ($p < 0,05$) і на 15 тижні на 36% ($p < 0,05$) відносно відповідного контролю (рис. 2).

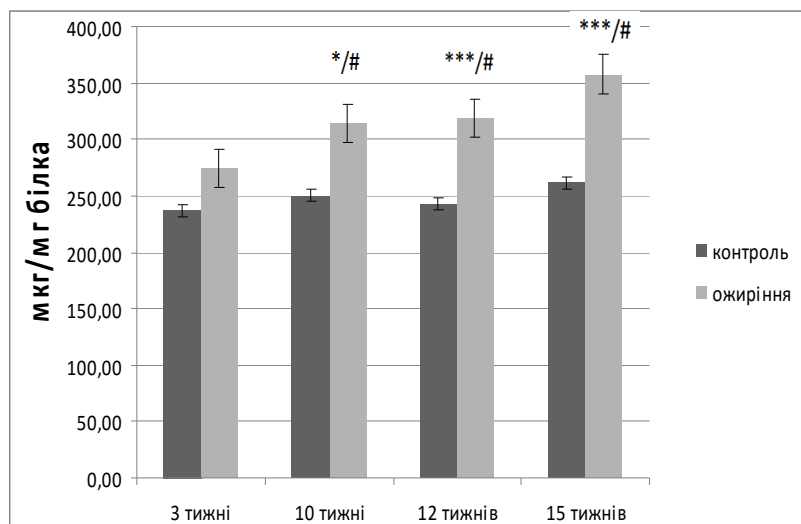


Рис. 2. Вміст фосфоліпідів у фракції внутрішньомітохондріальної мембрани гепатоцитів щурів за умов утримання на ВКД

Примітка: * – $p < 0,05$ відносно відповідного контролю; *** – $p < 0,001$ відносно відповідного контролю; # – $p < 0,05$ в порівнянні з дослідною групою на 3 тижні.

При порівнянні дослідних груп різного терміну утримання на ВКД з 3 тижнем виявилось подібне до загальних ліпідів підвищення вмісту фосфоліпідів, з найбільшим на 15 тижні на 30% ($p < 0,05$).

Нами було встановлено, що найбільший внесок у зміни кількості ліпідів у мітохондріальній мембрані вносить холестерол (рис. 3). Так, починаючи з 3 тижня

утримання на ВКД, вміст холестеролу підвищувався на 64% ($p < 0,05$) відносно відповідного контролю. Подальше утримання тварин на змінній дієті показало ще більше збільшення вмісту цього ліпиду на 84% ($p < 0,05$) на 10 тижні, на 110% ($p < 0,05$) на 12 тижні, з найбільшим підвищенням на 135% ($p < 0,05$) на 15 тижні утримання.

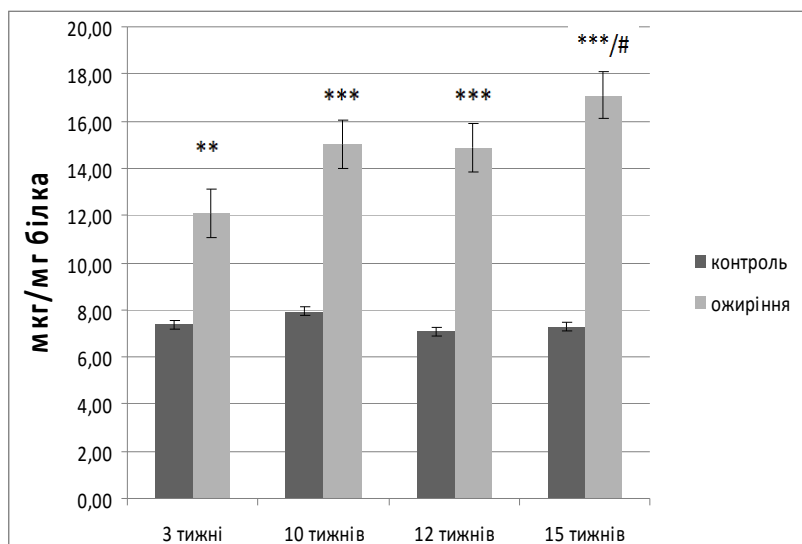


Рис. 3. Вміст холестеролу в фракції внутрішньої мембрани мітохондрій гепатоцитів щурів за умов утримання на ВКД

Примітки: ** – $p < 0,01$ відносно відповідного контролю; *** – $p < 0,001$ відносно відповідного контролю; # – $p < 0,05$ в порівнянні з дослідною групою на 3 тижні.

Порівнюючи дослідні групи між собою виявилось, що вміст холестеролу поступово зростає, з найбільшою різницею вмісту у мембрані на 15 тижні, на 40% ($p < 0,05$) в порівнянні з 3 тижнем.

На останньому етапі ми визначили вміст ефірів холестеролу і виявилось, що він навпаки знижувався на 15 тижні на 32% ($p < 0,05$) в порівнянні з контрольною

групою (рис. 4). При цьому, порівнюючи дослідні групи з 3 тижнем утримання на ВКД, виявилось, що на 12 і 15 тижні відбувалось значне падіння показника на 41% ($p < 0,05$) і 53% ($p < 0,05$) відповідно.

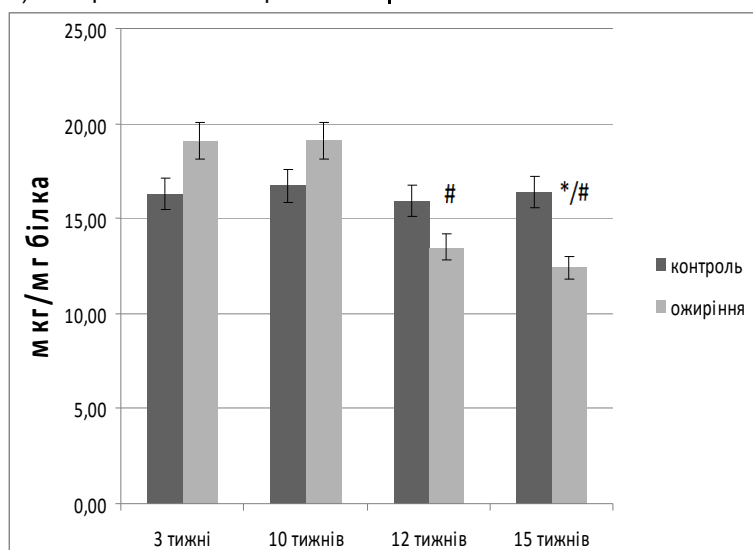


Рис. 4. Вміст ефірів холестеролу в фракції внутрішньої мембрани мітохондрій гепатоцитів щурів за умов утримання на ВКД

Примітки: * – $p < 0,05$ відносно відповідного контролю; # – $p < 0,05$ в порівнянні з дослідною групою на 3 тижні

Встановлені нами результати подібні до отриманих на інших типах ВКД з високим вмістом жирів різного походження. Так, при дієті з 30% жирів показане схоже підвищення загального вмісту ліпідів у мембрані та холестеролу, хоча така дієта не дає подібного до нашого одночасного підвищення і фосфоліпідів. При даному типі ВКД також було показано, що зміни ліпідного співвідношення впливають на функціонування дихального ланцюга і окиснення жирних кислот у мітохондрії. Використання у дієті рибацького жиру показала таке ж значне підвищення холестеролу, як було отримане нами у комбінованій

дієті [1, 3]. ВКД з одночасним застосуванням фізичного навантаження, а також додавання до дієти рапсової олії, показало схоже на отримане нами підвищення вмісту фосфоліпідів з одночасною зміною жирнокислотного складу [2, 6]. При цьому, утримання на ВКД з великою кількістю вуглеводів показало лише зміни у жирнокислотному складі без зміни загального вмісту ліпідів [14].

Представлені дані свідчать про суттєві зміни у ліпідному матриксі внутрішньої мембрани мітохондрій, що може призвести до порушення функцій, а саме на функціонування дихального ланцюга, при якому генеру-

ється не АТФ, а АФК, що в свою чергу спричинює розвиток окисного стресу як у мітохондрії, так і у всьому гепатоциті. Підтвердження наших припущень потребують подальших досліджень впливу комбінованого типу ВКД на печінку шурів.

Висновки. Отриманні дані показали, що ВКД з комбінування великої кількості вуглеводів і жирів впливає на вміст ліпідів внутрішньої мітохондріальної мембрани схожим чином, як і у випадку ВКД з жирами різного походження. Встановлено суттєве підвищення вмісту фосфоліпідів і холестеролу. Також, найбільший ефект спостерігався через 15-ть тижнів утримання тварин на змінній дієті.

Список використаних джерел

1. Aoun M. Rat liver mitochondrial membrane characteristics and mitochondrial functions are more profoundly altered by dietary lipid quantity than by dietary lipid quality: effect of different nutritional lipid patterns / M. Aoun, C. Feillet-Coudray, G. Fouret [et al.] // *British Journal of Nutrition*. – 2012. – Vol. 107, N 5. – P. 647-659.
2. Monteiro J.P. Rapeseed oil-rich diet alters hepatic mitochondrial membrane lipid composition and disrupts bioenergetics / J.P. Monteiro, C.V. Pereira, A.M. Silva [et al.] // *Archives of Toxicology*. – 2013. – Vol. 87, N 12. – P. 1251-1263.
3. Yamaoka S. Mitochondrial function in rats by modification of membrane phospholipids with dietary sardine oil / S. Yamaoka, R. Urade, M. Kito // *Journal of Nutrition*. – 1988. – Vol. 118, N 3. – P. 290-296.
4. Chromy V., Homakova M., Kukla R., Mohmakova A., Belusa J. // *Diagnostic of Laboratory*. – 1975. – Vol. 11, N 23.
5. Колб В.Г. Клиническая биохимия / В.Г. Колб, В.С. Камышников. – Минск, Беларусь, 1976. – С. 158-161.

6. Wander R.W. Effect of dietary carbohydrate on mitochondrial composition and function in strains of rat / R.W. Wander, C.D. Berdianer // *The Journal of Nutrition*. – 1985. – Vol. 115. – P. 190-199.

7. Jakobsson-Borin A. Effect of dietary fat on rat liver microsomal and mitochondrial/lysosomal dolichol, phospholipid and cholesterol / A. Jakobsson-Borin, O. Tollbom, G. Dallner // *Lipids*. – 1991. – Vol. 26, N 11. – P. 915-921.

8. Петренко А. Ю. Выделение гепатоцитов крыс не ферментативным методом: детоксикационная и дыхательная активности / А. Ю. Петренко, А. Н. Сукач, А. Д. Росляков // *Биохимия*. – 1991. – Т. 56, № 9. – С. 1647 – 1650.

9. Folch J. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipids from Animal Tissues / J. Folch, M. Leez, G.H. Stanley // *Journal of Biological Chemistry*. – 1957. – Vol. 226, N 2. – P. 497-501.

10. Ardail D. Mitochondrial contact sites / D. Ardail, J.P. Privat, M. Erget-Charlier [et al.] // *The Journal of Biochemistry*. – 1990. – Vol. 265. – P. 18797-18802.

11. Monteiro J.P. Mitochondrial lipid remodeling in pathophysiology: A new target for diet and therapeutic interventions / J.P. Monteiro, P.J. Oliveira, A.S. Jurado // *Progress in Lipid Research*. – 2013. – Vol. 52, N 4. – P. 513-528.

12. Monteiro J.P. Mitochondrial membrane lipids in life and death and their molecular modulation by diet: tuning the furnace / J.P. Monteiro, C.M. Morais, P.J. Oliveira, A.S. Jurado // *Current Drug Targets*. – 2014. – Vol. 15, N 8. – P. 797-810.

13. Goncalves I.O. Exercise alters liver mitochondria phospholipidomic profile and mitochondrial activity in non-alcoholic steatohepatitis / I.O. Goncalves, E. Maciel, E. Passos [et al.] // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 2014. – Vol. 54. – P. 163-173.

Надійшла до редколегії 16.10.15

Д. Воейкова, асп., А. Любас студ., Л. Степанова, канд. биол. наук, Л. Остапченко, д-р биол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
М. Кондро, канд. мед. наук
Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Львів, Україна

ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИПИДНОГО СОСТАВА ВНУТРЕННЕЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ МЕМБРАНЫ ГЕПАТОЦИТОВ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ СОДЕРЖАНИИ НА ВЫСОКОКАЛОРИЙНОЙ ДИЕТЕ

Использование высококалорийной диеты (ВКД), которая может состоять из большого количества жиров или большого количества углеводов, влияет на количественный и качественный состав липидов во внутренней митохондриальной мембране. Так, при использовании жиров разного происхождения изменяется соотношение фосфолипидов, а при высоком содержании углеводов изменяется жирнокислотный состав. Поэтому, целью наших исследований было определение показателей липидного обмена во внутренней митохондриальной мембране гепатоцитов при содержании экспериментальных крыс на диете с высоким содержанием и жиров, и углеводов. Полученные результаты показали, что при содержании на ВКД с комбинированием большого количества углеводов и жиров состав липидов во внутренней митохондриальной мембране меняется таким же образом, как и при ВКД с высоким содержанием жиров разного происхождения. Суммарно повышается содержание фосфолипидов, значительно увеличивается содержание холестерина, но при этом снижается содержание эфиров холестерина. Также, липидный состав изменялся постепенно с наиболее характерными изменениями на 15-й неделе содержания животных на измененной диете.

Ключевые слова: высококалорийная диета, митохондриальная мембрана, фосфолипиды, холестерин, эфиры холестерина.

D. Voieikova, PhD stud., A.Liubas, stud, L.Stepanova, PhD., L. Ostapchenko, DSc.
Taras Shevchenko National university of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
M. Kondro, DMc
Danila Galitsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

CHARACTERIZATION OF LIPID COMPOSITION IN INNER MITOCHONDRIAL MEMBRANE OF HEPATOCYTES EXPERIMENTAL ANIMALS UNDER CONDITIONS OF KEEPING HIGH-CALORIE DIET

Using high caloric diet (HCD) showed direct impact on quantitative and qualitative lipid content in the inner mitochondrial membrane. High-calorie diet can consist of large amount of different fat or a large amount of carbohydrates. Correlations of phospholipids are changed by conditions of a fatty diet, and fatty acid composition is changed while keeping carbohydrate diet. The aim of our research was to identify indexes of lipid metabolism in the inner mitochondrial membrane of hepatocytes by keeping experimental rats a diet high in fat and carbohydrates. It appeared that the maintenance of a HCD affects the composition of phospholipids in a similar manner as in the case of a high-fat diet. Total phospholipid content increased, cholesterol increased significantly, but the content of cholesterol esters decreased. Also, the lipid content is changed gradually with the largest meanings 15-week keeping on a modified diet.

Keywords: high caloric diet, mitochondrial membrane, phospholipids, cholesterol, cholesterol esters.

УДК 557.156.6:616.211/232-002.2-006

Ю. Клись, наук. співроб., С. Верьовка, д-р біол. наук
Державна установа "Інститут отоларингології імені проф. О.С. Коломійченка НАМН України", Київ

ЗМІНИ ПРОТЕОЛІЗНОГО БАЛАНСУ ПЛАЗМИ КРОВІ ХВОРИХ НА ЗАПАЛЬНІ ЗАХВОРЮВАННЯ ТА НОВОУТВОРЕННЯ ВЕРХНІХ ДИХАЛЬНИХ ШЛЯХІВ

Проведено порівняльне дослідження компонентів систем протеолізу та гемостазу для з'ясування найбільш показових порушень у хворих із запальними, доброякісними та передраковими захворюваннями верхніх дихальних шляхів для визначення найбільш інформативних відмін.

Ключові слова: запалення, новоутворення, гемостатична система, протеоліз.

Вступ. Згідно даних сучасної наукової літератури, захворювання гортані посідають значне місце в патології ЛОР-органів. Саме в гортані найбільш часто локалізовано пухлиноподібні утворення як доброякісного, так і злоякісного характеру [1]. Рак гортані посідає перше місце серед злоякісних пухлин верхніх дихальних шляхів, сягаючи 65 – 70% від їх загальної кількості. Дані проведені в різних країнах епідеміологічних досліджень свідчать, що в 60% випадків розвитку раку гортані передують хронічні патології, що складають групу передракових захворювань. До них належать хронічний гіперпластичний ларингіт (ХГЛ), папіломатоз гортані (ПГ) дискератоз та інші. Імовірність малигнізації ХГЛ складає 60 – 65% протягом від 6 міс до 7 років з моменту виявлення захворювання, за ПГ злоякісна трансформація можлива протягом 10 та більше років у 8 – 20% [2, 3]. Актуальність проблеми ПГ зумовлена значною розповсюдженістю цього патологічного процесу, частим його рецидивуванням та схильністю до малигнізації [4-6]. При цьому диспластичні зміни епітелія у різних хворих мають неоднорідний характер, що ускладнює спостереження та визначення адекватних методів лікування [2]. Не менш проблематичними лишаються питання діагностики хронічного тонзиліту (ХТ). Це захворювання розповсюджене серед людей різних вікових груп, його частота постійно зростає, і, що найістотніше, з ним пов'язана велика кількість супутніх захворювань та ускладнень [7, 8].

Загальноновизнано, що виявлення будь-якої патології на ранніх, доклінічних стадіях розвитку процесу становить вагомий передумову для ефективної терапії та профілактики. Відомо, що клінічній стадії виявлення захворювання відповідає комплекс глибоко запущених порушень молекулярного та клітинного рівнів. Своєчасне виявлення та лікування передракових станів дає змогу попередити розвиток злоякісних новоутворень або виявити їх на ранніх, доклінічних, стадіях [9]. Тому удосконалення діагностики за рахунок виявлення додаткових критеріїв прогнозу розвитку передракових захворювань ЛОР-органів становить вкрай актуальну задачу. Вагомим підґрунтям для виявлення подібних критеріїв може бути комплексне дослідження біохімічних показників, виявлення тих, що становлять діагностичну цінність. Наша робота спрямована на порівняльне дослідження компонентів систем протеолізу та гемостазу для з'ясування найбільш показових порушень у хворих із запальними, доброякісними та передраковими захворюваннями верхніх дихальних шляхів.

Об'єкт та методи досліджень. Під спостереженням перебували 88 хворих із захворюванням ЛОР-органів. Доброякісні новоутворення порожнини носа і навколосових пазух (кісти верхньощелепних пазух, поліпозний етмоїдит та гаймороетмоїдит) було виявлено у 31 пацієнта. Другу групу складали хворі на хронічний тонзиліт в стадії декомпенсації (31 особа). До третьої групи увійшли 26 осіб із передраковими захворюваннями гортані – хронічним гіперпластичним ларингітом чи папіломатозом. Контрольну групу складали 27 практично здорових людей (донорів).

Показники системи гемостазу досліджувалися у бідній на тромбоцити плазмі, одержаній зі свіжої цитратної крові шляхом центрифугування протягом 20-ти хв в центрифугі ОПН-8 при частоті обертання 4000 об/хв.

Визначення загальної протеолітичної активності (ПРА) проводили за методом К.М.Веремєєнка та співавт., в основу якого покладено визначення розчинних аргінін-вмісних пептидів, що вивільнюються при розщепленні протаміна трипсин-подібними ферментами плазми крові. Кількісну оцінку ПРА виражали у нмоль аргініну (арг), що утворюється за 1 хв під дією 1 мл плазми [10].

Еластазо-подібну амідолітичну активність визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 410 нм за поглинанням пара-нітроаніліну, утвореного при розщепленні хромогенного синтетичного субстрату Suc-Ala₃-пара-нітроанілід (в нмоль п-НА, утвореного під дією 1 мл плазми протягом 1 год) [11].

Рівні активності тромбіну визначали за часом (с) зсідання фібриногену [12] та за амідолітичною активністю, яку визначали спектрофотометрично за кількістю вивільненого пара-нітроаніліну, утвореного при розщепленні хромогенного синтетичного субстрату Tos-Gly-Pro-Arg-пара-нітроанілід і виражали в нмоль п-НА, утвореного під дією 1 мл плазми протягом 1 хв [13]. Активованний частковий тромбопластиновий час (АЧТЧ-тест) визначали за швидкістю утворення згустку плазми крові в умовах контактної активації каоліном та фосфоліпідної активації кефаліном. Протромбіновий час – визначали за часом (с) зсідання плазми крові при додаванні до неї тромбопластину та кальцію хлориду [14].

Вміст антитромбіну III (АТ-III) в % досліджували за методом Abilgaard [13] et al., рівні α_2 – макроглобуліну (α_2M) та α_1 -інгібітора протеїназ (α_1PI) – згідно методів К.М.Веремєєнка і співавт. та виражали в г/л [10].

Для визначення концентрації фібриногену (г/л) використовували спектрофотометричний метод В.О. Бєлицера та співавт. [15].

Кількість розчинного фібрину (мг%) визначали методом Т.В.Варецької і співавт. [16]. Фібринолітичну активність (ФА) визначали еуглобуліновим методом Kowarzik і Buluk за часом від утворення згустку фібрину до його розчинення (хв) [12].

Потенційну амідолітичну активність плазміногену в плазмі крові досліджували за гідролізом синтетичного хромогенного субстрату S-2251 (H-D-Val-Leu-Lys-пара-нітроанілід) і виражали у мкмоль вивільненого п-НА за 1 хв під дією 1 мл плазми [17].

Одержані дані було оброблено методом варіаційної статистики. Різниця вважалася вірогідною при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Результати дослідження загальної протеолітичної та еластазної активності, вміст їх інгібіторів та показники системи фібринолізу в плазмі крові хворих досліджуваних груп наведені в табл.1. Як бачимо, ПРА була статистично достовірно вищою у порівнянні з такою у осіб контрольної групи у пацієнтів як із доброякісними, так і передраковими захворюваннями верхніх дихальних шляхів. У хворих на хронічний тонзиліт відмічено підвищення цього показу

ника на рівні тенденції. Еластазо-подібна активність не зазнавала значних змін у пацієнтів із цією патологією. У хворих із новоутвореннями ЛОР-органів спостерігається підвищення еластазної активності, особливо у пацієнтів із передраковими захворюваннями гортані, у яких збільшення її активності має статистично достовірний характер (у 1,5 рази) відносно показників практично здорових людей. Стосовно вмісту основних інгібіторів протеолітичних ферментів – $\alpha_2\text{M}$ та $\alpha_1\text{IP}$, слід зауважити, що рівень $\alpha_1\text{IP}$ у хворих на хронічний тонзиліт та доброякісні новоутворення носа і навколоносових пазух

знаходився на рівні контрольних значень, а в групі пацієнтів із передраковими захворюваннями гортані відмічено несуттєве зменшення його вмісту. Щодо $\alpha_2\text{M}$, його рівень незначно зменшувався у хворих із новоутвореннями обох груп, а у осіб із хронічним тонзилітом його зниження знаходилося на статистично достовірному рівні. Характерно, що при онкологічних захворюваннях цієї ж локалізації вміст $\alpha_2\text{M}$ вірогідно зменшується, що свідчить про високу компенсаторну роль цього білка як блокатора надмірних кількостей проактивованих протеїназ [18].

Таблиця 1. Протеолітична активність, активність еластази, вміст їх інгібіторів та показники системи фібринолізу в плазмі крові хворих на тонзиліт, доброякісні та передракові захворювання верхніх дихальних шляхів

Групи обстежених	ПРА, нмоль аргініну/ (хв·мл)	Активність еластази, нмоль п-НА/(год·мл)	Вміст $\alpha_1\text{IP}$, г/л	Вміст $\alpha_2\text{M}$, г/л	Фібринолітична активність, хв	Потенційна активність плазміногену, п-НА/(хв·мл)
Практично здорові люди (контроль)	55,5 $\pm$ 3,2	9,2 $\pm$ 1,0	2,00 $\pm$ 0,08	2,00 $\pm$ 0,09	237,0 $\pm$ 5,0	0,57 $\pm$ 0,02
Хворі:						
на хронічний тонзиліт	62,6 $\pm$ 3,4	10,4 $\pm$ 1,8	2,00 $\pm$ 0,09	1,70 $\pm$ 0,05 $p < 0,01$	240,0 $\pm$ 8,0	0,65 $\pm$ 0,03 $p < 0,02$
з доброякісними новоутвореннями порожнини носа і навколоносових пазух	65,3 $\pm$ 2,9 $p < 0,02$	12,1 $\pm$ 2,9	2,00 $\pm$ 0,20	1,60 $\pm$ 0,20	238,0 $\pm$ 6,0	0,63 $\pm$ 0,02 $p < 0,02$
з передраковими захворюваннями гортані	67,9 $\pm$ 2,3 $p < 0,01$	13,8 $\pm$ 1,6 $p < 0,05$	1,90 $\pm$ 0,10	1,80 $\pm$ 0,10	302,0 $\pm$ 21,0 $p < 0,001$	-

Примітка: p – вірогідність різниці між відповідними показниками у хворих і практично здорових людей

Таблиця 2. Показники системи зсідання крові в плазмі крові хворих на тонзиліт, доброякісні та передракові захворювання верхніх дихальних шляхів

Групи обстежених	Протромбіновий час, с	АЧТЧ-тест, с	Тромбіновий час, с	Амідолітична активність тромбіну, нмоль п-НА/(хв·мл)	АТ-III, %	Вміст фібриногену, г/л	Розчинний фібрин, мг%
Практично здорові люди (контроль)	23,5 $\pm$ 0,8	43,0 $\pm$ 0,6	15,0 $\pm$ 0,2	9,6 $\pm$ 1,0	100,0 $\pm$ 2,7	2,2 $\pm$ 0,1	4,3 $\pm$ 0,4
на хронічний тонзиліт	25,0 $\pm$ 0,7	46,0 $\pm$ 1,3 $p < 0,05$	15,6 $\pm$ 0,2	11,8 $\pm$ 1,4	109,0 $\pm$ 3,9	2,6 $\pm$ 0,2	3,3 $\pm$ 0,3
з доброякісними новоутвореннями порожнини носа і навколоносових пазух	26,0 $\pm$ 0,6 $p < 0,02$	45,0 $\pm$ 1,3	15,6 $\pm$ 0,6	17,5 $\pm$ 3,8 $p < 0,05$	114,0 $\pm$ 6,3	2,5 $\pm$ 0,1 $p < 0,05$	4,1 $\pm$ 0,5
з передраковими захворюваннями гортані	27,0 $\pm$ 0,8 $p < 0,01$	44,5 $\pm$ 1,1	-	-	-	3,1 $\pm$ 0,2 $p < 0,001$	-

Примітка: p – вірогідність різниці між відповідними показниками у хворих і практично здорових людей

Показники загальної фібринолітичної активності у хворих на хронічний тонзиліт та доброякісні новоутворення носа і навколоносових пазух знаходились в межах контрольних значень, тоді як у хворих з передраковими захворюваннями гортані відмічено достовірне уповільнення в 1,3 рази порівняно до показників норми. Потенційна активність плазміногену в обох досліджуваних групах була достовірно підвищеною. Характерно, що цей показник є підвищеним й за онкологічних захворювань ЛОР-органів.

Показники коагуляційної системи плазми крові наведено в табл.2. Як видно, показник протромбінового часу, котрий визначають за швидкістю утворення згустку, зазнає змін у всіх досліджуваних групах. Уповільнення утворення згустку у пацієнтів із хронічним тонзилітом спостерігається на рівні тенденції, тоді як у інших груп воно є достовірно підтвердженим. У всіх досліджуваних групах показники тромбінового часу плазми крові не зазнавали істотних змін порівняно із показниками здорових осіб. Амідолітична активність тромбіну при хронічному тонзиліті зростала на рівні тенденції, тоді як у хворих з доброякісними новоутвореннями відмічено достовірно підвищення цього показника в 1,8 рази.

Час зсідання плазми крові в АЧТЧ-тесті статистично достовірно, хоч і незначно, зростає при хронічному тонзиліті, у решті груп характер цих змін був на рівні тен-

денції. Зростання вмісту фібриногену характерне для всіх пацієнтів, причому у хворих на хронічний тонзиліт та доброякісні новоутворення зміни мали помірний характер, на відміну від групи хворих із передраковими захворюваннями, у котрих вміст фібриногену збільшувався суттєво (в 1,4 рази). Вміст розчинного фібрину також практично не відрізнявся від значень контрольної групи у хворих із новоутвореннями, а при хронічному тонзиліті навіть знижувався. Вміст антитромбіну-III у всіх пацієнтів, які обстежувалися, мав тенденцію до підвищення порівняно його рівня у практично здорових осіб.

Висновки.

1. Показники загального протеолізу, амідолітичної тромбін-подібної та еластазо-подібної активностей, протромбінового часу та АЧТЧ-тесту підвищені у всіх обстежених хворих порівняно до контрольної групи.

2. Вміст інгібітору протеїназ $\alpha_2\text{M}$ був зниженим на рівні тенденції у хворих з доброякісними новоутвореннями та передраковими захворюваннями, тоді як у хворих на хронічний тонзиліт цей показник зменшений вірогідно. Показники вмісту $\alpha_1\text{IP}$ практично не відрізнялись від контрольних значень, а рівень АТ-III мав тенденцію до зростання.

3. Зміни протеолізу, фібринолітичної, амідолітичної тромбін-подібної та еластазо-подібної активностей та

протромбінового часу у хворих із новоутвореннями ЛОР-органів є більш вираженими порівняно до показників пацієнтів із запальними захворюваннями.

4. Отримані дані свідчать про інформаційну цінність показників протромбінового часу, загальної протеолітичної, еластазо-подібної та фібринолітичної активностей, котрі видаються перспективними для створення комплексного діагностичного індексу оцінки стану хворих на доброякісні та передракові захворювання.

Список використаних джерел

1. Котяннина О.В. Комплексная реабилитация и качество жизни больных с доброкачественными образованиями гортани : автореф. дис. канд. мед. наук : 14.00.04 / Котяннина Ольга Владимировна, Новосибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию. – Н., 2009. – 24 с.
2. Кондакова И.В. Оценка внеклеточного и внутриклеточного протеолиза при предопухолевых и опухолевых заболеваниях гортани / И.В. Кондаков., Г.В. Какурина, Л.В. Спири, О.В. Черемисина, О.В. Панкова, К.Ю. Меньшиков // Сибирский онкологический журнал. – 2014. – № 3. – С. 45-50.
3. Махов В.Ф. Патогенетическое значение острофазовых белков и провоспалительных цитокинов в диагностике предраковых заболеваний и рака гортани : автореф. дис. канд. мед. наук : 14.00.04 / Махов Владимир Александрович, Новосибирская государственная медицинская академия МЗ РФ. – Н., 2004. – 20 с.
4. Свистушкин В.М. Папилломатоз гортани: современное состояние проблемы / В.М. Свистушкин, Д.М. Мустафаев // Вестник отоларингологии. – 2013. – №2. – С. 79-85.
5. Барышев В.В. Современные аспекты изучения респираторного папилломатоза. Часть I. Этиология, патогенез, диагностика / В.В. Барышев, В.Г. Андреев, В.В. Попучиев, С.В. Ежов // Сибирский онкологический журнал. – 2009. – № 5(35). – С. 67-72.
6. Солдатский Ю.Л. Рецидивирующий респираторный папилломатоз / Ю.Л. Солдатский // Вопросы современной педиатрии. – 2007. – Т.6. – №1. – С. 69-74.

Ю. Клысь, науч. сотр., С.Верева д-р биол. наук

Государственное учреждение "Институт отоларингологии им. проф. А.С. Коломийченко НАМН Украины", Киев, Украина

ИЗМЕНЕНИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОГО БАЛАНСА ПЛАЗМЫ КРОВИ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ И НОВООБРАЗОВАНИЯХ ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

Провести сравнительное исследование компонентов системы протеолиза и гемостаза для выявления наиболее показательных изменений у больных с воспалительными заболеваниями и новообразованиями верхних дыхательных путей для определения наиболее информативных отличий.

Ключевые слова: воспаление, новообразования, гемостатическая система, протеолиз.

Yu.G. Klys', researcher, S. Verevka, DSc.

National Academy of Medical Sciences of Ukraine prof. O.S. Kolomiychenko Institute of Otolaryngology, Kiev, Ukraine

ALTERATIONS OF PROTEOLYTIC BALANCE IN BLOOD PLASMA AT INFLAMMATORY DISEASES AND TUMORS OF UPPER RESPIRATORY TRACT

To undertake a comparative study of the indices of proteolytic and haemostatic systems of blood for exposure of the most informative ones at inflammatory diseases and tumors of upper respiratory tract.

Key words: inflammations, tumors, haemostatic system, proteolysis.

УДК 577.161.6/577.217

7. Армазов С.Г. Некоторые особенности течения хронического тонзиллита / С.Г. Армазов, И.В. Иванец // Вестник отоларингологии. – 2011. – №1. – С.55-57.

8. Паневин П.А. Оптимизация хирургической тактики при тонзиллярных кровотечениях : автореф. дис. канд. мед. наук : 14.00.04 / Паневин Павел Александрович, Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова. – Санкт-Петербург, 2008. – 20 с.

9. Коваленко С. Н. Проблемы диагностики хронического гиперпластического ларингита / С. Н. Коваленко, А. С. Лапченко, Д. Л. Муратов // Вестник отоларингологии. – 2006. – №4. – С.34-37.

10. Веремеенко К.Н. Протеолиз в норме и при патологии / К.Н. Веремеенко, О.П. Голобородько, А.И. Кизим – К., 1988. – 198 с.

11. Веремеенко К.Н. Определение активности эластазы и ее ингибиторов в сыворотке крови с помощью хромогенных субстратов / К.Н. Веремеенко, А.И. Кизим, А.Г. Терентьев // Клиническая и лабораторная диагностика. – 1992. – №5-6. – С. 58-61.

12. Балуда В.П. Лабораторные методы исследования системы гемостаза / В.П. Балуда, З.С. Баркаган, Е.Д. Гольдберг [и др.] – Т., 1980. – 313 с.

13. Abilgaard U. Antitrombin assay with new chromogenic substrates (S-2238 and chromozym TH) / U. Abilgaard, M. Lie, O.R. Odegard // Trombosis Research – 1977. – Vol.11, №4. – P.549-553.

14. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике / В.В. Меньшиков – М., 1987. – 368 с.

15. Белицер В.О. Кількісне визначення фібриногену в плазмі крові людини / В.О. Белицер, Т.В. Варецька, К.М. Веремеєнко та ін. // Лабораторна діагностика. – 1997. – №2. – С. 53-55.

16. Варецька Т.В. Определение растворимого фибрина в плазме крови / Т.В. Варецькая, Л.И. Михайловская, Л.А. Свистальская, Л.М. Ена // Клиническая и лабораторная диагностика. – 1992. – №7-8. – С. 10-14.

17. Friberger P. Methods for determination of plasmin, antipain and plasminogen by means of substrate S-2251 / P. Friberger, M. Knös, S. Gustavsson, L. Aurell, G. Claesson // Haemostasis, 1978. – №7, P. 138-145.

18. Клысь Ю.Г. Асоційовані з мембранами компоненти ендогенної інтоксикації та їх роль в онкогенезі / Ю.Г. Клысь, С.В. Верьовка // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка: Серія "Біологія" – № 57. – 2011. – С. 18-20.

Надійшла до редколегії 16.10.15

СІРКОВОДЕНЬ ЯК СИГНАЛЬНА МОЛЕКУЛА В СЕРЦЕВО-СУДИННІЙ СИСТЕМІ

Нещодавно сірководень (H₂S) був визнаний в якості важливої сигнальної молекули в серцево-судинній системі. Окрім того, він модулює передачу нервового імпульсу, є тканинним цитопротектором та кисневим сенсором. Ендогенний H₂S продукується з L-цистеїну за допомогою цистатіонін-β-синтази (CBS), цистатіонін-γ-ліази (CSE) і 3-меркаптопіруватсульфотрансферази (3MST). На сьогодні H₂S визнається як третій газовий трансмітер на додаток до окису азоту і оксиду вуглецю. У цьому огляді представлено сучасні уявлення про фізіологічну та кардіопротекторну роль ендогенного і екзогенного H₂S, як регуляторного фактора в серцево-судинній системі.

Ключові слова: сірководень, L-цистеїн, NaHS, серце, судини.

Нині відомо, що сірководень (H₂S) – біологічно-активний газовий трансмітер, що ендогенно синтезується в тканинах ссавців ферментативним шляхом за допомогою ензимів і неферментативним перетворенням тіолів і тіол-вмісних сполук. Зовсім недавно виявлено, що ця молекула слугує в якості важливого сигнального медіатора в організмі людини і тварин [1,2]. Біо-

логічні ефекти ендогенного H₂S численні і стрімко розширюються. На сьогодні встановлено, що сірководень відіграє важливу роль у регуляції нервової (процеси синаптичної передачі), серцево-судинної (розслаблення гладеньких м'язів), імунної (протизапальний і цитопротекторний агент), сенсорної, шлунково-кишкової (вихід інсуліну) систем [3,4]. Відомо, що при різних патоло-

гічних станах, зокрема, артеріальній і легеневої гіпертензії, хворобі Альцгеймера, діабеті, пошкодженнях слизової оболонки шлунка і цирозі печінки спостерігається дефіцит H_2S [2]. Аналіз наукової літератури свідчить про важливу роль сірководню у процесах внутрішньоклітинного метаболізму і здійсненні контролю за фундаментальними клітинними процесами.

Відомі газові трансмітери об'єднують у родину, до якої окрім H_2S входять монооксид карбону (CO) та монооксид азоту (NO). Ці газові молекули володіють подібними властивостями та виконують специфічні функції. Унікальні властивості їх полягають у відсутності мембранних рецепторів і вторинних посередників. Такі молекули можуть вільно проникати у клітину і брати участь у регуляції важливих фізіологічних процесів на рівні організму, клітин і їх органел [2].

Властивості сірководню як газової молекули. Сірководень тривалий час вважався лише високотоксичною речовиною, негативні ефекти якого пов'язані з інгібуванням цитохром-с-оксидази електронно-транспортного ланцюга мітохондрій. Токсичність H_2S прирівнюється до дії ціаніду, за концентрації ~ 15 мМ він здатний викликати швидку смерть. З часу, коли відкрили ендегенний синтез сірководню в організмі людини і тварин, почався новий етап у дослідженні фізіологічних ефектів і молекулярних мішеней H_2S [5].

За фізико-хімічними властивостями сірководень безбарвний, легкозаймистий та надзвичайно летючий газ із яскраво вираженим неприємним запахом. Він має здатність розчинятися у ліпофільних розчинниках, тому легко проникає через плазматичні мембрани [6].

У водних розчинах H_2S поводить себе як слабка кислота, що дисоціює на іони H^+ , HS^- та S^{2-} . В організмі ссавців за температури $37^\circ C$ сірководень знаходиться у вигляді газу H_2S (14%), гідросульфід-аніонів HS^- (86%) і сульфід-аніонів S^{2-} (залишкові кількості). Молекули H_2S/HS^- здатні взаємодіяти із багатьма внутрішньоклітинними сполуками: пероксинітридом, пероксидами, супероксидом, гіпохлоридом. HS^- аніон може реагувати із металами в активних центрах сполук і формувати залізо-сірчані кластери, а також зв'язуватись з гемоглобіном [7]. Крім того, HS^- іони, приєднуючись до подвійних вуглець-вуглецевих зв'язків, формують органічні сульфіді. Сірководень є активним донором електронів завдяки наявності однієї пари електронів на своїх зовнішніх енергетичних рівнях [8].

Ферменти синтезу H_2S і регуляція їх активності. Ферментативний синтез сірководню в організмі здійснюється за участі таких ензимів: піридоксаль-5-фосфат-залежних цистатіонін- β -синтази (CBS) та цистатіонін- γ -ліази (CSE), а також піридоксаль-5-фосфат-незалежної 3-меркаптопіруватсульфуртрансфери (MPST) разом з цистеїнаміотрансферазою (CAT). Основним субстратом для синтезу сірководню є амінокислота L-цистеїн, яка надходить в організм з продуктами харчування, може вивільнятися з білків, або бути синтезованою з ендегенних амінокислот, наприклад, з L-метіоніну [9,10]. Для ферментів синтезу сірководню характерний тканинний розподіл [11].

CBS – гем-протеїн, який здійснює синтез сірководню у нервовій системі ссавців особливо у головному мозку, у відповідь на збудження нейронів. Високу активність ферменту виявлено у печінці та нирках [12]. У людини гени, що відповідають за синтез CBS, локалізовані у 21-й хромосомі. Було показано, що активність CBS регулюється на транскрипційному рівні глюкокортикоїдами, S-аденозил-L-метіоніном (SAM), фактором некрозу пухлин α (TNF- α), піридоксаль-5-фосфатом і Ca^{2+} -кальмодулін опосередкованим шляхом. Вважають, що гем-

компонент CBS має сенсорну активність і модулює активність ферменту відповідно до зміни окисно-відновного потенціалу. Зі зниженням активності CBS пов'язана гомоцистеїнурія – спадкове захворювання, що зумовлене мутаціями у гені цього фермента [13].

CSE бере участь у біосинтезі H_2S у серцево-судинній системі, а також у печінці, нирках та легенях. CSE у великих кількостях було знайдено у серці, ендотелії та гладеньких м'язах судин мишей. Цей ензим також виявлено у тонкому кишківнику та шлунку щурів. Механізми регуляції експресії та функціональної активності ферменту CSE на разі активно вивчаються. Встановлено, що CSE селективно активується Ca^{2+} -кальмодуліном подібно до активації ендотеліальної і нейрональної NO-синтази, а також гемоксигенази. На сьогодні відомо декілька інгібіторів CSE: DL-пропаргілліцин і β -ціано-L-аланін [14].

Третій фермент синтезу сірководню – MPST разом з CAT відповідає за синтез H_2S в головному мозку і ендотелії судин. При цьому CAT каталізує реакцію взаємодії L-цистеїну з кето-кислотою (наприклад, α -кетоглутаратом) з утворенням 3-меркаптопірувату та амінокислоти, наприклад L-глутамату. 3-меркаптопіруват може вступати у реакцію десульфурізації, яка здійснюється за допомогою ферменту MPST з формуванням H_2S та пірувату або, за присутності сульфіді, з утворенням тіосульфату та пірувату. На відміну від CBS і CSE, які знаходяться в цитоплазмі клітини, MPST присутній як в мітохондріальній, так і в цитозольній фракціях печінки і нирок щурів [15].

Альтернативним джерелом H_2S є ентеробактеріальна флора, що має спеціальну систему ензимів, яка здійснює метаболізм сульфіді у тіосульфат і сульфат, переважно з метою захисту мікрофлори кишечника від високих концентрацій сульфіді, тим самим запобігаючи надходженню великої їх кількості в організм [16]. Відомі також неорганічні джерела H_2S в організмі, наприклад, неферментативне відновлення сірки в реакціях окислення глюкози в еритроцитах [17].

Період напівжиття молекул H_2S у плазмі крові становить близько 30 хв, тому абсолютну концентрацію сірководню виявити важко. Тим не менш, у літературі є дані щодо наявності 20-80 мкмоль/л H_2S у плазмі крові людини та до 100 мкмоль/л H_2S у головному мозку. Потрібно зазначити, що така кількість відображає не лише концентрацію вільного сірководню, але й гідросульфід- і сульфід-аніонів. Вважають, що концентрація газоподібного H_2S є набагато нижчою [18].

На сьогодні відомо три основні метаболічні шляхи деградації сірководню: мітохондріальне окиснення, цитоплазматичне метилювання та зв'язування з метгемоглобіном. Крім того, можлива дифузія H_2S через альвеолярну мембрану і взаємодія з NO [19].

Кардіопротекторні ефекти сірководню. Серед біологічних ефектів H_2S особливу увагу привертають участь H_2S у регуляції судинного тонуусу та скоротливості міокарда. Оскільки порушення біосинтезу сірководню є істотним чинником ризику серцево-судинних захворювань та інших патологічних станів організму, дослідження дії донорів сірководню та механізмів регуляції H_2S -синтезуючих ферментів викликають великий інтерес. Хоча специфічного тілового рецептора ще не ідентифіковано, однак відомо, що для здійснення біологічних ефектів у серцево-судинній системі H_2S взаємодіє з іншими біологічними медіаторами та сигнальними індукторами [20].

Ішемічна хвороба серця являє собою ураження міокарду, зумовлене порушенням коронарного кровообігу, що виникає внаслідок зміни рівноваги між коронарним кровопостачанням та метаболічними потребами серця

вого м'язу. Загибель клітин протягом ішемії та наступної реперфузії із реоксигенацією відіграє фундаментальну роль у розвитку гострого інфаркту міокарда [21]. Результати досліджень науковців відділу фізіології кровообігу Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України та інших груп вчених показали, що як екзогенний, так і ендогенний сірководень відіграє важливу роль в протекції клітин від пошкоджень внаслідок ішемії-реперфузії на різних експериментальних моделях [22, 23, 24]. Так, використання цієї молекули було ефективним у захисті печінки від ішемічно-реперфузійних пошкоджень, при цьому інгібувався розвиток апоптозу і підвищувалась експресія білків теплового шоку 90 (HSP-90) та Bcl-2. Подібні дослідження виявили кардіопротекторну дію донора сірководню NaHS в умовах оксидативного стресу в експериментальних моделях з використанням клітинної лінії кардіоміоцитів. Показано, що H_2S викликав індукцію експресії Bcl-2 та активував Akt-сигнальний шлях, які задіяні у кардіопротекторних механізмах. Крім того, виявлено, що кардіопротекторний вплив сірководню пов'язаний з функціонуванням K_{ATP} -каналів [25, 22].

Механізми дії цієї сигнальної молекули і її фізіологічна роль у серцево-судинній системі на сьогодні активно досліджуються. Зокрема, було показано, що в внутрішньоочеревинне введення NaHS (7,4 мг/кг) супроводжувалося збільшенням функціональних резервів міокарда ізольованого серця щурів. При навантаженні лівого шлуночка об'ємом спостерігали розвиток більш потужної сили скорочення, зменшення кута підйому кінцево-діастолічного тиску і триваліше плато кривої Франка-Старлінга, ніж в контролі. За цих умов сірководень запобігав розвитку реперфузійних порушень функції серця [26]. У інших експериментах спостерігали запобігання розвитку реперфузійних порушень функції серця, що полягало у внутрішньоочеревинному введенні L-цистеїну, субстрату біосинтезу сірководню, яке здійснювалося за умов попереднього помірного одноразового інгібування активності ферменту CSE за допомогою його специфічного інгібітора DL-пропаргілгліцину. При цьому відбувався потужний кардіопротекторний ефект, що проявлявся в істотному зменшенні ступеня реперфузійних порушень функції серця та його кисневого обміну. Ефективне відновлення показників кардіодинаміки відбувалось внаслідок попередження відкриття мітохондріальної пори (МП) в серці, що проявлялось в зменшенні вивільнення мітохондріального фактору [27].

Як відомо, однією з основних причин серцево-судинних захворювань при різних патологічних станах і старінні є мітохондріальна дисфункція. Формування неселективної кальційзалежної циклоспоринчутливої МП між зовнішньою і внутрішньою мембранами лежить в основі індукції клітинної смерті – апоптозу [28]. Нині цей мегаканал розглядається як важлива структура, яка необхідна за фізіологічних умов для запобігання перевантаження органел Ca , а також як терапевтична мішень кардіопротекції при серцевих захворюваннях і інших патологічних станах організму. У 2011 році вперше було показано, що один механізм дії сірководню – здатність попереджати відкриття МП у серці. Так, донор сірководню NaHS у фізіологічних концентраціях дозозалежно пригнічував кальційіндуковане відкриття МП, що свідчило про його протекторний щодо пороутворення вплив у серці дорослих щурів. Внутрішньоочеревинне введення NaHS і L-цистеїну зменшувало чутливість МП до індуктора її відкриття Ca^{2+} внаслідок збільшення на порядок концентрації Ca^{2+} , яка викликала набухання мітохондрій у серці тварин. Преінкубація ізольованих мітохондрій з інгібітором мітохондріальних

K_{ATP} -каналів 5-гідроксидеканоатом (10^{-4} моль/л) зменшувала протекторний ефект NaHS (10^{-5} моль/л) щодо Ca^{2+} -відкриття МП, що вказувало на часткове залучення мітохондріальних K_{ATP} -каналів у H_2S -залежне інгібування пороутворення у серці [22]. Таким чином, результати свідчать про протекторний вплив газового медіатора щодо проникності мітохондріальних мембран, зокрема, через інгібування Ca^{2+} -індукованого відкриття МП шляхом зниження її чутливості до іону у серці. Результати цих експериментів дають можливість зробити висновок, що один із механізмів дії донора сірководню на реперфузійні порушення ішемізованого серця реалізується шляхом інгібування відкриття МП як мішені кардіопротекторної дії даного газового трансмітера.

Функціонування дихального ланцюга – важливий показник роботи мітохондрій. Досліджено вплив донора сірководню NaHS на стан дихального ланцюга мітохондрій у серці дорослих щурів. Показано зниження швидкості споживання кисню у функціональних станах 3 і 4, при цьому продемонстровано підвищення спряженості і ефективності процесів окиснення і фосфорилування. Це вказує на збільшення ефективності роботи дихального ланцюга на тлі зниження електронтранспортної функції, що може свідчити про економізацію процесів енергоутворення у міокарді [29].

Таким чином, сірководень чинить стабілізуючу дію на мембрани мітохондрій, підвищуючи тим самим резистентність органел до Ca^{2+} і запобігаючи розвитку функціональних порушень діяльності серця. Припускають також, що цей газовий медіатор безпосередньо впливає на скоротливий апарат кардіоміоцитів, модифікуючи білки за рахунок відновлення дисульфідних зв'язків ($S=S$) або приєднання атому сірки до тіолової групи $-SH$ з утворенням гідроперсульфідного залишку $-SSH$ [30].

Вплив H_2S на регуляцію тонуусу гладеньких м'язів судин та кров'яного тиску. Найперші дослідження показали, що екзогенний сірководень викликав дозозалежну вазодилатацію грудної аорти і нетривале зниження артеріального тиску у анестезованих щурів [31]. Подібний гіпотензивний ефект виникає при дії пінацидиду – активатора K_{ATP} -каналів. Натомість, інгібітор цих каналів глібенкламід сприяв його зменшенню. Оскільки серцевий ритм при цьому помітно не змінювався, то припускають, що вплив H_2S *in vivo* є специфічним для гладеньких м'язів судин. Важливо також засвідчити, що H_2S індукував розслаблення брижових артерій, які вносять суттєвий вклад у створення судинного периферичного опору, що має значення у регуляції артеріального тиску. Сірководень у цьому випадку впливав у значно нижчих концентраціях у порівнянні з тими, що спричиняли розслаблення аорти. Дані ефекти H_2S попереджались глібенкламідом та відновлювались при додаванні пінацидиду, що припускало участь K_{ATP} -каналів у механізмах реалізації дії H_2S . Так, показано, що H_2S підвищував потік іонів калію через K_{ATP} -канали і викликав гіперполяризацію мембран ізольованих гладеньком'язових клітин [32]. Інгібітори CSE знижували залежний від відкриття K_{ATP} -каналів потік іонів, що свідчить про участь ендогенного H_2S у регуляції цих каналів за звичайних умов. Показано також подібний вазодилаторний вплив L-цистеїну на аорту і брижові артерії, який нівелювався DL-пропаргілгліцином, що підтверджує дію L-цистеїну як субстрату для синтезу H_2S [16].

В інших дослідженнях показано, що вплив H_2S на тонус гладеньких м'язів аорти здійснюється із залученням більш складних механізмів. Так, було показано, що дія H_2S дещо послаблюється при видаленні ендотеліального шару судини або при блокуванні NO-синтази L-

N^{G} -нітрогенаргінінметилестером (L-NAME), а також при застосуванні блокувальних Ca^{2+} -залежних калієвих каналів – апаміну або карибдотоксину. Тому припускають, що H_2S причетний до регуляції вивільнення NO та ендотеліальних гіперполяризуючого фактора (EDHF), які, в свою чергу, викликають розслаблення судин [33]. Крім того, було з'ясовано, що метахолін (ліганд мускаринових рецепторів) підвищує дозо-залежне вивільнення сірководню із культури ендотеліальних клітин людини. Можливо, що цей механізм є спільним для H_2S і NO, оскільки вивільнення цього газотрансмітера також активується лігандами мускаринових рецепторів. Однак вважають, що, на відміну від NO, вплив H_2S на розслаблення судин не є опосередкованим через взаємодію з розчинною гуанілатциклазою, як було показано у експериментах з інгібуванням гуанілатциклази [34].

Показано, що донор H_2S у низьких концентраціях здатний викликати скорочення насичених киснем ізольованих судинних препаратів [35]. Так, введення донора сірководню NaHS у концентрації 10 мкмоль/л викликало скорочення кілець аорти, ефект послаблюється при видаленні ендотелію. Тому вважають, що непрямий вазоконстрикторний вплив сірководню на гладеньком'язові клітини судин виникає як результат інгібування дії вазодилаторів, які продукуються в ендотелії (наприклад NO), або через індукування утворення в ендотелії вазоконстрикторів (наприклад, ендотеліну). Однак, у тому ж експерименті введення NaHS у концентрації вище ніж 10 мкмоль/л викликало розслаблення судин. Такі суперечливі дані свідчать про те, що H_2S у малих концентраціях може зменшувати вплив NO, в результаті чого відбувається скорочення судин. При введенні комбінації сполук NaHS та донорів NO у щурів відбувається інгібування ефекту розслаблення судин, спричинене ацетилхоліном та гістаміном. Слід зазначити, що CO також може послаблювати NO-залежну вазорелаксацію, але це відбувається не через хімічну взаємодію з NO, а через конкурування з цією сполукою за пул розчинної гуанілатциклази [36].

Встановлено також, що екзогенний сірководень (перфузія судинних препаратів донором сірководню NaHS (10^{-4} – 10^{-3} моль/л) і ендогенний сірководень (перфузія L-цистеїном – попередником його синтезу (10^{-4} – 10^{-3} моль/л)) викликали ендотеліальне розслаблення ГМ аорти і ворітної вени, що частково реалізувалося через фактори, локалізовані в адвентиції. Виявилось, що за відсутності адвентиції характерне розслаблення ГМ аорти на дію L-цистеїну у концентраціях 10^{-4} і 10^{-3} моль/л зменшувалося на 42 і 34,5% відповідно, а в деяких випадках взагалі не розвивалося у порівнянні з розслабленням, яке спостерігали на судинах з інтактною адвентицією. Таким чином, отримані результати дають підстави вважати, що вплив L-цистеїну та донора сірководню NaHS на розслаблення ГМ грудної аорти щурів є залежним від адвентиції. Розслаблення ГМ обох видів судин відбувалося за участі $\text{K}^{+}_{\text{ATF}}$ -каналів [37].

У літературі накопичено багато суперечливих даних щодо впливу H_2S на скоротливу активність гладеньких м'язів судин. Це, в першу чергу, пов'язано з використанням різних концентрацій донорів сірководню, різними типами судин та методами їх препарування та ін. У зв'язку з цим постає необхідність подальших досліджень для з'ясування механізмів вивільнення H_2S з тканин судин, а також його ролі у регуляції скоротливої активності гладеньких м'язів.

Таким чином, як екзогенний, так і ендогенний сірководень має суттєвий вплив на функціональний стан

серця і скоротливу активність судин, дія якого реалізується через попередження відкривання МП, зміни у дихальному ланцюгу, активацію мітохондріальних $\text{K}^{+}_{\text{ATF}}$ -каналів та за рахунок інших механізмів. Тому H_2S є важливим регуляторним фактором у серцево-судинній системі за фізіологічних та патологічних умов.

Список використаних джерел

1. Barr L.A. Discoveries of hydrogen sulfide as a novel cardiovascular therapeutic / L.A.Barr, J.W.Calvert // *Circulation Journal*. – 2014. – Vol. 78, №9. – P.2111-2118.
2. Wang R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed / R.Wang // *Physiology Review* – 2012. – V. 92 – P.791–896.
3. Zhang X. Hydrogen sulfide: a neuromodulator and neuroprotectant in the central nervous system / X.Zhang, J.S.Bian // *ACS Chemical Neuroscience*. – 2014. – Vol. 5, №10. – P.876-883.
4. Kimura H. The physiological role of hydrogen sulfide and beyond / H.Kimura // *Nitric Oxide*. – 2014 – Vol. 41 – P.4-10.
5. Chen Q. Reversible Blockade of Electron Transport during Ischemia Protects Mitochondria and Decreases Myocardial Injury following Reperfusion / Q. Chen, Sh. Moghaddas, Ch.L. Hoppel, E.J. Lesnefsky // *Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics* – 2006. – Vol. 319, № 3. – P.1405 – 1412.
6. Olson K.R. Is Hydrogen sulfide a circulating "gaseous transmitter" in vertebrate blood? / K.R.Olson // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2009. – № 7. – P.856- 863.
7. Pietri R. Factor controlling the reactivity of hydrogen sulfide with hemoproteins / R.Pietri, A.Lewis, R.Leon // *Biochemistry*. – 2009. – № 48. – P.4881-4894.
8. Yi-Hong L. Hydrogen Sulfide in the Mammalian Cardiovascular System / L.Yi-Hong, Lu Ming, Hu Li-Fang, T.-H. Peter Wong, D. George Webb, B.Jin-Song // *Antioxidants & Redox signaling*. – 2012. – Vol.17, №1. – P.141-185.
9. Szabó C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential / C.Szabó // *Drug Discovery* – 2007. – Vol. 6. – P. 917 – 935.
10. Singh S. PLP-dependent H_2S biogenesis / S.Singh, R. Banerjee // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2011. – № 1814. – P.1518 – 1527.
11. Olson K.R. The therapeutic potential of hydrogen sulfide: separating hype from hope / K.R. Olson // *American Journal Physiology Regulatory Integrative Comparative Physiology* – 2011. – Vol. 301. – P. 297 – 312.
12. Eto K. A novel enhancing mechanism for hydrogen sulfide – producing activity of cystathionine β – synthase / K.Eto, M.Ogasawara, K.Umemura // *Neuroscience*. – 2002. – Vol. 22. – № 9. – P.3386-3391.
13. Kabil O. Redox biochemistry of hydrogen sulfide / O.Kabil, R.Banerjee // *Journal Biological Chemistry*. – 2010. – Vol. 285. – P.21903-21907.
14. Chen X. Production of the neuromodulator H_2S by cystathionine β -synthase via the condensation of cysteine and homocysteine / X.Chen, K.H.Jhee, W.Kruger // *Journal Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279. – P. 52082-52086.
15. Kajimura M. Interactions of Multiple Gas-Transducing Systems: Hallmarks and Uncertainties of CO, NO, and H_2S Gas Biology / M.Kajimura, R.Fukuda, R.M.Bateman [et al] // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2010. – Vol. 13, № 2. – P.157– 192.
16. Elsey D.J. Regulation of cardiovascular cell function by hydrogen sulfide H_2S / D.J.Elsey, R.C.Fowkes, G.F. Baxter // *Cell Biochemistry Function*. – 2010. – Vol. 28. – P.95-106.
17. Ishigami M. A source of hydrogen sulfide and a mechanism of its release in the brain / M. Ishigami, K.Hiraki, K. Umemura // *Antioxidant & Redox Signaling*. – 2009. – 11, № 2. – P. 205-214.
18. Szabo C. Gaseotransmitters: New Frontiers for Translational Science/ C. Szabo // *Science Translation Medicine*. – 2010. – Vol.2, № 59. – P.1–11.
19. Wang R. Hydrogen Sulfide: The Third Gasotransmitter in Biology and Medicine / R.Wang // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2010. – Vol. 12, № 9. – P.1061–1067.
20. Bajgar R. Identification and properties of a novel intracellular (mitochondrial) ATP-sensitive potassium channel in brain/ R.Bajgar, S.Seetharaman, A.J.Kowaltowski, K.D.Garlid // *Journal Biological Chemistry* – 2001. – Vol. 276, № 46. – P.33369-33374.
21. Frasier Ch.R. The role of cardiac mitochondria in myocardial ischemia/reperfusion injury: a dissertation In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree PhD / Chad R. Frasier. – 2012. – 182 P.
22. Strutyńska N.A. Hydrogen Sulfide Inhibits Calcium-Induced Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening in the Heart of Adult and Old Rats / N.A.Strutyńska, O.M.Semenykhina, S.V.Chorna [et al] // *International Journal Physiology Pathophysiology* – 2012. – Vol. 3, № 2. – P. 135-140.
23. Шиманская Т. В. Циклоспорин А-чувствительная митохондриальная пора как мишень кардиопротекторного действия донора сероводорода / Т.В.Шиманская, Н.А.Струтинская, Г.Л.Вавилова [и др.] // *Российский Физиологический Журнал им. И. М. Сеченова*. – 2013. – Т. 99, № 2. – С.261-272.

24. Xie Y.H. Hydrogen sulfide reduces regional myocardial ischemia injury through protection of mitochondrial function / Y.H.Xie, N.Zhang, L.F. Li [et al] // Molecular Medicine Reports. – 2014 – Vol. 10, № 4. – P.1907-1914.
25. Sivarajah A. Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of hydrogen sulfide in a rat model of regional myocardial I/R / A.Sivarajah, M.Collino, M.Yasin [et al] // Shock. – 2009. – Vol. 31. – P. 267–274.
26. Шиманська Т. В. Вплив сірководню на реакції ізолюваного серця щурів при навантаженні об'ємом і ішемії-реперфузії / Т.В.Шиманська, Ю.В.Гошовська, О.М.Семеніхіна, В.Ф.Сагач // Фізіологічний журнал. – 2012. – Том 58, № 6. – С. 57-66.
27. Сагач В.Ф. Вплив стимуляції та блокади синтезу ендогенного сірководню на функцію серця в умовах ішемії-реперфузії / В.Ф. Сагач, Т.В. Шиманська, Ю.В. Гошовська // Фізіологічний журнал. – 2013. – Том 59, № 4. – С.8-15.
28. Kwong J.Q. Physiological and pathological roles of the mitochondrial permeability transition pore in the heart / J.Q. Kwong, J.D. Molkentin // Cell Metabolism. – 2015. – Vol. 21, №2. – P.206-14.
29. Семеніхіна О.М. Вплив донора сірководню NaHS на функціональний стан дихального ланцюга мітохондрій серця щурів / О.М. Семеніхіна, Н.А. Струтинська, А.Ю. Будько [і ін.] // Фізіологічний журнал. – 2013. – Том 59, №2. – С.9-17.
30. Gadalla M.M. Hydrogen sulfide as a gasotransmitter / M.M. Gadalla, S.H.Snyder // Journal Neurochemistry – 2010. –Vol.113, №1. – P. 14-26.
31. Li L. Putative biological roles of hydrogen sulfide in health and disease: a breath of not so fresh air / L.Li, P.K. Moore // Trends Pharmacology Science. – 2008. – Vol. 29. – P.84–90.

32. Tang G. Direct Stimulation of K_{ATP} Channels by Exogenous and Endogenous Hydrogen Sulfide in Vascular Smooth Muscle Cells / G.Tang, L.Wu, W.Liang [et al] // Molecular Pharmacology – 2005. – Vol. 68, № 6. – P.1757–1764.
33. Siebert N. H₂S contributes to the hepatic arterial buffer response and mediates vasorelaxation of the hepatic artery via activation of KATP channels / N.Siebert, D.Cantr'e, C.Eipel [et al] // American Journal Physiology Gastrointestinal Liver Physiology – 2008. – Vol. 295. – P.266–273.
34. Zhang Z. Hydrogen sulfide contributes to cardioprotection during ischemia-reperfusion injury by opening K ATP channels / Z.Zhang, H.Huang, P.Liu [et al] // Cancer Journal Physiology and Pharmacology – 2007. – Vol. 85. – P.1248–1253.
35. Kubo S. Dual modulation of the tension of isolated gastric artery and gastric mucosal circulation by hydrogen sulfide in rats / S.Kubo, M.Kajiwara, A.Kawabata // Inflammopharmacology. – 2008. – Vol. 15. – P.288–292.
36. Ji Y. Exogenous hydrogen sulfide postconditioning protects isolated rat hearts against ischemia-reperfusion injury / Y. Ji, Q.F.Pang, G.Xu [et al] // European Journal Pharmacology. – 2008. – Vol. 587. – P.1–7.
37. Семеніхіна О.М. Механізми впливу сірководню на скоротливу активність гладеньких м'язів щурів / О.М.Семеніхіна, О.В. Базиліук, Ю.П., Корчак [і ін.] // Фізіологічний журнал. – 2011. – Том 57, №4. – С. 3-11.

Надійшла до редколегії 02.11.15

Н. Струтинська, канд. біол. наук

Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, Киев, Украина

СЕРОВОДОРОД КАК СИГНАЛЬНАЯ МОЛЕКУЛА В СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЕ

Недавно сероводород (H_2S) был признан в качестве важной сигнальной молекулы в сердечно-сосудистой системе. Кроме того, он модулирует передачу нервного импульса, является тканевым цитопротектором и кислородным сенсором. Эндогенный H_2S производится с L-цистеина с помощью цистатионин- β -синтазы (CBS), цистатионин- γ -лиазы (CSE) и 3-меркаптопируватсульфотрансферазы (3MST). На сегодня H_2S признается в качестве третьего газового трансммитера в дополнение к окиси азота и оксида углерода. В этом обзоре представлены современные представления о физиологической и кардиопротекторной роли эндогенного и экзогенного H_2S , как регуляторного фактора в сердечно-сосудистой системе

Ключевые слова: сероводород, L-цистеин, NaHS, сердце, сосуды.

N. Strutynska, PhD

Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

HYDROGEN SULFIDE AS A SIGNALING MOLECULE IN THE CARDIOVASCULAR SYSTEM

Recently, hydrogen sulfide (H_2S) has been recognized as an important signaling molecule in the cardiovascular system. In addition, it modulates nerve impulse transmission is cytoprotector and oxygen sensor. Endogenous H_2S is produced from L-cysteine by cystathionine β -synthase (CBS), cystathionine γ -lyase (CSE), and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3MST). Today H_2S is recognized as the third gasotransmitter in addition to nitric oxide and carbon monoxide. This review presents the current understanding of the physiological and cardioprotective role of endogenous and exogenous H_2S , as a regulatory factor in the cardiovascular system.

Key words: hydrogen sulfide, L-cysteine, NaHS, heart, vessels.

УДК: 577.353.9

Д. Ноздренко, канд. біол. наук, Л. Корчинська, канд. біол. наук, М. Мірошніченко, д-р біол. наук, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ВПЛИВ ФОСФОРОРГАНІЧНИХ ІНСЕКТИЦИДІВ: ПІРИМІФОСМЕТИЛУ, ДІАЗИНОНУ ТА ХЛОРПІРИФОСУ НА ДИНАМІЧНІ ПАРАМЕТРИ СКОРОЧЕННЯ М. TIBIALIS ANTERIOR

Вивчено вплив фосфорорганічних інсектицидів, зокрема піриміфосметилу, діазинону та хлорпірифосу на динаміку скорочення пучків волокон скелетного м'язу *m. tibialis anterior* жаби *Rana temporaria*. Визначали силу скорочення та зміну довжини м'язових волокон. Показано нерівномірний вплив діазинону на силову відповідь та вкорочення м'язових волокон. Встановлено, що піриміфосметил має більш виражений пригнічуючий ефект на скоротливу активність скелетних м'язів порівняно з діазиноном та хлорпірифосом. На відміну від однакового рівня зниження досліджуваних динамічних параметрів під дією піриміфосметилу, величина зміни довжини м'язових волокон під впливом діазинону у відсотках є більшою, ніж величина змін силової відповіді, в той час як при дії хлорпірифосу зміна сили м'язового скорочення у відсотках є більш вираженою порівняно зі зміною довжини.

Ключові слова: піриміфосметил, діазинон, хлорпірифос, м'язове скорочення, сила, довжина.

Вступ. До постійно діючих факторів екологічного забруднення відносяться пестициди. Насичення довкілля потенційно-небезпечними токсичними речовинами призводить до зростання числа патологій, які зумовлені їх впливом [1,2]. Фосфорорганічні сполуки, завдяки своїй високій ефективності в боротьбі з різними видами комах та порівняно низькій стійкості, складають

вагому частину пестицидів (більш ніж 40%), які застосовуються у сучасній аграрній промисловості [3].

Встановлено, що під дією фосфорорганічних інсектицидів (ФОІ) відбувається порушення функціонального стану скелетних м'язів. При отруєнні орґанофосфатами у людини може спостерігатися слабкість, тремтіння, фасцикуляція та, навіть, параліч скелетних м'язів [4-6]. Здебільшого, такі порушення скоротливої активності

розглядаються як вторинні наслідки інактивації ацетилхолінестерази [7-9]. Пригнічення активності даного ферменту призводить до накопичення ацетилхоліну в нервово-м'язових з'єднаннях, що зумовлює комбіновану дисфункцію пресинаптичної та постсинаптичної нервово-м'язової передачі [10]. Проте, показано, що при помірній та тривалій дії інсектицидів в низьких концентраціях, інгібування ацетилхолінестерази не є ключовим механізмом порушення функціональної активності скелетних м'язів [11]. Встановлено, що при довготривалій м'язовій слабкості холінергічні симптоми часто не спостерігаються [12]. Виявлено, що токсичність фосфорорганічних інсектицидів може відрізнятися навіть при їх дії в концентраціях, за яких відбувається рівноцінне пригнічення активності ацетилхолінестерази [13].

Крім того, останнім часом, отримані експериментальні дані, які передбачають залучення інших молекулярних механізмів токсичності фосфорорганічних інсектицидів [14,15]. Оскільки, дані сполуки за своєю природою є жиророзчинними, вони легко проникають в клітину і мають здатність безпосередньо впливати на внутрішньоклітинні процеси. Встановлено, що слабкість м'язів при гострому отруєнні може обумовлюватися порушенням кальцієвого гомеостазу [16], NO-опосередкованим пригніченням активності мітохондріальної АТФ-синтази [17], окисдаивними пошкодженнями мембрани міофібрил шляхом надмірного вивільнення вільних радикалів, особливо активних форм кисню та азоту [18] та зміною її ліпідного складу. Таким чином, досі не існує однозначних поглядів на патофізіологічні зміни, що зумовлюють порушення функціонування м'язів під дією фосфорорганічних інсектицидів. Встановлення рівноважного стаціонарного стану скорочення під дією різних речовин може варіювати не тільки в досить широких межах залежно від концентрації реагентів але й залежно від тривалості експерименту [19]. Цей факт ускладнює не лише можливість адекватно інтерпретувати отримані дослідником результати, але й може призвести до суттєвих помилок при плануванні досліджень. На сьогодні, залишається не зрозумілим чи відбувається зміна функціонального стану скелетних м'язів незалежно від холінергічних ефектів дії органофосфатів.

Метою роботи було встановити та порівняти вплив піриміфосметилу, діазинону та хлорпірифосу, як найпоширеніших в Україні ФОІ на динаміку м'язового скорочення, викликаного стимуляцією електричними імпульсами.

Матеріали та методи досліджень

Одними з найбільш комерційно-розповсюджених ФОІ є фосфортиоати. Нами було обрано для дослідження такі фосфортиоати як піриміфосметил, діазинон та хлорпірифос, оскільки вони дозволені для використання та активно застосовуються в сільському господарстві України.

Досліди проводили на пучках волокон м'язу *m.tibialis anterior*, виділених з задньої кінцівки жаби *Rana temporaria*. Тварин забивали методом декапітації. У забитої тварини ампутували задні кінцівки, які поміщали в розчин Рінгера наступного складу: 115,5 ммоль/л NaCl, 2 ммоль/л KCl, 1,8 ммоль/л CaCl₂ та 2 ммоль/л Na₂HPO₄ + NaH₂PO₄ (pH 7.0). М'яз *m. tibialis anterior* та пучки волокон з фрагментами сполучної тканини на кінцях виділяли механічним шляхом за допомогою наборів офтальмологічних інструментів. На виділені препарати накладали лігатури, після чого об'єкт розміщували в дослідницькій камері. Препарат протягом 60 хвилин адаптували в постійно циркулюючому фізіо-

логічному розчині. У експериментах використовували розчини піриміфосметилу, діазинону та хлорпірифосу у діапазоні концентрацій 10^{-7} - 10^{-5} моль/л. Фосфорорганічні інсектициди розчиняли у фізіологічному розчині Рінгера. Експерименти проводили в ізотонічному режимі при постійному контролі динамічних параметрів скорочення. В процесі проведення експерименту фіксували силу скорочення, зміну довжини, температуру омиваючого розчину та параметри стимулюючого сигналу. Досліди проводили при постійно-циркулюючому розчині Рінгера з періодом релаксації 3 хвилини. Підтримання температури здійснювали за допомогою термостатичного пристрою.

Для реєстрації сили скорочення пучків волокон скелетного м'язу використовували тензометричну установку [21]. Даний пристрій являє собою комплекс, що складався з камери з системою датчиків, в якій розміщувався досліджуваний препарат, системи насосів та дозаторів, датчиків сили, генератора синхронних імпульсів, системи термоконтролю, осцилографів, комплексу АЦП-ЦАП. Стимуляцію здійснювали електричними імпульсами прямокутної форми тривалістю 2 мс, які отримували за допомогою генератора імпульсів, керованим ЦАП, через платинові електроди. Тривалість стимуляційного сигналу становила 3 с. Електроди нерухомо фіксували безпосередньо в дослідницькій камері, паралельно один до одного. Характеристики стимулюючого сигналу задавали програмно і передавали з комплексу АЦП-ЦАП на генератор. Модульовані криві, представлені в роботі, будували з врахуванням сигналів входу – виходу перетворювача. Паралельний візуальний контроль за динамікою м'язового скорочення здійснювали за допомогою катодного осцилографа.

Результати та обговорення. Порівняння впливу досліджуваних інсектицидів на динамічні параметри скорочення проводили на рівні максимального прояву їх пригнічуючої дії. Отримані експериментальні дані показали, що концентраційний діапазон впливу піриміфосметилу значно відрізняється від інших досліджуваних інсектицидів. Достовірне пригнічення сили та довжини скорочення скелетних м'язів відбувається при дії піриміфосметилу починаючи з концентрації 10^{-7} моль/л. В той час як, під впливом діазинону та хлорпірифосу у межах концентраційного діапазону 10^{-7} – $7,5 \cdot 10^{-7}$ моль/л достовірні зміни скоротливої активності пучків м'язових волокон не реєструвалися. На відміну від піриміфосметилу, зниження динамічних параметрів скорочення при дії діазинону та хлорпірифосу відбувалося починаючи з концентрації 10^{-6} моль/л.

Слід зазначити, що при дії діазинону та хлорпірифосу у концентрації 10^{-6} моль/л достовірна різниця між рівнем зниження силової продуктивності не спостерігалася ($80,7 \pm 2,4\%$ та $82,8 \pm 1,9\%$ відповідно). В той час як, під впливом зазначеної концентрації піриміфосметилу відбувалося виражене пригнічення даного динамічного параметру ($26,7 \pm 2,3\%$ від контролю), що майже в 3 рази перевищувало відповідні значення отримані при дії інших досліджуваних інсектицидів (рис.1).

У випадку концентрації $2,5 \cdot 10^{-6}$ моль/л зниження сили скорочення при дії піриміфосметилу, діазинону та хлорпірифосу відбувалось відповідно до $23,4 \pm 2,3\%$, $63,3 \pm 1,9\%$ та $39,0 \pm 1,8\%$. Тобто, при збільшенні концентрації інсектицидів до $2,5 \cdot 10^{-6}$ моль/л рівень пригнічення силової продуктивності скелетного м'язу (СМ) під дією піриміфосметилу переважав приблизно у 2,7 та 1,7 разів відповідні значення, отримані при дії діазинону та хлорпірифосу.

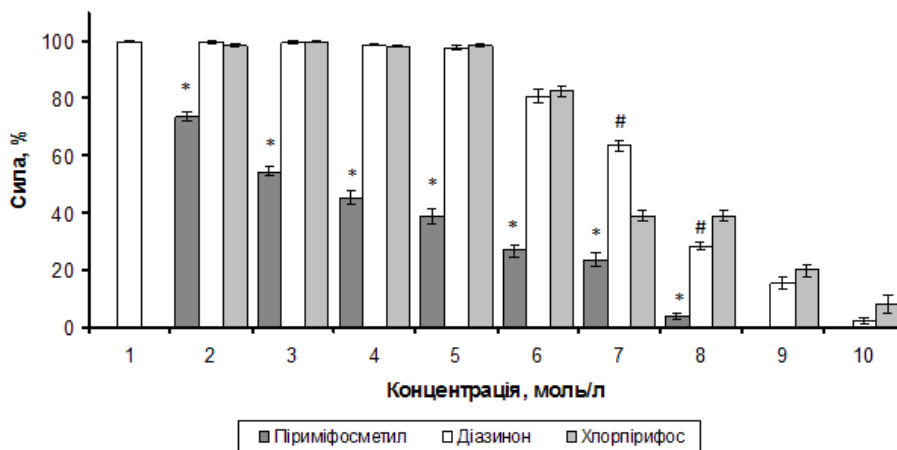


Рис. 1. Зміна сили скорочення скелетного м'язу жаби при дії піриміфосметилу, діазинону та хлорпірифосу. 1 – контроль; 2-10 – концентрації інсектицидів 10^{-7} , $2,5 \cdot 10^{-7}$, $5 \cdot 10^{-7}$, $7,5 \cdot 10^{-7}$, 10^{-6} , $2,5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-6}$, $7,5 \cdot 10^{-6}$, 10^{-5} моль/л ($n=10$; $M \pm m$); * – відмінність дії піриміфосметилу від дії діазинону та хлорпірифосу достовірна, $p < 0,05$; # – відмінність дії піриміфосметилу та діазинону від дії хлорпірифосу достовірна, $p < 0,05$

Слід зазначити, що за даних умов реєструвалися відмінності дії діазинону та хлорпірифосу на скоротливу активність СМ, з більш вираженим інгібіторним ефектом останнього. Оскільки, при підвищенні концентрації хлорпірифосу до $2,5 \cdot 10^{-6}$ моль/л відбулося різке зниження сили продуктивності СМ у більш ніж 2 рази порівняно з попередньою концентрацією, при відносно незначному пригніченні даного динамічного параметру у 1,3 рази у випадку діазинону.

Повне пригнічення здатності м'язу генерувати силу у відповідь на прикладений стимуляційний сигнал відбувалося при дії піриміфосметилу у концентрації $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л. При даній концентрації діазинону рівень сили продуктивності СМ знизився до $28,4 \pm 1,4\%$ від контролю, що переважає більш ніж у 2 рази значення, отримані при дії попередньої концентрації даного інсектициду. На відміну від діазинону та піриміфосметилу, з підвищенням концентрації хлорпірифосу до $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л жодних змін рівня сили порівняно з концентрацією $2,5 \cdot 10^{-6}$ моль/л не відбувалося.

При проведенні аналізу експериментальних даних, достовірних відмінностей між пригнічуючою дією діазинону та хлорпірифосу у концентрації $7,5 \cdot 10^{-6}$ та 10^{-5} моль/л не виявлялося. При дії даних інсектицидів у концентрації 10^{-5} моль/л відбувалося майже повне пригнічення скоротливої активності пучків волокон СМ.

Відмінності дії піриміфосметилу, діазинону та хлорпірифосу окрім сили продуктивності спостерігалися також на рівні зміни довжини при скороченні (рис.2).

При відносно лінійному зниженні зміни довжини скорочення СМ під впливом піриміфосметилу в межах концентраційного діапазону 10^{-7} - $7,5 \cdot 10^{-7}$ моль/л, зміна даного динамічного параметру в результаті дії зазначених концентрацій діазинону та хлорпірифосу не спостерігалася. Як і у випадку сили продуктивності, зміна довжини скорочення м'язів під дією діазинону та хлорпірифосу відбувалася починаючи з концентрації 10^{-6} моль/л. Проте на відміну від майже однакового рівня пригнічення сили скорочення під впливом зазначеної концентрації обох інсектицидів (рис. 1), виявлялися відмінності їх дії на зміну довжини скорочення. За даних умов проведення дослідів, рівень пригнічення зміни до-

вжини скорочення під дією діазинону у 1,3 разів переважав відповідні значення отримані у випадку хлорпірифосу. В той час, як при дії піриміфосметилу у концентрації 10^{-6} моль/л довжина м'язів при скороченні зменшувалась до $22,3 \pm 2,1\%$ від контролю, що у 2,9 та 3,8 разів переважає відповідні показники отримані в результаті впливу діазинону та хлорпірифосу, (рис. 2)

При збільшенні концентрації піриміфосметилу до $2,5 \cdot 10^{-6}$ моль/л рівень зміни довжини м'язу при скороченні достовірно не відрізнявся від попередньої концентрації. На відміну від піриміфосметилу та діазинону, підвищення концентрації хлорпірифосу до $2,5 \cdot 10^{-6}$ моль/л зумовлювало різке зменшення рівня зміни довжини у 2 рази порівняно з попередньою концентрацією. Причому подальше збільшення концентрації хлорпірифосу до $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л не викликало достовірного пригнічення зміни довжини м'язу. Під впливом даної концентрації діазинону навпаки спостерігалася посилення пригнічуючої дії інсектициду на зміну даного динамічного параметру у 1,3 разів порівняно з попередньою концентрацією. В результаті дії піриміфосметилу у концентрації $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л довжина м'язу у процесі скорочення не змінювалася взагалі, тобто спостерігалася повне пригнічення скоротливої активності.

Ефект дії хлорпірифосу у концентрації $2,5 \cdot 10^{-6}$ моль/л на зміну довжини м'язу у процесі скорочення був менш вираженим порівняно з діазиноном. Рівень пригнічення даного динамічного параметру під дією діазинону майже у 1,8 разів переважав відповідні значення, отримані у випадку хлорпірифосу. При збільшенні концентрації досліджуваних інсектицидів до 10^{-5} моль/л відбувалося повне пригнічення скоротливої активності м'язових волокон, тобто зміна довжини при скороченні не спостерігалася взагалі. Таким чином, отримані експериментальні дані показали відмінності рівнів пригнічення динамічних параметрів скорочення під дією піриміфосметилу, діазинону та хлорпірифосу залежно від їх концентрацій. Встановлено, що концентрація діазинону та хлорпірифосу, яка зумовлює повне пригнічення скоротливої активності СМ, є у 5 разів вищою ніж відповідна концентрація піриміфосметилу.

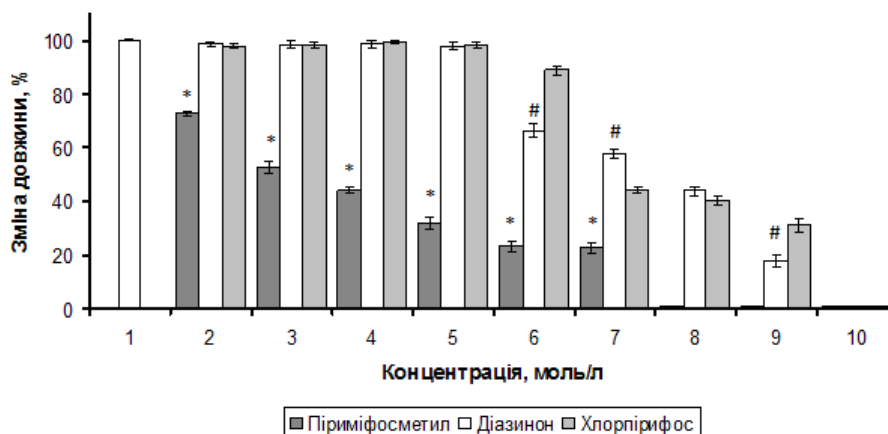


Рис. 2. Зміна довжини скорочення скелетного м'язу жаби при дії піриміфосметилу, діазинону та хлорпірифосу. 1 – контроль; 2-10 – концентрації інсектицидів 10^{-7} , $2,5 \cdot 10^{-7}$, $5 \cdot 10^{-7}$, $7,5 \cdot 10^{-7}$, 10^{-6} , $2,5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-6}$, $7,5 \cdot 10^{-6}$, 10^{-5} моль/л ($n=10$; $M \pm m$); * – відмінність дії піриміфосметилу від дії діазинону та хлорпірифосу достовірна, $p < 0,05$; # – відмінність дії піриміфосметилу та діазинону від дії хлорпірифосу достовірна, $p < 0,05$

Слід зазначити, що в результаті дії діазинону спостерігається більш виражене зменшення зміни довжини порівняно з силою скорочення, в той час як під впливом хлорпірифосу навпаки переважає рівень пригнічення силової продуктивності м'язових волокон. На відміну від діазинону та хлорпірифосу, піриміфосметил зумовлює майже рівноцінне пригнічення обох динамічних параметрів.

Значні відмінності дії досліджуваних фосфоріоатів спостерігалися також у часі встановлення макси-

мального рівня пригнічення динамічних параметрів скорочення.

У випадку піриміфосметилу значних відмінностей між часом встановлення максимального рівня пригнічення силової продуктивності та зміни довжини м'язових волокон не виявлялося в межах усього досліджуваного концентраційного діапазону (рис.3). Загалом при дії піриміфосметилу час, після досягнення якого подальшої зміни динамічних параметрів скорочення не відбувалося, зменшувався зі збільшенням концентрації інсектициду.

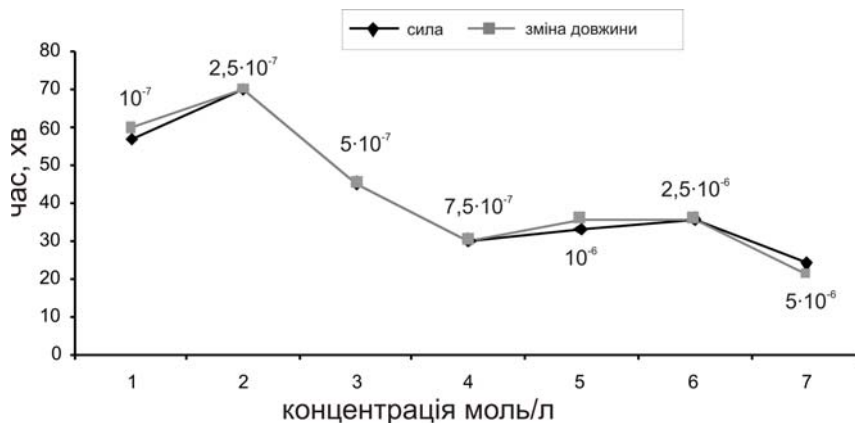


Рис. 3. Час встановлення максимального рівня пригнічення динамічних параметрів скорочення скелетних м'язів залежно від концентрації піриміфосметилу 1-7 – концентрації піриміфосметилу 10^{-7} , $2,5 \cdot 10^{-7}$, $5 \cdot 10^{-7}$, $7,5 \cdot 10^{-7}$, 10^{-6} , $2,5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л відповідно

Проте у випадку дії піриміфосметилу у концентрації $2,5 \cdot 10^{-7}$ моль/л встановлення стаціонарного стану скорочення відбувалося приблизно на 10 хв. пізніше ніж під впливом даного інсектициду у концентрації 10^{-7} моль/л. При дії піриміфосметилу у концентраціях $7,5 \cdot 10^{-7}$, 10^{-6} , $2,5 \cdot 10^{-6}$ моль/л час досягнення максимального рівня пригнічення динамічних параметрів скорочення майже не змінювався. Найменша тривалість дії піриміфосметилу, за якої встановлювався максимальний рівень пригнічення скоротливої

активності СМ спостерігалася у випадку концентрації інсектициду $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л.

Подібно до піриміфосметилу, при дії діазинону загалом відбувалося зменшення тривалості дії інсектициду, яка необхідна для встановлення максимального рівня пригнічення динамічних параметрів скорочення волокон СМ, зі збільшенням його концентрації (рис. 4). Проте, при дії діазинону у концентрації 10^{-6} моль/л максимальний рівень пригнічення динамічних параметрів скорочення встановлювався значно швидше ніж у випадку його дії у концентрації $2,5 \cdot 10^{-6}$ моль/л.

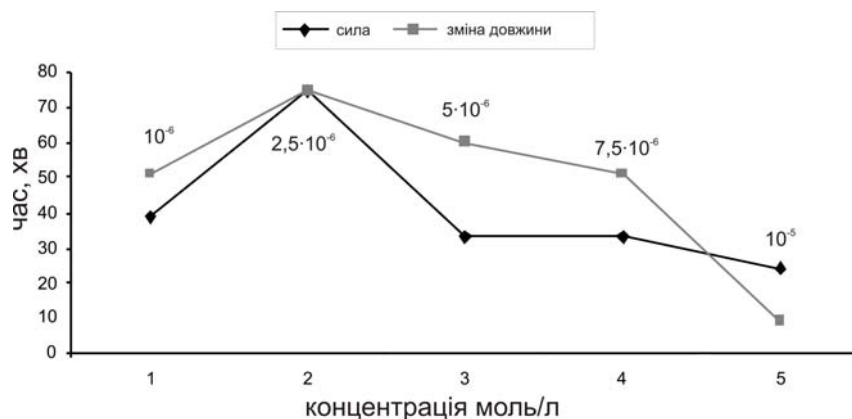


Рис. 4. Час встановлення максимального рівня пригнічення динамічних параметрів скорочення скелетних м'язів залежно від концентрації діазинону
1-5 – концентрації діазинону 10^{-6} , $2,5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-6}$, $7,5 \cdot 10^{-6}$, 10^{-5} моль/л відповідно

На відміну від піриміфосметилу, у випадку діазинону, окрім концентрації $2,5 \cdot 10^{-6}$ моль/л, спостерігалися значні відмінності між тривалістю дії інсектициду, яка необхідна для встановлення максимального рівня пригнічення силової продуктивності та зміни довжини м'язових волокон при скороченні.

В межах досліджуваного концентраційного діапазону, за виключенням концентрацій $2,5 \cdot 10^{-6}$ та 10^{-5} моль/л, встановлення максимального рівня пригнічення силової продуктивності відбувалося при меншій тривалості дії діазинону порівняно зі зміною довжини. Лише під впли-

вом діазинону у концентрації 10^{-5} моль/л максимальний рівень пригнічення зміни довжини встановлювався при меншій тривалості дії інсектициду порівняно з силою скорочення, така відмінність може бути обумовлена повним пригнічення скоротливої активності м'язових волокон за даних умов.

На відміну від піриміфосметилу та діазинону, при дії хлорпірифосу час встановлення максимального рівня пригнічення скоротливої активності СМ збільшувався з підвищенням концентрації (рис. 5.)

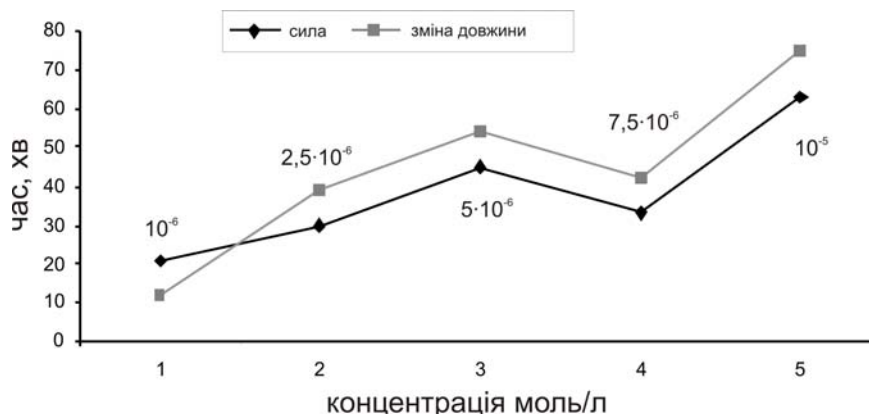


Рис. 5. Час встановлення максимального рівня пригнічення динамічних параметрів скорочення скелетних м'язів залежно від концентрації хлорпірифосу
1-5 – концентрації хлорпірифосу 10^{-6} , $2,5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-6}$, $7,5 \cdot 10^{-6}$, 10^{-5} моль/л відповідно

Слід зазначити, що в межах досліджуваного концентраційного діапазону, окрім концентрації 10^{-6} моль/л, тривалість дії хлорпірифосу, яка необхідна для встановлення максимального рівня пригнічення сили є меншою порівняно зі зміною довжини м'язових волокон при скороченні.

Таким чином, результати досліджень показали, що дія піриміфосметилу, діазинону та хлорпірифосу відрізняється за часом встановлення максимального рівня пригнічення динамічних параметрів скорочення СМ залежно від концентрації інсектицидів.

Окрім концентраційного діапазону та часу встановлення максимального рівня пригнічення динамічних параметрів скорочення, вплив інсектицидів відрізняється також за характером реалізації силової відповіді на прикладений стимуляційний сигнал. Так при дії діазинону у концентраціях $5 \cdot 10^{-6}$, $7,5 \cdot 10^{-6}$, 10^{-5} моль/л та хлорпірифосу у концентрації $2,5 \cdot 10^{-6}$ моль/л спостерігалася неспроможність м'яза утримувати силу на певному досягнутому рівні, тобто генерація сили відбувалася нелінійно на дотетанічних та тетанічних ділянках скоротливого акту. На відміну від діазинону та хлорпірифосу, при дії піриміфосметилу сила м'язом розвивалася лінійно протягом всієї тривалості стимуляційного сигналу. Слід відмітити, що отримані зміни скоротливої активності в результаті дії всіх досліджуваних нами інсектицидів не відновлювалися в результаті відмивання м'язових препаратів розчином Рінгера, тобто припинення їх дії не призводить до відновлення початкового функціонального стану СМ.

Таким чином показано, що зміна динаміки скорочення скелетних м'язів під дією різних фосфортоатів хара-

ктеризується певними відмінностями, що свідчить про недоцільність надання оцінки впливу даних речовин як загальному класу.

Список використаних джерел

1. Tashev T.S. Stomach and duodenal lesions in patients with acute organophosphorus pesticide poisonings. / Tashev T.S., Markov D. // *Vutr. Boles.* – 1991. – Vol.30, №2. – P. 61-65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
2. Webster L.R. Organophosphate-based pesticides and genetic damage implicated in bladder cancer. / Webster L.R., McKenzie G.H., Moriarty H.T. // *Cancer Genet. Cytogenet.* – 2002. – Vol.133, №2. – P.112-117. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
3. Kwong K. Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. / Kwong K. // *Ther Drug Monit.* – 2002. – Vol.24. – P.144 – 149. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
4. Gupta R.C. Toxicology of organophosphate and carbamate compounds. / Gupta R.C. // Academic Press, – 2006. – P.763-780. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
5. Thiermann H. Monitoring of neuromuscular transmission in organophosphate pesticide-poisoned patients. / Thiermann H., Zilkerb T., Eyer F., [et al.]. // *Toxicology Letters.* – 2009. – Vol. 191, № 2-3. – P. 297-304. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
6. Bohuts'ka K.I. The use of aluminum and its compounds for the biomedical purposes. / Bohuts'ka K.I., Pryluts'kyi Iu.I., Nozdrenko D.M. // *Fiziol Zh.* – 2014. – 60(1) P.91-97. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
7. Thiermann H. Effects of oximes on muscle force and acetylcholinesterase activity in isolated mouse hemidiaphragms exposed to paraoxon. / Thiermann H., Eyer P., Worek F.[et al.]. // *Toxicology.* – 2005. – Vol.214, №3. – P.190-197. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
8. Yang C.C. Intermediate syndrome following organophosphate insecticide poisoning. / Yang C.C., Deng J.F. // *J. Chin. Med. Assoc.* – 2007. – V.70, № 11. P. 467–472. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
9. Miranda J. Muscular strength and vibration thresholds during two years after acute poisoning with organophosphate insecticides. / Miranda J., McConnell R., Wesseling C. [et al.]. // *Occup. Environ. Med.* – 2004. – V.61, №1. – P. 4-7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
10. De Bleecker J. Prolonged toxicity with intermediate syndrome after combined parathion and methyl parathion poisoning. / De Bleecker J., Willem J., Van Den Neucker K.,[et al.]. // *J Toxicol-Clin Toxicol.* – 1992. – V.30. – P. 333–345. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

11. Casida J.E. Organophosphate toxicology: safety aspects of nonacetylcholinesterase secondary targets. / Casida J.E., Quistad G.B. // *Chem. Res. Toxicol.* – 2004. – Vol.17. P. 983–998. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

12. Venkatesh S. ATP synthase inhibition and nitric oxide are involved in muscle weakness that occurs in acute exposure of rats to monocrotophos. / Venkatesh S., Ramachandran A., Zachariah A. // *Toxicol Mech Methods.* – 2009. – Vol.19, №3. P. 239–245. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

13. McDaniel K. L. Differential profiles of cholinesterase inhibition and neurobehavioral effects in rats exposed to fenamiphos or profenofos. / McDaniel K. L., Moser V. C. // *Neurotoxicol. Teratol.* – 2004. – Vol.26. – P. 407-415. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

14. Chan J.Y. Cholinergic-receptor-independent dysfunction of mitochondrial respiratory chain enzymes, reduced mitochondrial transmembrane potential and ATP depletion underlie necrotic cell death induced by the organophosphate poison mevinphos. / Chan J.Y., Chan S.H., Dai K.Y. [et al.]. // *Neuropharmacology.* – 2006. – Vol.51, №7-8. – P.1109-1119. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

15. Rush T. Mechanisms of chlorpyrifos and diazinon induced neurotoxicity in cortical culture. / Rush T., Liu X.Q., Hjelmhaug J., Lobner D. // *Neuroscience.* – 2010. – Vol.166, №3. – P. 899-906. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

16. Yang D. Biochemical changes in primary culture of skeletal muscle cells following dimethoate exposure. / Yang D., Lu X., Zhang W., He F. // *Toxicology.* – 2002. – V.174. – P.79-85. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

17. Raghupathya V. Monocrotophos toxicity and bioenergetics of muscle weakness in the rat. / Raghupathya V., Poornimab S., Sivagurub J. [et al.]. // *Toxicology.* – 2010. – Vol. 277, № 1-3. – P. 6-10. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

18. Banerjee B. D. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free radical scavengers. / Banerjee B. D., Seth V., Bhattacharya A., Pasha S. T., Chakraborty A. K. // *Toxicol. Lett.* – 1999. – Vol.107. – P. 33-47. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

19. Nozdrenko, D.N. About molecular mechanisms of fiber muscle contraction at transition to new equilibrium state: Analysis of experimental data using three-component electrical stimulating signal. / Nozdrenko, D.N., Bogutska, K.I. // *Biopolymers and Cell.* Volume 21. – 2005. – P. 285-286. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Надійшла до редколегії 18.11.15

Д. Ноздренко, канд. биол. наук, Л. Корчинская, канд. биол. наук, М. Мирошниченко, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ВЛИЯНИЕ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ ИНСЕКТИЦИДОВ: ПИРИМИФОСМЕТИЛА, ДИАЗИНОНА И ХЛОРПИРИФОСА НА ДИНАМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ СОКРАЩЕНИЯ M. TIBIALIS ANTERIOR

В работе изложены результаты влияния фосфорорганических инсектицидов, в частности пиримифосметила, диазинона и хлорпирифоса на динамику сокращения пучков волокон скелетной мышцы *m. tibialis anterior* лягушки *Rana temporaria*. При проведении эксперимента фиксировали силу сокращения и изменение длины мышечных волокон. Показано неравномерное влияние диазинона на силовой ответ и изменения длины волокон. Установлено, что пиримифосметил имеет более выраженный подавляющий эффект на сократительную активность скелетных мышц, в сравнении с диазиноном и хлорпирифосом. В отличие от одинакового уровня снижения исследуемых динамических параметров под действием пиримифосметила, изменения длины мышечных волокон под воздействием диазинона являются более значимыми, чем величина изменений силового ответа, в то время как при действии хлорпирифоса изменение силы мышечного сокращения является более выраженной в сравнении с изменением длины.

Ключевые слова: пиримифосметил, диазинон, хлорпирифос, мышечное сокращение, сила, длина.

D. Nozdrenko, PhD., L. Korchinska, PhD., M. Miroshnychenko, DSc.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

EFFECT OF ORGANOPHOSPHORUS INSECTICIDES: PIRIMIPHOSMETHYL, DIAZINON AND CHLORPYRIFOS, ON DYNAMIC CHARACTERISTICS OF THE FROG MUSCLE M. TIBIALIS ANTERIOR FIBER CONTRACTION

The investigation of the influence of organophosphorus insecticides such as pirimiphosmethyl, diazinon and chlorpyrifos on the contraction dynamics of skeletal *m. tibialis* fibers of frog *Rana Temporaria* is described at this work. Experiments were performed using the methods of strain-gauge tension measurement. In the experiments contraction strengths and length changes were obtained. Nonlinear influence of diazinon on muscle force and shortening was shown. It was elucidated that pirimiphosmethyl has stronger inhibitory effect on the contraction activity of skeletal muscle than diazinon and chlorpyrifos. As opposed to the similar level of both dynamic parameters decrease under influence of pirimiphosmethyl, the magnitude of muscle length change is higher than magnitude of change of muscle strength under influence of diazinon whereas inhibitory effect of chlorpyrifos on force response is more potent than on muscle length change during contraction.

Key words: pirimiphosmethyl, diazinon and chlorpyrifos, muscle contraction, muscle force.

УДК 581.1 + 577.152.1

У. Стамбульська, здобувач, Н. Мосійчук, канд. біол. наук
Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника, Івано-Франківськ

ВПЛИВ ГЕРБІЦИДУ 2,4-ДИХЛОРФЕНОКСИОЦТОВОЇ КИСЛОТИ ТА АЗОТФІКСУЮЧИХ БАКТЕРІЙ НА РОСЛИНИ ГОРОХУ

Вивчено вплив гербіциду 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти (2,4-Д) на рослини гороху сорту Альфа за окремими біохімічними показниками. Одночасний вплив 2,4-Д та азотфіксуючих бульбочкових бактерій спричиняє підвищення вмісту карбонільних груп білків у листках гороху, порівняно з таким у рослин без бактеріальної обробки. Показано, що за умов сумісної дії ефекторів на рослини гороху ключову роль у знешкодженні АФК і зниженні інтенсивності оксидативного стресу відіграє гваяколпероксидаза.

Ключові слова: горох, 2,4-Д, каталаза, гваяколпероксидаза.

Вступ. Гербіциди є розповсюдженими екотоксикантами, які як фізіологічно-активні речовини, особливо при неправильному їх використанні, можуть впливати на перебіг фізіолого-біохімічних процесів у культурних рослин [1]. У сільському господарстві широко застосовується гербіцид 2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота (2,4-Д), яка належить до системних гербіцидів і є синтетичним аналогом 3-індолоцтової кислоти [2, 3, 4]. Показано, що 2,4-Д інгібує ріст пагонів і коренів рослин, викликає хлороз листків, пригнічує синтез нуклеїнових кислот, порушує нормальний баланс ауксинів у рослині, впливає на процеси окисного фосфорилування і дихання та пригнічує мітотичну активність у меристемах рослин [5, 6]. Одним з негативних проявів дії 2,4-Д та її похідних, є розвиток у культурних рослин оксидативного стресу, що виражається у підвищенні стаціонарної концентрації активованих форм кисню (АФК) [7, 8, 9, 10]. АФК, в свою чергу, ініціюють у рослинних клітинах каскад вільнорадикальних реакцій та призводять до пошкодження різних клітинних компонентів [11, 12]. Одним з основних напрямків оптимізації використання в посівах сільськогосподарських культур гербіцидів і зменшення їх токсичного впливу, може бути розробка технологій сумісного їх застосування з передпосівною обробкою симбіотичними азотфіксуючими бактеріями.

Метою даної роботи було дослідити перебіг вільнорадикальних процесів у рослин гороху посівного сорту Альфа за умов впливу гербіциду 2,4-Д та передпосівної обробки симбіотичними азотфіксуючими бактеріями.

Матеріали і методи. Для дослідження використовували рослини гороху посівного – *Pisum sativum* L. сорту Альфа. У роботі були використані реактиви виробництва "Sigma Chemical Co." (США), "Рєахім" (Росія). Решта реактивів – вітчизняного виробництва класу не нижче ч.д.а.

Насіння гороху стерилізували і вирощували, як описано нами раніше [13]. Стерилізоване та пророщене насіння гороху перед висадкою інокулювали протягом години бактеріями референтного штаму *R. leguminosarum* 245a та виділеного нами штаму *R. leguminosarum* RRL8. В якості гербіциду використовували водний розчин 2,4-Д в концентрації 0,1 мкмоль/кг субстрату, який вносили у субстрат перед висадкою рослин. Схема експерименту включала шість дослідних груп рослин: (1) контроль (без інокуляції, суміш Кнопа (0,25 норми); (2) (без інокуляції, суміш Кнопа (0,25 норми) + 0,1 мкМ 2,4-Д); (3) інокуляція штамом RRL8, суміш Кнопа (0,25 норми); (4) інокуляція штамом RRL8, суміш Кнопа (0,25 норми) + 0,1 мкМ 2,4-Д; (5) інокуляція штамом 245a, суміш Кнопа (0,25 норми); (6) інокуляція штамом RRL8, суміш Кнопа (0,25 норми) + 0,1 мкМ 2,4-Д. Рослини вирощували при температурі $25 \pm 2^\circ\text{C}$ за умов 16-годинного світлового дня та освітленості 9000 Лк. Поливи проводили через добу відстояною водопровідною водою у кількості 100 мл на посудину. Забір рослинного матеріалу здійснювали на 5-ту, 10-ту та 15 добу росту. Верхівкове листя рослин гомо-

генізували у співвідношенні 1:10 маса/об'єм в середовищі, яке містило: 50 мМ калій-фосфатний буфер (рН 7,0), 0,5 мМ етилендіамінтетраацетат та 1 мМ фенілметилсульфонілфторид [14]. Отримані гомогенати центрифугували (13000 g, 15 хв, 4°C) на центрифугі Eppendorf 5415R (Німеччина) [14] і у супернатантах визначали вміст карбонільних груп білків (КБ) [15], ТБК-активних продуктів (ТБАП) [16], активність ферментів [17, 18] та концентрацію білка [19]. Каталазну активність визначали на спектрофотометрі СФ-46 (Ломо, СРСР), реєструючи зміну оптичного поглинання пероксиду водню при довжині хвилі 240 нм [17]. Для розрахунків використовували коефіцієнт молярної екстинкції H_2O_2 $39,4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [17]. Активність гваяколпероксидази (ГПО) визначали на спектрофотометрі Spekol 211 (Carl Zeiss Jena, Німеччина) при довжині хвилі 470 нм у пробі об'ємом 1,5 мл, реєструючи зміну оптичного поглинання внаслідок окислення гваяколу до тетрагваяколу [18]. Для розрахунків використовували коефіцієнт молярної екстинкції гваяколу $26600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [20]. Концентрацію білка визначали за методом Бредфорд [19]. Для визначення вмісту КБ і ТБАП супернатанти змішували з 40% ТХО у співвідношенні (маса/об'єм) 1:1 та центрифугували 5 хв при 7000 об/хв. Осаджені білки використовували для визначення вмісту КБ, а супернатанти для визначення ТБАП. Вміст карбонільних груп білків визначали за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразинном [15], використовуючи для розрахунків коефіцієнт молярної екстинкції динітрофенілгідразонів $22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [15]. Вміст ТБАП визначали за методом Heath та Packer [16] і розраховували з використанням коефіцієнту молярної екстинкції ТБК2-МДА адукту $155000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [16]. Дані представлені як середнє $\pm$ похибка середнього ($\text{M} \pm \text{m}$). Статистичну обробку здійснювали за критерієм Стьюдента-Ньюмана-Кольса.

Результати та обговорення. Практично всі біологічні молекули, включаючи вуглеводи, білки, ліпіди та нуклеїнові кислоти, можуть взаємодіяти з АФК та зазнавати різноманітних модифікацій [21, 22]. Утворення карбонільних груп у білках є загальноприйнятим маркером окисних пошкоджень [12]. Показано, що на 5-ту добу росту вміст КБ у листках гороху, які піддавались сумісному впливу 2,4-Д та обробці бульбочковими бактеріями штамів RRL8 та 245a, був на 51 і 62%, відповідно, більший, порівняно з таким у рослин, вирощених на середовищі тільки з гербіцидом (таблиця). Окрім того, за одночасної дії 2,4-Д та бактеріальної обробки *R. leguminosarum* 245a, вміст КБ у листках перевищував такий у рослин контрольної групи на 62%. Такий ефект, ймовірно, зумовлений посиленням генерації АФК в умовах сумісної дії ефекторів та інтенсифікації вільнорадикального окислення білків. У 15-ти денних рослин, насіння яких піддавалось інокуляції штамом RRL8 та 245a, вміст карбонільних груп білків був нижчий порівняно з контролем на 38 та 68%, відповідно.

Таблиця. Вміст карбонільних груп білків і ТБК-активних продуктів у листках гороху за сумісного впливу гербіциду 2,4-Д та передпосівної інокуляції азотфіксуючими бактеріями

Варіант досліду	Вміст КБ, нмоль/мг білка	Концентрація ТБКАП, нмоль/г сирової маси
5-ти добові рослини		
Контроль	2,74 ± 0,47	58,0 ± 4,2
0,1 мкМ 2,4-Д	2,75 ± 0,28	59,3 ± 5,3
RRL8	3,31 ± 0,29	46,0 ± 3,0
2,4-Д + RRL8	4,14 ± 0,49 ^b	51,5 ± 3,0
245a	2,68 ± 0,15	47,7 ± 3,6
2,4-Д + 245a	4,45 ± 0,55 ^{abde}	50,5 ± 3,1
10-ти добові рослини		
Контроль	2,45 ± 0,15	44,3 ± 2,3
0,1 мкМ 2,4-Д	2,43 ± 0,23	42,8 ± 2,3
RRL8	2,28 ± 0,14	46,4 ± 3,5
2,4-Д + RRL8	2,36 ± 0,17	47,5 ± 3,8
245a	1,96 ± 0,12	40,8 ± 2,1 ^c
2,4-Д + 245a	2,28 ± 0,23	44,2 ± 2,0
15-ти добові рослини		
Контроль	3,31 ± 0,34	34,1 ± 1,6
0,1 мкМ 2,4-Д	2,86 ± 0,20	38,3 ± 1,6
RRL8	2,39 ± 0,20 ^a	40,5 ± 3,3
2,4-Д + RRL8	2,96 ± 0,25	36,3 ± 2,2
245a	1,97 ± 0,11 ^{abd}	39,6 ± 2,5
2,4-Д + 245a	2,72 ± 0,23 ^e	50,0 ± 3,6 ^{abcde}

Примітки: ^aВірогідно відмінне від відповідного значення контрольної групи, ^b2,4-Д, ^cRRL8, ^dRRL8+2,4-Д, ^e245a з $P < 0,05$. (n = 3)

З літератури відомо, що за дії різних токсичних чинників, в тому числі гербіцидів, у клітинах відбувається зростання вмісту ТБК-активних сполук, які є маркерами оксидативного стресу [23]. Раніше було показано, що гербіцидна обробка 2,4-Д призводить до активації ПОЛ і порушень метаболічних процесів у репродуктивних органах кукурудзи [24]. В дослідженнях Romero-Puertas та колег, також описане підвищення вмісту ТБКАП за дії на рослини гороху 2,4-Д [7]. Однак, у проведених нами експериментах, застосування 2,4-Д не призводило до змін концентрації ТБКАП у листках гороху (таблиця). Виняток становили 15-ти денні рослини, які піддавались інокуляції штамом 245a та виро-

щені на середовищі з 2,4-Д, де концентрація ТБКАП була більшою за таку в рослин контрольної групи і рослин, вирощених на середовищі тільки з гербіцидом, на 61 та 31%, відповідно.

У підтримці нормального рівня H_2O_2 в клітині першочергову роль відіграють каталаза та пероксидаза. Показано, що вирощування гороху на середовищі з гербіцидом 2,4-Д і обробка бульбачковими бактеріями не впливали на активність каталази (рис. 1). Наші дані узгоджуються з такими інших дослідників, в експериментах яких показано, що гербіцид 2,4-Д також не впливав на активність каталази у листках гороху [3, 7].

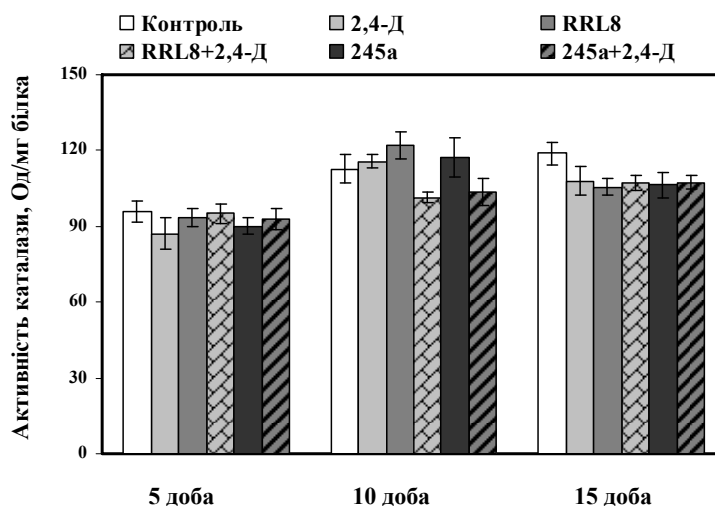


Рис. 1. Активність каталази у листках гороху за сумісного впливу бактеріальної обробки та гербіциду 2,4-Д

З рис. 2 видно, що на 10-ту добу росту, у рослин, вирощених на середовищі з 2,4-Д, активність гваякол-пероксидази була вищою, за таку в контролі на 24%. Дослідженнями Romero-Puertas та колег також описане зростання активності ГПО у гороху в два рази за дії 2,4-Д [7]. Інокуляція бактеріями штаму RRL8 призводила до підвищення активності ГПО відносно контролю на 26%. У рослин, які піддавались сумісному впливу азотфіксу-

ючих бактерій та гербіциду 2,4-Д, активність ГПО була більшою за таку в рослин контрольної групи на ~30%. Підвищення активності ГПО, за використаних нами умов, показує ключову роль даного ферменту у знешкодженні АФК, здійснюючи при цьому компенсаторну функцію в умовах відсутності змін активності каталази. Отже, сумісна гербіцидна дія та обробка симбіотичними азотфіксаторами зумовлює підвищення вмісту карбоні-

льних груп білків. В цей момент рослинний організм переходить у стан захисту, індукуючи відповідні захисні механізми. Саме цим можна пояснити зміни активності

ГПО, які спрямовані на зниження інтенсивності оксидативного стресу та формування стійкості рослин.

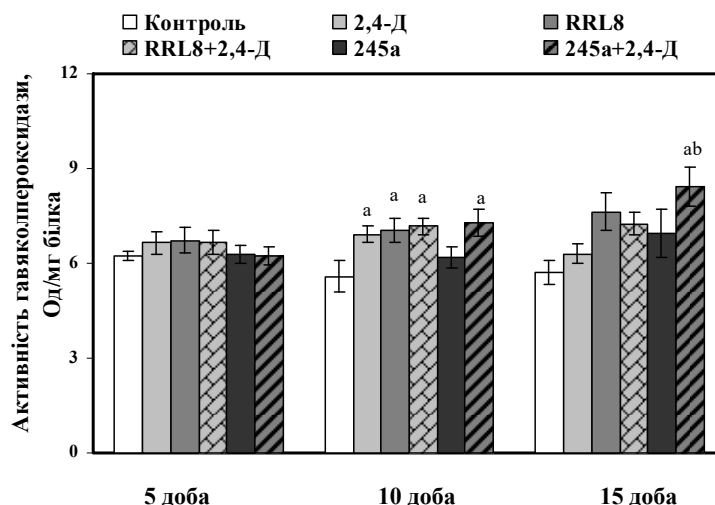


Рис. 2. Активність гваякопероксидази у листках гороху за сумісного впливу бактеріальної обробки та гербіциду 2,4-Д

Примітки: ^aВірогідно відмінне від відповідного значення контрольної групи, ^b2,4-Д з $P < 0,05$. ($n=3$)

Висновки: Таким чином, показано, що на початкових етапах росту рослин за одночасної дії 2,4-Д та бактеріальної обробки бульбочковими бактеріями, вміст КБ у листках гороху, перевищував такий у рослин, вирощених на середовищі тільки з гербіцидом, що ймовірно зумовлене посиленням генерації АФК в умовах сумісної дії ефektorів та інтенсифікації вільнорадикального окислення білків. Вирощування гороху на середовищі з гербіцидом 2,4-Д і обробка бульбочковими бактеріями не впливали на активність каталази, проте призводили до підвищення активності ГПО, що за використаних нами умов, доводить ключову роль цього ферменту у знешкодженні АФК, зниженні інтенсивності оксидативного стресу та формуванні стійкості рослин.

Список використаних джерел

- Карпенко В.П. Фізіологічні зміни в рослинах ячменю ярого за дії біологічно активних речовин / В.П. Карпенко, Р.М. Питуляк // Вісник Уманського національного університету садівництва. – 2014. – Т. 1. – С. 60–65.
- Maire M.A. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid: effects on Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation, c-Myc expression, DNA damage and apoptosis / M. A. Maire, C. Rast, Y. Landkocz, P. Vasseur // Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. – 2007. – Vol. 631, N 2. – P. 124–136. Available from: <http://www.sciencedirect.com>
- Pazmino D.M. Differential response of young and adult leaves to herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in pea plants: role of reactive oxygen species / D.M. Pazmino, M.A.R.I.A. Rodriguez-Serrano, M.C. Romero-Puertas [et al.] // Plant, cell and environment. – 2011. – Vol. 34, N 11. – P. 1874–1889. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- Matviishyn T.M. Tissue-specific induction of oxidative stress in goldfish by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid: Mild in brain and moderate in liver and kidney / T.M. Matviishyn, O.I. Kubrak, V.V. Husak [et al.] // Environmental toxicology and pharmacology. – 2014. – Vol. 37, N 2. – P. 861–869. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- Яблонская Е.К. Антидотная активность композиции препаратов Фуrolан и Метинин к гербициду 2,4-Д / Е.К. Яблонская, В.В. Котляров // Научный журнал КубГАУ. – 2014. – Т. 2, № 96. – С. 1–14.
- Яблонская Е.К. Антидоты гербицидов сельскохозяйственных культур / Е.К. Яблонская, В.В. Котляров, Ю.П. Федупов // Научный журнал КубГАУ. – 2013. – Т. 94 – С. 1–10.
- Romero-Puertas M.C. Reactive oxygen species: mediated enzymatic systems involved in the oxidative action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid / M.C. Romero-Puertas, I. McCarthy, M. Gomez [et al.] // Plant, Cell and Environment. – 2004. – Vol. 27, N 9. – P. 1135–1148. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- Song Y. Insight into the mode of action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as an herbicide / Y. Song // Journal of integrative plant biology.

– 2014. – Vol. 56, N 2. – P.106–113. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

9. Wafa T. Oxidative stress induced by the 2,4-dichlorophenoxyacetic herbicide / T. Wafa, C. Ikbal, H. Mohamed, N. Amel // INTECH Open Access Publisher. – 2012. – P. 115–130. Available from: <http://www.intechopen.com>.

10. Pazmino D.M. Regulation of epinasty induced by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in pea and Arabidopsis plants / D.M. Pazmino, M. Rodriguez-Serrano, M. Sanz et al.] // Plant Biology. – 2014. – Vol. 16, N 4. – P. 809–818. from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

11. Moller I.M. Oxidative modifications to cellular components in plants / I.M. Moller, P.E. Jensen, A. Hansson // Annual Review of Plant Biology. – 2007. – Vol. 58. – P. 459–481. from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

12. Лушак В.И. Свободнорадикальное окисление белков и его связь с функциональным состоянием организма / В.И. Лушак // Биохимия. – 2007. – № 8. – С. 995–1017.

13. Стамбульська У.Я. Вплив біхромату калію на фізіолого-біохімічні показники рослин гороху / У.Я. Стамбульська // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Проблеми регуляції фізіологічних функцій. – 2015. – № 18. – С. 64–68.

14. Semchuk N.M. Inactivation of genes, encoding tocopherol biosynthetic pathway enzymes results in oxidative stress in outdoor grown *Arabidopsis thaliana* / N.M. Semchuk, O.V. Lushchak, J. Falk [et al.] // Plant Physiology Biochemistry. – 2009. – Vol. 47. – P. 384–390. Available from: <http://www.sciencedirect.com>

15. Lenz A.-G. Determination of carbonyl groups in oxidatively modified of proteins by reduction with tritiated sodium borohydride / A.-G. Lenz, U. Costabel, S. Shaltiel, R.L. Levine // Analytical Biochemistry. – 1989. – Vol. 177. – P. 419–425. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

16. Heath R.L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation / R.L. Heath, L. Packer // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 1968. – Vol. 125. – P. 180–198. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

17. Aebi H. Catalase in vitro / H. Aebi // Methods Enzymology. – 1984. – Vol. 105. – P. 121–126. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

18. Ghamasari L. Kinetics properties of guaiacol peroxidase activity in *Crocus sativus* L. corm during rooting / L. Ghamasari, E. Keyhani, S. Golkhoo // Iranian Biomedical Journal. – 2007. – Vol. 11. – P. 137–146. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

19. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // Analytical Biochemistry. – 1976. – Vol. 72. – P. 289–292. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

20. Ali M.B. Effects of temperature on oxidative stress defense systems, lipid peroxidation and lipoxygenase activity in *Phalaenopsis* / M.B. Ali, E.J. Hahn, K.Y. Paek // Plant Physiology Biochemistry. – 2005. – Vol. 43. – P. 213–223. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

21. Rinalducci S. Redox proteomics: basic principles and future perspectives for the detection of protein oxidation in plants / S. Rinalducci, L. Murgiano, L. Zolla // Journal of Experimental Botany. – 2008. – Vol. 59. – P. 3781–3801. Available from: <http://jxb.oxfordjournals.org>

22. Барабой В.А. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов / В.А. Барабой // Успехи современной биологии. – 1991. – Т. 111, № 6. – С. 923–932.

23. Ali S. Effect of chromium and nitrogen form on photosynthesis and anti-oxidative system in barley / S. Ali, M.A. Farooq, M.M. Jahangir [et al.] // *Biologia plantarum*. – 2013. – Vol. 57, N. 4. – P. 758–763. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

24. Россихина Г.С. Влияние гербицидной обработки на липопероксидацию и системы її регулювання в зерні кукурудзи / Г.С. Россихина, О. Вінниченко // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2004. – Вип. 37. – С. 227–231.

Надійшла до редколегії 18.11.15

У. Стамбульская, соискатель, Н. Мосийчук, канд. биол. наук

Прикарпатский национальный университет имени Василя Стефаника, Ивано-Франковск, Украина

ВЛИЯНИЕ ГЕРБИЦИДА 2,4 ДИХЛОРФЕНОКСИУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ И АЗОТФИКСИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ РАСТЕНИЙ ГОРОХА

Изучено влияние гербицида 2,4-Д на некоторые биохимические показатели в листьях растений гороха сорта Альфа. Одновременное влияние 2,4-Д и азотфиксирующих клубеньковых бактерий вызывало повышение содержания карбонильных групп белков в листьях гороха, по сравнению с таковым у растений без бактериальной обработки. Показано, что в условиях совместного действия эф- фекторов на растения гороха ключевую роль в обезвреживании АФК и снижении интенсивности окислительного стресса играет гваяколпероксидаза.

Ключевые слова: горох, 2,4-Д, каталаза, гваяколпероксидаза.

U.Stambulska, researcher, N. Mosiichuk, PhD.

Precarpathian National University named after Vasyl Stefanyk, Ivano-Frankivsk, Ukraine

EFFECT OF 2,4 DICHLOROPHENOXYACETIC ACID HERBICIDE AND NITROGEN-FIXING BACTERIA ON BIOCHEMICAL PARAMETERS OF PEA PLANTS

The effect of 2,4-D herbicide was studied on several biochemical parameters in leaves of pea plants cultivar Alpha. Combined effect of 2,4-D and nitrogen-fixing nodule bacteria resulted to increase the concentration of carbonyl protein groups in pea leaves compared to plants with no bacterial treatment. There was shown that guaiacol peroxidase play a key role in the ROS deactivation and decrease of intensity of oxidative stress under combined action on pea plants effectors.

Keywords: pea, 2,4-D, catalase, guaiacol peroxide.

УДК 57.023+57.04+577.171.5

О. Ларичева, викладач

Миколаївський національний університет імені В.О. Сухомлинського, Миколаїв,

О. Цебржинський, д-р біол. наук

Полтавський національний педагогічний університет імені В. Г. Короленка, Полтава

ВИЛЬНОРАДИКАЛЬНІ ТА АНТИОКСИДАНТНІ ПРОЦЕСИ В ЛЕГЕНЯХ ЗА УМОВ РІЗНИХ СВІТЛОВИХ РЕЖИМІВ

Досліджено зміни показників вільнорадикального та антиоксидантного процесів в легенях щурів за умов різних світлових режимів. Встановлено, що тривала світлова експозиція викликала збільшення концентрації дієнових кон'югатів на 19% ($p<0,01$) та зменшення концентрації оксидів на 37% ($p<0,05$). При цьому спостерігалось незначне зниження каталазної активності ($p<0,01$) та вмісту α -токоферолу на 29% ($p<0,05$), а також гіпотрофія досліджуваних органів та зменшення масового коефіцієнту легень експериментальних тварин. Тривала світлова депривація та екзогенний мелатонін викликали зміни процесів пероксидації в тканинах легень, внаслідок чого спостерігалось вірогідне збільшення концентрації дієнових кон'югатів на 29% ($p<0,01$) та зниження концентрації оксидів на 41% ($p<0,05$), а також підвищення продукції супероксиду ($\cdot O_2$) в гомогенаті тканин легень щурів експериментальної групи від мітохондріального електронно-транспортного ланцюга на 56% ($p<0,01$) та від фагоцитів тканин – у 3 рази ($p<0,05$). За умов довготривалої темряви та екзогенного мелатоніну вірогідно зменшилася глутатіонпероксидазна активність на 24% ($p<0,01$) та вміст α -токоферолу – на 34% ($p<0,05$). Таким чином, в ході дослідження виявлені зміни у прооксидантно-антиоксидантному гомеостазі легень як в умовах нестачі, так і надлишку мелатоніну.

Ключові слова: мелатонін, легені, вільнорадикальне окиснення ліпідів, антиоксидантний захист.

Вступ. Дослідження впливу мелатоніну (МТ) на різні органи організму людини та тварин є актуальною проблемою, оскільки основний гормон шишкоподібної залози має поліфункціональні ефекти [1].

Поліфункціональність МТ зумовлена наявністю його рецепторів в різних утвореннях головного мозку, ендокринних залоз, починаючи з гонад й закінчуючи наднирниками. Значна кількість спеціалізованих рецепторів знайдена й в клітинах самого епіфізу.

На утворення МТ значно впливає ряд зовнішніх та внутрішніх факторів. Особливо значущим є тривалість фотоперіоду, оскільки величина секреції знаходиться в оберненій залежності від тривалості світлового дня. У випадку інверсії світлового режиму через декілька діб змінюється й добова динаміка рівня МТ.

Мелатонін є одним з найпотужніших ендогенних антиоксидантів [2]. Його антиоксидантна активність визначена в усіх клітинних структурах, включаючи ядро. Мелатонін здатен як зв'язувати вільні радикали, так і стимулювати активність антиоксидантних ферментів, проявляючи протекторні властивості стосовно вільнорадикального ушкодження ДНК, білків та ліпідів.

Доведені антиоксидантні ефекти МТ в різних органах в нормі та патології [3, 4], але данні про антиоксидантну активність мелатоніну в легенях нечисленні. Тому метою роботи було дослідження стану прооксидантно-антиоксидантної системи в легенях щурів в умовах 30-добової нестачі та надлишку МТ.

Матеріали і методи. У дослідженні використовували щурів лінії Wistar масою 240-260 г, яких утримували в стандартних умовах виварію. Для дослідження відби-

рали саме самців, оскільки рівень мелатоніну в плазмі крові у самиць залежить від фази менструального циклу [5]. Тварини були рандомізовані на три групи по 7 тварин: інтактна група, 30-добова гіпофункція та 30-добова гіперфункція епіфізу.

Гіпофункцію епіфізу викликали цілодобовим освітленням інтенсивністю 1000-1500 Лк двома лампами з обох боків клітки впродовж 30 діб [6]. Гіперфункцію пінеальної залози моделювали шляхом утримання тварин в умовах постійної темряви та введенням внутрішньошлунково розчину мелатоніну (Sigma, США) у дозі 1,0 мг/кг маси тіла.

Евтаназію щурів проводили згідно з нормами біоетики у відповідності до положень "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для наукових експериментів та інших наукових цілей" (Страсбург, 1986), а також "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах", ухвалених першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001). Легені видалялися, перфузувалися розчином 0,9% хлориду натрію та визначалася їх вага. Далі визначали масовий коефіцієнт легень за формулою: загальна маса органів / вага тварини × 100%.

Для оцінки інтенсивності процесів пероксидації в гомогенатах органів визначали вміст первинних і вторинних її продуктів: дієнових кон'югатів (ДК), оксидієнів, трієнів та ТБК-активних продуктів. Ефективність антиоксидантного захисту легень оцінювалася за активністю супероксиддисмутази (СОД), каталази (КТ), глутатіонпероксидази (ГПО) та концентрацій вітамінів А, α-токоферолу та β-каротину.

Продукцію активних форм Оксигену (АФО) оцінювали за вмістом супероксиду. Продукцію супероксиду в гомогенатах тканин визначали за реакцією з нітросинім тетразолієм (НСТ), який перетворюється на диформазан й виражали у нмоль на г тканини за секунду інкубації [7] під впливом НАДН, НАДФН, пірогенала.

Концентрацію дієнових кон'югатів визначали за методом І.Д. Стальної (1977) [8]. У ході перекисного окиснення на стадії утворення вільних радикалів в молекулах поліненасичених вищих жирних кислот виникає система спряжених подвійних зв'язків, що супроводжується появою нового максимуму у спектрі поглинання при 233 нм. Концентрацію дієнових кон'югатів розраховували з використанням молярного коефіцієнту екстинкції $2,2 \times 10^{-5} \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$ й виражали у ммоль/г.

Концентрацію ТБК-активних продуктів визначали за методом І.Д. Стальної, Т.Г. Гарішвілі (1977) за реакцією з 2-тіобарбітуровою кислотою, яка при нагріванні у кислому середовищі з альдегідами утворює триметиновий комплекс з максимумом поглинання при 532 нм [8]. Концентрацію ТБК-реактивних продуктів розраховували, використовуючи молярний коефіцієнт екстинкції $1,56 \times 10^{-5} \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$ й виражали у мкмоль/г.

Каталазну активність визначали за методом М.О. Корольок із співавторами (1988), який ґрунтується на здатності пероксиду Гідрогена утворювати з солями Молібдену стійкий забарвлений комплекс [9]. Активність ферменту розраховували, використовуючи молярний коефіцієнт екстинкції $22,2 \times 10^3 \text{ ММ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ й виражали у мкат/кг.

Супероксиддисмутазну активність визначали кінетично за реакцією аутоокислення адреналіну у лужному середовищі з генерацією супероксиданіонрадикалу [10]. Адреналін здатний до реакції аутоокислення у лужному середовищі з генерацією супероксиданіонрадикалу, причому ця реакція протікає з певною швидкістю. У присутності СОД ця швидкість зменшується до деякого значення, що залежить від активності СОД. Порівняння швидкостей дає змогу судити про супероксиддисмутазну активність у дослідному зразку біоматеріалу. Ферментативну активність виражали в умовних одиницях. За одиницю активності приймали кількість ферменту, необхідного для 50% інгібування окислення адреналіну в адренохром впродовж 1 хвилини.

Глутатіонпероксидазну активність визначали за методом В.О. Пахомової із співавторами з використанням як субстрату гідроперексиду третбутилу [11]. Ферментативну активність виражали в мкат/кг. При розрахунках враховували розведення проб та термін інкубації.

Загальну протеолітичну активність визначали за гідролізом казеїну, при цьому нерозщеплений казеїн відділявся за допомогою трихлороцтової кислоти, а продукти розщеплення (вільні амінокислоти та олігопептиди) визначалися за допомогою реактиву Фоліна [12]. Активність ферменту розраховували, враховуючи коефіцієнт переводу величини екстинкції в мікромолі тирозину, й виражали в мкат/кг.

Концентрацію трієнів, оксидієнів, α-токоферолу, вітаміну А та β-каротину визначали за модифікованою методикою з урахуванням молярного коефіцієнту екстинкції [13].

Статистичну обробку проводили за допомогою програми Microsoft Office Excel 2003.

Перевірку на нормальний розподіл проводили з використанням критерію W Шапіро-Уїлка. Оцінку достовірності різниці між групами з нормальним розподілом ознак проводили з використанням t-критерію Ст'юдента. При порівнянні двох груп з вільним розподілом ознак використовували непараметричний U-критерій Уїлкоксона (Манна-Уїтні). Розходження вважали статистично значущими при $p < 0,05$ [14, 15].

Результати та їх обговорення. У тварин, які знаходились в умовах постійного освітлення впродовж 30 діб, масовий коефіцієнт легень був достовірно меншим ($p < 0,01$), ніж у інтактних тварин внаслідок гіпотрофії досліджуваних органів та збільшення маси тіла внаслідок тривалої світлової експозиції (табл. 1).

Таблиця 1. Масовий коефіцієнт легень в умовах тридцятидобового освітлення ($M \pm m$, $n=7$)

Група	Легеневий індекс (%)
Інтакт	$0,571 \pm 0,035$
30-добова гіпофункція епіфізу та гіпомелатонінемія	$0,439 \pm 0,018^*$

Примітки: * – $p < 0,01$ у порівнянні з інтактною групою

Оцінюючи рівень та джерела генерації супероксиду в гомогенаті тканин експериментальної групи ви-

явлено деяке зростання його вмісту за абсолютними, але ці зміни не були достовірно значущими (рис. 1).

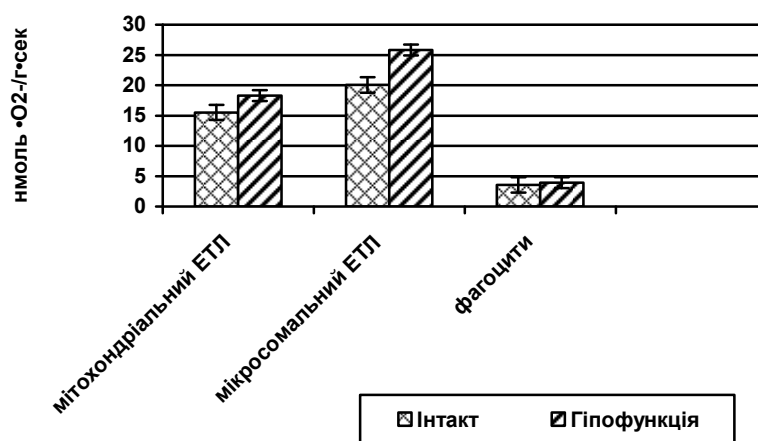


Рис. 1. Концентрація супероксиду в гомогенаті легень при гіпофункції епіфізу

У щурів з хронічним зниженням активності епіфізу спостерігалася зміна концентрації деяких первинних продуктів пероксидації в гомогенаті легень у порівнянні з інтактною групою: збільшення концентрації дієнових

кон'югатів 19% ($p < 0,01$) та зменшення концентрації оксидів на 37% ($p < 0,05$). Достовірної різниці між концентрацією триєнів та ТБК-активних речовин між двома групами не виявлено (табл. 2).

Таблиця 2. Біохімічні параметри окисно-антиоксидантної системи легень в умовах довготривалої гіпофункції епіфізу ($M \pm m$, $n=7$)

Показники	Група	Інтакт	30-добова гіпофункція
Дієнові кон'югати (ммоль/кг)		11,170 $\pm$ 0,299	13,310 $\pm$ 0,745*
Трієни (мкмоль/кг)		112,489 $\pm$ 24,798	55,641 $\pm$ 19,608
Оксидів (мкмоль/кг)		425,119 $\pm$ 56,432	267,892 $\pm$ 41,639**
ТБК-активні продукти (мкмоль/г)		9,816 $\pm$ 1,104	12,750 $\pm$ 2,131
Каталазна активність (мкат/кг)		6,570 $\pm$ 0,069	5,957 $\pm$ 0,180*
Супероксиддисмутазна активність (ум.од./г за хв.)		0,176 $\pm$ 0,036	0,207 $\pm$ 0,044
Глутатіонпероксидазна активність (мкат/кг)		7,380 $\pm$ 1,009	5,250 $\pm$ 0,626
Загальна протеолітична активність (мкат/кг)		60,160 $\pm$ 10,950	65,600 $\pm$ 11,090
Вітамін А (мкмоль/кг)		565,071 $\pm$ 87,429	376,684 $\pm$ 41,367
β -каротин (мкмоль/кг)		229,143 $\pm$ 36,281	154,279 $\pm$ 16,454
α -токоферол (мкмоль/кг)		467,712 $\pm$ 46,931	333,605 $\pm$ 29,122**

Примітки: * – $p < 0,01$ у порівнянні з інтактною групою; ** – $p < 0,05$ у порівнянні з інтактною групою

Тривале освітлення призвело до незначного зниження каталазної активності в гомогенаті досліджуваних органів щурів у порівнянні з інтактними тваринами без зміни супероксидазної, глутатіонпероксидазної та загальної протеолітичної активності. Серед нефермен-

тативних антиоксидантів спостерігалася достовірне зниження вмісту α -токоферолу на 29% ($p < 0,05$).

На відміну від тривалого освітлення, 30-добовий надлишок мелатоніну не вплинув на масовий коефіцієнт досліджуваних органів (табл. 3).

Таблиця 3. Масовий коефіцієнт легень тварин в умовах тридцятидобового надлишку мелатоніну ($M \pm m$, $n=7$)

Група	Легеневий індекс (%)
Інтакт	0,571 $\pm$ 0,035
30-добова гіперфункція епіфізу та гіпермелатоніємія	0,511 $\pm$ 0,023

Гіперфункція епіфізу разом з гіпермелатоніємією викликала підвищення продукції супероксиду ($\bullet O_2^-$) в гомогенаті тканин легень щурів експериментальної гру-

пи від мітохондріального електронно-транспортного ланцюга на 56% ($p < 0,01$) та від фагоцитів тканин – у 3 рази ($p < 0,05$) (рис. 2).

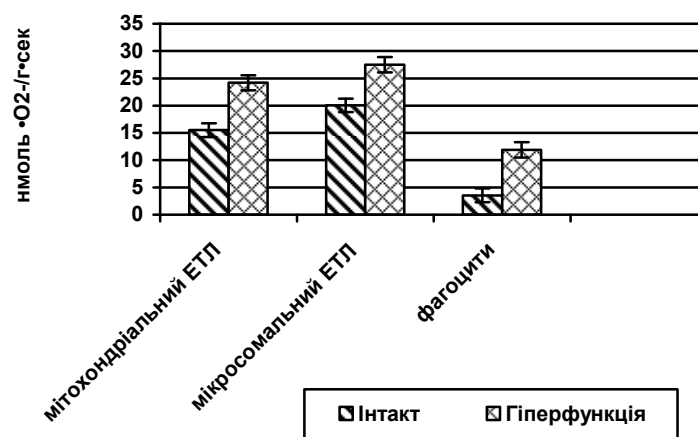


Рис. 2. Концентрація супероксиду в гомогенаті легень при гіперфункції епіфізу та гіпермелатоніемії

Тривала світлова депривація та екзогенний мелатонін викликали зміни процесів пероксидації в тканинах легень, внаслідок чого спостерігалось вірогідне збільшення кон-

центрації дієнових кон'югатів на 29% ($p < 0,01$) та зниження концентрації оксидів на 41% ($p < 0,05$) (табл. 4).

Таблиця 4. Біохімічні параметри окисно-антиоксидантної системи легень в умовах довготривалої гіперфункції епіфізу та гіпермелатоніемії ($M \pm m$, $n=7$)

Показники	Група	Інтакт	30-добова гіперфункція епіфізу
Дієнові кон'югати (ммоль/кг)		11,170±0,299	14,440±0,607*
Трієни (мкмоль/кг)		112,489±24,798	53,658±13,594
Оксидів (мкмоль/кг)		425,119±56,432	249,588±40,289**
ТБК-активні продукти (мкмоль/г)		9,813±1,104	15,460±3,203
Каталазна активність (мкат/кг)		6,570±0,069	6,327±0,080
Супероксиддисмутазна активність (ум.од./г за хв.)		0,176±0,036	0,177±0,041
Глутатіонпероксидазна активність (мкат/кг)		7,380±1,009	5,633±1,195*
Загальна протеолітична активність (мкат/кг)		60,160±10,950	108,500±30,650
Вітамін А (мкмоль/кг)		565,071±87,429	401,658±41,660
β-каротин (мкмоль/кг)		229,143±36,281	154,055±19,355
α-токоферол (мкмоль/кг)		467,712±46,931	306,948±29,143**

Примітки: * – $p < 0,01$ у порівнянні з інтактною групою; ** – $p < 0,05$ у порівнянні з інтактною групою

За умов довготривалої темряви та екзогенного мелатоніну вірогідно зменшилася глутатіонпероксидазна активність на 24% ($p < 0,01$), вміст α-токоферолу знизився на 34 % ($p < 0,05$). Зміни активності інших ферментів та концентрація вітамінів відбувалися тільки за абсолютними значеннями й не мали статистичної достовірності.

Таким чином, тривала світлова експозиція викликала значні порушення балансу прооксидантно-антиоксидантної системи (ПАС) легень у бік активації перекисного окиснення ліпідів без зміни ферментативної активності та зниження вмісту α-токоферолу. При цьому спостерігалася гіпотрофія досліджуваних органів та зменшення масового коефіцієнту легень експериментальних тварин. Відсутність змін у активності антиоксидантних ферментів цілком закономірна, оскільки активність каталази індукується на генному рівні перексидом Гідрогену або мелатоніном, тому можливо припустити, що в умовах дефіциту мелатоніну продукція перексиду Гідрогену залишилася без змін. Також можливо, що каталазна та супероксиддисмутазна активності взаємопов'язані, тому що СОД продукує субстрат для каталази, а остання регенерує Оксиген для клітини [16]. Зростання активації утворення дієнових кон'югатів (гид-

роперекисей ліпідів) призвело до зменшення резервів токоферолу як інактиватора ліпоперекисей.

Тривала світлова депривація та екзогенний мелатонін також викликали посилення процесів пероксидації в тканинах легень, що виявилось у достовірному збільшенні вмісту дієнових кон'югатів та супероксидного радикалу. Зниження активності ГПО, можливо пов'язано з тим, що в даному випадку мелатонін (екзогенний та ендогенний) міг виступати як прямий антиоксидант, який безпосередньо інактивує супероксид, та як адаптоген, який регулює вільнорадикальний гомеостаз організму [17, 18].

Висновки:

Отримані результати свідчать, що тривала нестача мелатоніну викликає в легенях порушення вільнорадикального та антиоксидантного гомеостазу у бік активації процесів пероксидації й зниження антиоксидантного захисту. Гіперфункція епіфізу призвела до збільшення генерації АФО та утворення первинних продуктів перекисного окиснення ліпідів. Зниження активності антиоксидантних ферментів в умовах експериментальної гіперфункції епіфізу може компенсуватися мелатоніном як ендогенного, так і екзогенного походження.

Перспективи подальших досліджень полягають у визначенні впливу мелатоніну на прооксидантно-антиоксидантну систему легень в умовах оксидативного стресу.

Список використаних джерел

1. Tan D.-X. Melatonin: A hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin / D.-X. Tan, L.C. Manchester, R. Hardeland [at all] // Journal Pineal Research. – 2003. – V. 34. – P. 75-78. [PubMed: 12485375].
2. Tan D.-X. Melatonin as a Potent and Inducible Endogenous Antioxidant: Synthesis and Metabolism / D.-X. Tan, L.C. Manchester, E. Esteban-Zubero [at all] // Molecules. – 2015. – V 20(10). – P. 18886-18906.
3. Yang Yang. A review of melatonin as a suitable antioxidant against myocardial ischemia-reperfusion injury and clinical heart diseases / Yang Yang, Yang Sun, Wei Yi, Yue Li [at all] // Journal Pineal Research – 2014. – V. 57(4). – P. 357-366.
4. Akinci A. Melatonin is more effective than ascorbic acid and β -carotene in improvement of gastric mucosal damage induced by intensive stress / A. Akinci, M. Esrefoglu, A. Cetin, B. Ates // Archives of Medical Science. – 2015. – V. 11(5). – P. 1129-1136.
5. Пішак В.П. Шишкоподібне тіло і біохімічні основи адаптації / В.П. Пішак – Чернівці : Медакадемія, 2003. – 152 с.
6. Бондаренко Л.О. Спосіб моделювання інволютивних процесів у пінеальній залозі / Л.О. Бондаренко, Г.І. Губіна-Вакулик, Н.М. Сотник // Патент № 20383 UA, МПК G09B 23/28. Заявл. 04.08.06; опубл. 15.01.07, Бюл. № 1. – 8 с.
7. Цебржинский О.И. Дифференцированное спектрофотометрическое определение продукции супероксида в тканях НСТ-тестом / О.И. Цебржинский // Актуальні проблеми сучасної медицини. – Вип.1. – 2002. –Т.2. –С. 96-97.
8. Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – 392 с.
9. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы / [М.А. Королюк, Л.И. Иванова, Н.Т. Майорова, К.Е. Токарев] // Лабораторное дело. – 1988. – №1. – С. 16-18.

Е. Ларичева, преподаватель

Николаевский национальный университет им. В.А. Сухомлинского, Николаев, Украина,

О. Цебржинский, д-р биол. наук

Полтавский национальный педагогический университет им. В.Г. Короленко, Полтава, Украина

СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ И АНТИОКСИДАНТНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ЛЕГКИХ В УСЛОВИЯХ РАЗНЫХ СВЕТОВЫХ РЕЖИМОВ

Исследованы изменения показателей свободнорадикального и антиоксидантного процессов в легких крыс в условиях различных световых режимов. Установлено, что длительная световая экспозиция вызвала увеличение концентрации диеновых конъюгатов на 19% ($p < 0,01$) и уменьшение концентрации оксидиенов – на 37% ($p < 0,05$). При этом наблюдалось незначительное снижение активности каталазы ($p < 0,01$) и содержания α -токоферола на 29% ($p < 0,05$), а также гипотрофия исследуемых органов и уменьшение массового коэффициента легких экспериментальных животных. Длительная световая депривация и экзогенный мелатонин вызвали изменения процессов пероксидации в тканях легких, в результате чего наблюдалось достоверное увеличение концентрации диеновых конъюгатов на 29% ($p < 0,01$) и снижение концентрации оксидиенов на 41% ($p < 0,05$), а также повышение продукции супероксида ($\cdot O_2$) в гомогенате тканей легких крыс экспериментальной группы от митохондриальной электроно-транспортной цепи на 56% ($p < 0,01$) и от фагоцитов тканей – в 3 раза ($p < 0,05$). В условиях длительной темноты и экзогенного мелатонина достоверно уменьшилась активность глутатионпероксидазы на 24% ($p < 0,01$) и содержание α -токоферола – на 34% ($p < 0,05$). Таким образом, в ходе исследования выявлены изменения прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза легких как в условиях недостатка, так и избытка мелатонина.

Ключевые слова: мелатонин, легкие, свободнорадикальное окисление липидов, антиоксидантная защита.

O. Larycheva, teacher

Mykolayiv V.O. Suhomlinskiy national university, Mykolayiv, Ukraine,

O. Tsebrzhynskyy, DSc

Poltava V.G. Korolenko national pedagogical university, Poltava, Ukraine

FREE RADICAL AND ANTIOXIDANT PROCESSES IN THE LUNGS UNDER DIFFERENT LIGHT REGIMES

The changes in indicators of free radical and antioxidant processes in the lungs of rats under different lighting conditions have been investigated. It has been revealed that prolonged exposure to light caused the increase in the concentration of diene conjugates by 19% ($p < 0.01$) and the decrease in the concentration of oxididene – by 37% ($p < 0.05$). At the same time, a slight decrease in the activity of catalase ($p < 0.01$) and α -tocopherol content by 29% ($p < 0.05$) appeared, accompanied by hypotrophy of the observed organs and the decrease in the mass ratio of the experimental animals' lungs. Prolonged light deprivation and exogenous melatonin caused changes of peroxidation processes in the lung tissues, resulting in the expectable increase in concentrations of diene conjugates by 29% ($p < 0.01$) and the decrease in oxididene concentration by 41% ($p < 0.05$), and the enhancement in production of the superoxide anion radical ($\cdot O_2$) in homogenate of lung tissues of rats in the experimental group produced from mitochondrial electron transport chain by 56% ($p < 0.01$) and from tissue phagocytes – by 3 times ($p < 0.05$). Under the conditions of prolonged darkness and exogenous melatonin, glutathione peroxidase activity decreased by 24% ($p < 0.01$) and the content of α -tocopherol – by 34% ($p < 0.05$). Thus, the investigation has revealed changes in prooxidant-antioxidant homeostasis of lungs both under the condition of shortage and excess of melatonin.

Keywords: melatonin, lungs, free radical oxidation of lipids, antioxidant protection, active oxygen forms.

10. Беркало Л.В. Методы клінічних та експериментальних досліджень в медицині / Л.В. Беркало, О.В. Бобович, Н.О. Боброва та ін.; під ред. Кайдашева І.П. – Полтава : Полімет, 2003. – 320 с.

11. Пахомова В.А. Способ определения активности глутатионпероксидазы в биологических тканях / [В.А. Пахомова, Г.Н. Крюкова, Н.П. Козлянина и др.] // А.С. 922637 СССР, МКИ в G 01. Опубл. 23.04.1982. Биол. ИиО №15. – 2 с.

12. Левицкий А.П. Пищеварительные ферменты слюнных желез : автореф. дис. на соискание уч. степени канд. биол. наук : спец. 03.00.04 "Биохимия" / А.П. Левицкий. – Одесса, 1974. – 53 с.

13. Параніч А.В. Захисний ефект вітаміну Е при тотальній ішемії ізольованих органів щурів / А.В. Параніч, Ю.С. Юхнин // Физиологический журнал. – 1993. – Т.39, №1. – С.97-101.

14. Атраментова Л.О. Біометрія. Ч. І. Характеристики розподілів: Підручник / Л.О. Атраментова, О.М. Утевська. – Х. : Видавництво "Ранок", 2007. – 176 с.

15. Атраментова Л.О. Біометрія. Ч. ІІ. Порівняння груп та аналіз зв'язку: Підручник / Л.О. Атраментова, О.М. Утевська. – Х. : Видавництво "Ранок", 2007. – 176 с.

16. Панченко Л.Ф. Роль пероксидов в патологии клетки. / Л.Ф. Панченко, А.М. Герасимов, Г.Д. Антоненко. – М.: Медицина, 1981. – 200 с.

17. Попов С.С. Влияние мелатонина на свободнорадикальный гомеостаз в тканях крыс при тиреотоксикозе / [С.С. Попов, А.Н. Пашков, Т.Н. Попова и др.] // Биомедицинская химия. – 2008. – Т. 54, №1. – С. 114-121.

18. Попов С.С. Активность глутатионовой антиоксидантной системы при гипертиреозе и при действии мелатонина / [С.С. Попов, А.Н. Пашков, Т.Н. Попова, и др.] // Проблемы эндокринологии. – 2008. – Т. 54, №3. – С. 47-50.

Надійшла до редколегії 18.11.15

УДК 582.28 : 336.747

Т. Кондратюк, канд. біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

РЕГУЛЯЦІЯ РОЗВИТКУ МІКРОСКОПІЧНИХ ГРИБІВ В ПРИМІЩЕННЯХ ІЗ ЗБЕРЕЖЕННЯМ ТА ЗНИЩЕННЯМ ПАПЕРОВИХ УКРАЇНСЬКИХ БАНКНОТ

Охарактеризовано кількісний та видовий склад мікроскопічних грибів, ізольованих з проб повітря приміщень із збереження, перерахунку та знищення паперових українських банкнот: ізольовано гриби 41 виду 17 родів відділів *Zygomycota*, *Ascomycota* та групи *Anamorphic fungi*. Із застосуванням методу седиментації встановлено, що кількість колонієутворюючих одиниць мікроміцетів в 1 м³ повітря обстежених приміщень становила від 590 до 1320 КУО/м³. В пробах повітря та на зразках банківських паперів ідентифіковано види грибів, які є небезпечними для здоров'я людини: *Alternaria* sp., *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *Geotrichum candidum*, *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium* spp. та ін., а також дріжджі роду *Candida*. Після процесу брикетування знищених банківських паперів в компресорах значна частина дріжджів та мікроскопічних грибів зберігають життєздатність.

Ключові слова: умовно-патогенні мікроскопічні гриби, паперові українські банкноти.

Вступ. Мікроскопічні гриби здатні широко варіювати за морфологічними і фізіологічними характеристиками та використовувати для життєдіяльності найрізноманітніші екологічні ніші. Завдяки потужному та лабільному ферментному апарату, високій активності метаболізму, що проявляється в широкому інтервалі дії різних екологічних факторів, вони можуть швидко адаптуватися до суттєвих змін умов середовища існування. Актуальними питаннями сьогодення є, по-перше, вивчення мікроскопічних грибів у "внутрішньому середовищі" (indoor environment) існування людей (в приміщеннях, де вони мешкають або працюють), а по-друге, визначення ризиків перебування людини "в оточенні мікроскопічних грибів", які можуть негативно впливати на здоров'я (призводити до розвитку таких захворювань, як мікоалергії, мікози тощо). Серед міського населення відмічається постійний ріст числа алергічних захворювань, зумовлених впливом мікроскопічних грибів. З респіраторними симптомами мікогенної алергії пов'язують більше 80 видів грибів. Епідеміологічні та клінічні дослідження сфокусовані на таких основних видах як *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp. і *Penicillium* spp. Встановлено, що від 50 до 80% хворих на бронхіальну астму позитивно реагують на проби з антигенами плісневих грибів [1-7]. Однак нормування (регламентація) вмісту КУО мікроскопічних грибів в 1 м³ повітря розроблено тільки для низки виробничих приміщень біотехнологічного напрямку та медичних установ, зокрема для операційних та пологових блоків [8-10]. Дані літератури свідчать про вплив різних концентрацій спор плісневих грибів на розвиток алергічних захворювань у людей, що мають підвищену чутливість до мікогенних алергенів. За даними низки авторів, знаходження хворих з генетичною схильністю до atopії в приміщенні, де чисельність грибів роду *Alternaria* складає в 1 м³ повітря 80-100 колонієутворюючих одиниць (КУО), може призвести до розвитку у них нападів бронхіальної астми [11]. Критичними значеннями чисельності грибів роду *Penicillium* spp. в повітрі сирих приміщень вважаються показники 49-62, для *Cladosporium* spp. – 12-13 КУО/м³. За рекомендаціями ВООЗ та даними літератури загальні показники КУО/м³ мікроскопічних грибів в повітрі житлових приміщень, які складають 381-407 або більші за 500, запропоновано вважати небезпечними, оскільки збільшення цих показників може спричинювати стійку сенсibilізацію у людей, призводити до розвитку алергічних реакцій, нападів бронхіальної астми у осіб з генетичною схильністю до atopії [11,12].

Підвищенню епідеміологічної ролі умовно-патогенних мікроорганізмів, які часто є збудниками харчових інфекцій та різноманітних інтоксикацій, приділяється значна увага спеціалістів різних галузей [13-16]. Патогенні та умовно-патогенні мікроорганізми часто вилуча-

ють із поверхні паперових банкнот. Як свідчать дані літератури, банківські білети, які використовуються людьми при готівкових розрахунках (тобто, паперові гроші) лишаються одним з небезпечних джерел найрізноманітніших інфекцій – шкіряних, кишкових, алергічних тощо. Встановлено, що на паперових банкнотах мікроорганізмів приблизно в 10 разів більше, ніж на металевих. Забруднення різними органічними речовинами та сполуками сприяє затримці та розвитку на паперових банкнотах різноманітних мікроорганізмів. На паперових грошах було знайдено бактерії *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella* sp., *Klebsiella pneumoniae* та ін., ряд бактерій, стійких до антибіотиків, а також віруси гепатиту, грипу [17-21]. Паперові банкноти можуть бути контаміновані також умовно-патогенними та патогенними мікроскопічними грибами *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. flavipes*, *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp., *Candida albicans* та ін. [22-23].

Метою даної роботи було визначити кількісний та видовий склад мікроскопічних грибів у повітряному середовищі приміщень, в яких зберігаються, перераховуються та знищуються паперові українські банкноти, встановити видовий склад мікроскопічних грибів-контамінантів на знищених банкнотах та визначити ступінь потенційної небезпеки дослідженої мікобіоти для здоров'я людей.

Матеріали та методи досліджень Матеріалами досліджень слугували 25 проб повітря та 16 проб знищених паперових банкнот, відібрані в технологічних приміщеннях, в яких здійснюються збереження, пакування, перерахунок та знищення паперових банкнот. Дослідження мікобіоти повітря приміщень здійснювали з використанням основних положень відповідної методології [24]. Для порівняльного аналізу використовували метод седиментації колонієутворюючих одиниць (КУО) на поверхню твердих живильних середовищ (Чапека-Докса, Сабуро, картопляно-глюкозний агар). Чашки Петрі діаметром 100 мм розставляли в приміщеннях методом конверту [25] на різній висоті (80-210 см) в залежності від особливостей процесів, які там здійснюються. Розрахунок КУО в 1 м³ повітря здійснювали за допомогою відповідної формули [26]: $X = 5 \cdot a \cdot 10^4 / r^2 t$, де X – число КУО в 1 м³ повітря, a – число колоній, що виростили; r – радіус чашки Петрі, см; t – час експозиції, хв. Крім КУО мікроскопічних грибів, підраховували кількість інших мікроорганізмів (бактерій, дріжджів). Частоту трапляння видів (родів) мікроскопічних грибів визначали у відсотках як відношення числа проб, в яких даний вид (рід) траплявся, до загальної кількості проб [27]: $P = n / N \cdot 100$, (%), де n – кількість проб, в яких виявлено даний вид (рід); N – загальна кількість відібраних та досліджених проб.

Для досліджень було використано також зразки знищених (подрібнених) паперових банкнот до надходження в компресор для брикетування та зразки знищених банкнот після брикетування в компресорі. Вилучення мікроорганізмів із подрібнених банкнот здійснювали з використанням методів накопичувальної культури та змиву. У дослідженнях з банкнотами для виявлення більшого видового різноманіття грибів (для запобігання стримування росту грибів бактеріями-антагоністами) додатково використовували середовища з додаванням антибіотиків [28].

Ідентифікацію ізольованих чистих культур мікроскопічних грибів здійснювали за допомогою відповідних визначників [29-32]. При таксономічному аналізі притримувались 9-го видання Словника грибів [33]. Сучасні видові назви грибів уточнювали, використовуючи дані Індексу грибів [34].

Результати та їх обговорення. В повітрі обстежених технологічних приміщень виявлено різну кількість КУО різноманітних мікроорганізмів: мікроскопічних міцеліальних грибів, бактерій, дріжджів. Чисельність мікроорганізмів (КУО/м³) та видовий склад мікроскопічних грибів в обстежених приміщеннях різнилися в залежності від типу технологічних процесів, які в них здійснюються. Найбільшу кількість КУО/м³ встановлено безпосередньо в повітрі робочої зони пакування паперових банкнот: від 5790 до 8745 КУО/м³, з яких – 1320 та 1070 КУО/м³ мікроскопічних міцеліальних грибів, відповідно. На відстані 10-15 м від місця здійснення зазначених процесів кількість мікроорганізмів була значно меншою: від 700 до 1170, з яких від 130 до 260 КУО мікроміцетів, відповідно. Пил з поверхні мішків багаторазового використання для пакування банкнот та частинки матеріалу мотузок (шпагату), якими вони перев'язуються, слугують основним джерелом надходження у повітря робочої зони даного приміщення КУО мікроорганізмів, зокрема мікроскопічних грибів. Останні після ідентифікації віднесені до 21 виду 13 родів 2-х відділів: *Zygomycota* (*Rhizopus oryzae* Went et Prins. Geerl.), *Ascomycota*

(*Chaetomium* sp., *Eurotium herbariorum* (F.H.Wigg.) Link), групи *Anamorphic fungi* (*Acremonium strictum* W. Gams., *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., *Aspergillus ochraceus* G. Wilh., *A. niger* Tieg., *A. versicolor* (Vuill.) Tirab., *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link, *C. shaerospermum* Penc., *Geotrichum candidum* Link, *Paecilomyces variotii* Bainier, *Penicillium chrysogenum* Thom, *Penicillium* spp. (4 види), *Stemphilium botryosum* Wallr., *Trichoderma* sp., *Ulocladium alternariae* (Cooke) E.G. Simmons) та *Mycelia sterilia* (orange), що утворювали тільки вегетативний міцелій (Рис. 1 А, Б). З частотою трапляння 60% домінували у вказаному комплексі мікроскопічні гриби родів *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Ulocladium*.

В приміщенні, де здійснюється перерахунок паперових банкнот, різних за номіналом та ступенем зношеності, під час роботи спеціальних банківських машин загальна кількість мікроорганізмів в 1м³ повітря робочої зони становила від 2385 до 3580 КУО/м³ (з них 855 та 840 – мікроскопічні гриби, відповідно). Чисті культури мікроскопічних грибів, які було ізольовано з проб повітря вказаного приміщення, після ідентифікації було віднесено до 21 виду 11 родів 2-х відділів: *Zygomycota* (*Rhizopus stolonifer* var. *stolonifer* (Ehrenb.) Vuill., *Mucor hiemalis* Wehmer), *Ascomycota* (*Chaetomium globosum* Kunze) та групи *Anamorphic fungi* (*Acremonium strictum*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *A. flavus* Link, *A. versicolor*, *A. ruber* Thom et Church., *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) G.A. de Vries, *C. shaerospermum* Penc., *Cladosporium* sp., *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium* spp. (3 види), *Scopulariopsis brevicaulis* (Sacc.) Bainier, *Trichoderma viride* Pers., *Ulocladium botrytis* Preuss.) (Рис. 1 В). В пробах було виявлено також гриби, які утворювали тільки вегетативний міцелій: *Mycelia sterilia* (orange), *Mycelia sterilia* (white). За частотою трапляння серед зазначених мікроміцетів переважали представники родів *Penicillium* (100%), *Aspergillus* (71,5%), *Cladosporium* (57,2%), *Alternaria* та види відділу *Zygomycota* (по 42,5%).

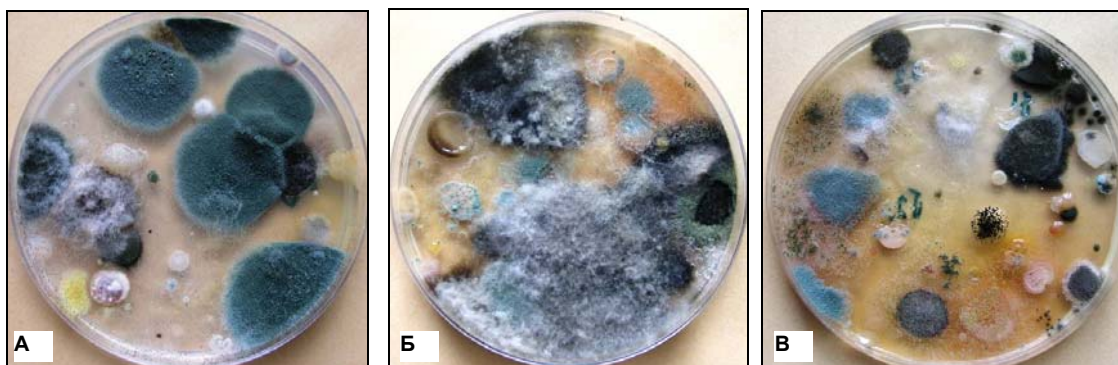


Рис. 1. Мікроскопічні гриби в пробах повітря робочої зони пакування паперових банкнот (А, Б) приміщення, в якому здійснюється перерахунок паперових банкнот (В), 14-а доба культивування (А, В – середовище Чапека-Докса, Б – картопляно-глюкозний агар)

Найменшу кількість КУО мікроорганізмів виявлено в пробах повітря, що відібрані в приміщенні, де зберігаються упаковані паперові банкноти (від 550 до 823 КУО/м³ (з них 274 та 180 КУО мікроміцетів, відповідно). Мікобіота повітря даного приміщення характеризувалась також найменшим видовим різноманіттям: в пробах виявлено гриби 4-х видів (*Aspergillus versicolor*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium* sp., *Rhizopus stolonifer* var. *stolonifer*).

З урахуванням особливостей системи грошових розрахунків в Україні, коли дуже велику частину займає

готівковий обіг, строк "життя" грошей за рахунок значного забруднення дуже короткий: за рік банкноти здійснюють в середньому сім-вісім оборотів через банківську систему. Найшвидше зношуються банкноти низьких номіналів, які постійно знаходяться в активному використанні. Прискоренню зношення паперових банкнот сприяє занадто низька культура населення ряду країн в поводженні з грошми – їх зминають, забруднюють руками (особливо під час розрахунків на продуктових ринках) тощо [35]. Непридатні для подальшого використання паперові банкноти піддаються процесам знищення

та формування в брикети в компресорах за температури $+80^{\circ}\text{C}$. В приміщенні, в яке надходять знищені банкноти показники кількості мікроорганізмів в 1м^3 повітря становили в середньому 860 КУО/м^3 (серед яких – 426 КУО мікроміцетів). Мікобіота вказаного приміщення була представлена 13-ма видами 9 родів відділу *Zygomycota* (*Rhizopus stolonifer* var. *stolonifer*) та грибів групи *Anamorphic fungi* (*Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *A. versicolor*, *Botrytis cinerea* Pers., *Cladosporium herbarum*, *C. macrocarpum* Preuss, *C. shaerospermum*, *Geotrichum candidum*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium aurantiogriseum* Dierckx, *Penicillium* spp. (2 види), *Ulocladium botrytis*). За частотою трапляння в пробах повітря даного приміщення домінували представники родів *Cladosporium* (100%) та *Penicillium* (60%). В пробах пилу із накривок контейнерів із брикетами знищених банкнот виявлено переважання темнопигментова-

них грибів роду *Cladosporium* та суцільний ріст *Rhizopus stolonifer* var. *stolonifer*.

В результаті проведених досліджень встановлено, що банкнотні папери різного номіналу контаміновані різноманітними мікроорганізмами – грибами, бактеріями, дріжджами. В пробах знищених банкнот виявлено мікроскопічні гриби (*Aspergillus niger*, *A. ochraceus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Mucor hiemalis*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium* sp., *Rhizopus stolonifer*, *Ulocladium* sp.), дріжджі родів *Candida* та *Rhodotorula*, бактерії. Нами встановлено, що після процесу брикетування знищених банкнотних паперів в компресорах (за температури $+80^{\circ}\text{C}$) значна частина мікроорганізмів зберігають свою життєздатність (*A. niger*, *C. cladosporioides*, *Mycelia sterilia* (white), *Paecilomyces variotii*, *Penicillium* spp., *Candida* sp., *Rhodotorula* sp., спорутоутворювальні бактерії) (рис. 2).

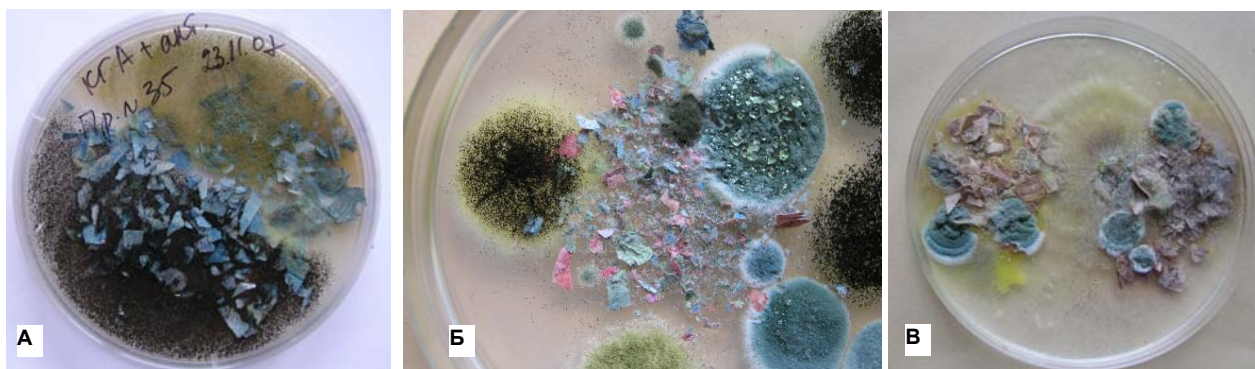


Рис. 2. Мікроскопічні гриби *Aspergillus niger*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium* sp. в пробах знищених банкнот (А) та в пробах після процесу брикетування в компресорах за температури $+80^{\circ}\text{C}$ (Б, В)

Отже, в пробах повітря обстежених приміщень та на зразках банкнотних паперів різного номіналу виявлено різноманітні мікроорганізми – мікроскопічні гриби, бактерії, дріжджі. Серед грибів ідентифіковано види, які можуть створювати потенційну небезпеку для здоров'я людини: *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus* (III група патогенності), *A. niger*, *Rhizopus stolonifer* (IV група патогенності), представники роду *Candida*, серед яких 7 видів належать до III та IV груп патогенності [36, 37]. З урахуванням отриманих кількісних та якісних характеристик дослідженої мікробіоти процеси перерахунку, пакування та знешкодження цінних банкнотних паперів (банкнот різного номіналу), можуть становити потенційну небезпеку для здоров'я людей, потребують мікологічного та бактеріологічного контролю. Останні мають набути моніторингового характеру.

З огляду на широкі адаптаційні властивості мікроскопічних грибів, їх надзвичайно велику стійкість до різноманітних екстремальних впливів, здатність більшості видів мікроорганізмів зберігати життєздатність після процесу брикетування знищених банкнотних паперів в компресорах (за температури $+80^{\circ}\text{C}$) питання подальшої переробки брикетів знищених банкнот потребують ретельного вивчення та контролю. Особливої уваги це питання потребує з урахуванням того, що знищені банкноти містять умовно-патогенні та патогенні мікроорганізми. В Білорусії, наприклад, знищені банкноти закопують у могильники, в США право на подальшу переробку знищених банкнот мають тільки спеціальні фірми, в яких є дозвіл від Міністерства фінансів і які мають відповідні ліцензії. В Україні подальша доля знищених банкнот не контролюється.

Встановлені в даній роботі кількісні показники та видовий склад мікроорганізмів (зокрема, мікроскопічних

грибів) в повітрі обстежених приміщень і на зразках знищених паперових банкнот, цілком ймовірно, не мають сталого характеру, та можуть змінюватися в залежності від їхньої "первинної" наявності на банкнотах, які перераховуються, пакуються або знищуються. Безумовно, впливають на зазначені показники також складові забруднень на пакувальних траплях мішках, перев'язочних шпатах та пилу, який осідає на обладнанні тощо. Вдосконалення відповідних інженерно-технічних систем, запровадження новітніх технологій та контролю сприятимуть зменшенню ризиків, пов'язаних із потенційним негативним впливом мікроорганізмів на здоров'я людей в досліджених приміщеннях та в різноманітних банкнотних відділеннях, де постійно відбуваються процеси перерахунку та пакування банкнотних цінних паперів.

Висновки. Чисельність мікроскопічних грибів в 1м^3 повітря обстежених приміщень перевищувала критичний показник 500 КУО/м^3 практично в усіх точках відбору проб, що може становити небезпеку для здоров'я людей, які мають підвищену чутливість до мікогенних алергенів (виникнення ризиків розвитку алергічних захворювань).

В комплексах мікроорганізмів повітря досліджених приміщень домінували представники родів мікроміцетів, на яких сьогодні сфокусовані епідеміологічні та клінічні дослідження: *Penicillium* (60-100%), *Cladosporium* (57,2-100%), *Aspergillus* (60-71,5%), *Alternaria* (42,5-60%). Найбільшим видовим різноманіттям серед вилучених ідентифікованих мікроскопічних грибів характеризувались роди *Aspergillus*, *Cladosporium* та *Penicillium*. Серед грибів, виділених з проб повітря та паперових банкнот, ідентифіковано види, представники яких належать до III та IV груп патогенності, умовно-патогенних (*Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *Rhizopus stolonifer*, *Candida* sp. та ін.).

Список використаних джерел

1. Антонов В.Б. Экологические причины микозов и микогенной аллергии у городских жителей / В.Б. Антонов // Проблемы медицинской микологии. – 2002. – 4. № 2. – С. 62-66.
2. Марфенина О.Е., Фомичева Г.М. Потенциально патогенные микелиальные грибы в среде обитания человека. Современные тенденции / О.Е. Марфенина, Г.М. Фомичева // Микология сегодня. / Под ред. Ю.Т. Дьякова, Ю.В. Сергеева. – М.: Нац. акад. микологии, 2007. – Т.1. – С. 235–266.
3. Basak S. A short study on superficial mycoses with evaluation of topical antifungal agents in a tertiary care hospital / S. Basak, D. Ghosh, M.J. Mukherjee // Journal of Mycopathology Research. – 2013. – Vol. 51. – № 2. – P. 301–305. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
4. Chowdary S.V. Role of Fungi (molds) in allergic airway disease – An Analysis in a South Indian Otolaryngology center / S.V. Chowdary, L. Prasanna, V. Sangram, S. Rani, V. Kumar // Indian Journal Allergy Asthma Immunology. – 2011. – 25(2). – P. 67-78. Available from: <http://medind.nic.in/iact/t11/i2/iact11i2p67.pdf>
5. Ilkit M. Tinea pedis: The etiology and global epidemiology of a common fungal infection / M. Ilkit, M. Durdu // Critical Reviews Microbiology. – 2014. – № 1. – P. 1–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24495093>
6. Żukiewicz-Sobczak W.A. The role of fungi in allergic diseases / W.A. Żukiewicz-Sobczak // Postępy Dermatol Alergologii. – 2013 Feb. – 30(1). – P. 42–45. doi: 10.5114/pdia.2013.33377. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3834689/>
7. Shelton B.G. Profiles of Airborne Fungi in Buildings and Outdoor Environments in the United States / B.G. Shelton, K.H. Kirkland, W.D. Flanders, G.K. Morris // Applied and Environmental Microbiology. – 2002. – Vol. 68. – N 4. – P. 1743–1753. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11916692>
8. Дудок Н.Р. Наукове обґрунтування санітарного стандарту гриба *Penicillium vitale* Pidoplitschko et Bilaj в повітрі робочої зони / Н.Р.Дудок, А.К. Маненко // Acta Medica Leopoliensia. – 2002. – Том 8, № 1. – С. 78–82.
9. Наказ МОЗ України від 14.11.2011 р. № 784 Про затвердження Державних санітарних норм та правил "Гігієнічні вимоги до розміщення, обладнання та експлуатації перинатальних центрів".
10. Цапко В.Г. Гігієнічні аспекти виробництва біопалива із рослинної сільсько- господарської сировини / В.Г. Цапко, М.Ю.Стеренбоген, А.Я.Чудновец, В.В. Папач // Український журнал з проблем медицини праці. – 2009. – 1(17). – С. 88-91.
11. Желтикова Т.М. К вопросу о допустимом уровне микромицетов в воздухе помещений / Т.М. Желтикова // Проблемы медицинской микологии. – 2009. – Т. 11. – № 2. – С. 41-43.
12. WHO guidelines for indoor air quality: dampness and mould. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe. – 2009. – 273 p.
13. Brand A. Hyphal Growth in Human Fungal Pathogens and Its Role in Virulence / Brand A. // International Journal of Microbiology – 2012. – Article ID 517529, 11 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2012/517529> Available from: <http://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2012/517529/>
14. Brown Sam P. Evolution of virulence in opportunistic pathogens: generalism, plasticity, and control / Sam P. Brown, Daniel M. Cornforth, Nicole Mideo // Trends Microbiology. – 2012. – 20(7). P. 336–342. doi: 10.1016/j.tim.2012.04.005 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3491314/>
15. Kriengkauyiat J. Epidemiology and treatment approaches in management of invasive fungal infections / J. Kriengkauyiat, J.I. Ito, S.S. Dadwal // Clinical Epidemiology. – 2011. –vol. 3. – no. 1. – P. 175–191. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21750627>
16. McCormick A. *Aspergillus fumigatus*: contours of an opportunistic human pathogen / A. McCormick, J. Loeffler, F. Ebel // Cellular Microbiology. – 2010. – Vol. 12. – no. 11. – P. 1535–1543. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20716206>
17. Yazah Adamu James Bacterial Contaminants of Nigerian Currency Notes and Associated Risk Factors / Adamu James Yazah, Jairus Yusuf, Ameh James Agbo // Research Journal of Medical Sciences – 2012. – Vol. 6. – Iss. 1. – P. 1-6. doi: 10.3923/rjmsci.2012.1.6 Available from: <http://www.medwelljournals.com/>
18. Feglo Patrick Bacterial load on Ghanaian currency notes / Patrick Feglo, Michael Nkansah // African Journal of Microbiology Research. – 2010. – 4(22). – P. 2375-2380. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
19. Asawa Kailash Bacterial Contamination of Currency Notes in Circulation – A Public Health / Kailash Asawa, H. Choudhary, Srinath Shetty // Journal of Well Being. – 2010. – Iss. 45. – V.4, N.1. – P. 45-49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
20. Uddin Md. Shakir Ahmed Evaluation of the Microbial Contamination of Bangladesh Paper Currency Notes (Taka) in Circulation / Md. Shakir Uddin Ahmed, Sahana Parveen, Tania Nasreen, Badrunessa Feroza // Advances in Biological Research. – 2010. – 4 (5). – P. 266-271. Available from: [http://www.idosi.org/abr/4\(5\)/5.pdf](http://www.idosi.org/abr/4(5)/5.pdf)
21. Barolia . Sushil Kumar Coliform Contamination on different Paper Currency in Ajmer, Rajasthan, India / Sushil Kumar Barolia, Sheetal Verma, Bhoopendra Kumar Verma // Universal Journal of Environmental Research and Technol. – 2011. – Vol. 1. – Iss. – 4. P. 552-556. Available from: <http://environmentaljournal.org/1-4/ujert-1-4-17.pdf>
22. Basavarajappa K. G. Study of bacterial, fungal, and parasitic contamination of currency notes in circulation / K. G. Basavarajappa, P. N. Rao, K. Suresh // Indian Journal Pathology Microbiology. – 2005. – Vol. 48. – P. 278-279. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16758695>
23. Okungbowa F.I. Fungal flora of Nigerian currency notes in circulation in Benin City, Nigeria / F.I. Okungbowa · A.P.O. Dede // Indian Journal Microbiology – 2010. – 50(Suppl 1). – P. 139–S141 DOI: 10.1007/s12088-010-0074-1 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3396404/>
24. Васильев О.Д. Методология исследования микобиоты помещений / О.Д. Васильев, В.Г. Гоик, Д.А. Светлов, А.О. Васильева // Проблемы медицинской микологии – 2002, Т.4. – № 2. – С.66–67.
25. Кочемасова З.Н. Санитарная микробиология и вирусология. / З.Н. Кочемасова, С.А. Ефремова, А.М. Рыбакова – М., 1987. – С.134–153.
26. Мамонова И.В. Критерии миграционной активности плесневых грибов в помещении / И.В. Мамонова // Микология и фитопатология. – 1993, Т.27. – Вып. 1. – С.23 – 28.
27. ДСТУ 2881 – 94. Екологія мікроорганізмів. Терміни та визначення. Введ. 01.01.1996. – Київ: Держстандарт України, 1994. – 25 с.
28. Кураков А.В. Методы выделения и характеристики комплексов микроскопических грибов наземных экосистем. / А.В. Кураков. – М.2001.
29. Саттон Д. Определитель патогенных и условно-патогенных грибов. / Д. Саттон, А. Фотергилл, М. Ринальди / Под ред. д-ра мед. наук И.Р. Дорожковой. – М., 2001.
30. Hoog G.S. Atlas of clinical fungi. 2nd edition / G.S. Hoog, J. Guarro, J. Gene, M.J. Figueras. – 2000. – 1126 p. Available from: <http://www.cabdirect.org/abstracts/20013005530.html>
31. Samson R.A. Penicillium subgenus Penicillium: new taxonomic schemes. Mycotoxins and other extrolites / R.A. Samson, J.C. Frisvad // Studies in Mycology, 2004. – N 49. – 257 p. Available from: <http://www.cbs.knaw.nl/index.php/studies-in-mycology/313-studies-in-mycology-no-49>
32. Samson R.A. Introduction to food and airborne fungi. Seventh edition. / R.A. Samson, E.S. Hoekstra, J.C. Frisvad. – 2004. – 389 p. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
33. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the fungi. 9th ed./ P.M. Kirk, P.F. Cannon, J.C. David, J.A. Stalpers – Egham: CABI Bioscience; Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelfcultures. – 2001. – 624 p. Available from: <http://www.cabdirect.org/abstracts/20013144931.html>
34. Индекс грибов: www.speciesfungorum.org/Names/Names.asp
35. Дзеркало тижня, № 33 (612), 2-8 вересня 2006 р.
36. Державні санітарні правила ДСП 9.9.5.035-99 "Безпека роботи з мікроорганізмами I-II груп патогенності". – К.:1999. 92 с.
37. Озерская С.М. Патогенные грибы: категоризация биологического риска и разнообразия / С.М. Озерская, Н.Е. Иванушкина, Г.А. Кочкина / В кн.: Успехи медицинской микологии. / Под ред. Ю.В. Сергеева – М., 2007. – Т. 1. – С. 268–282.

Надійшла до редколегії 30.11.15

Т. Кондратюк, канд. биол. наук

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

РЕГУЛЯЦИЯ РАЗВИТИЯ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ В ПОМЕЩЕНИЯХ С СОХРАНЕНИЕМ И УНИЧТОЖЕНИЕМ БУМАЖНЫХ УКРАИНСКИХ БАНКНОТ

Охарактеризовано количественный и видовой состав микроскопических грибов, изолированных из проб воздуха помещений по хранению, пересчету и уничтожению бумажных украинских банкнот: изолировано грибы 41 вида 17 родов отделов *Zygomycota*, *Ascomycota* и группы *Anamorpha* *fungi*. С использованием метода седиментации установлено, что количество колониеобразующих единиц микромицетов в 1 м³ воздуха обследованных помещений составляло от 590 до 1320 КОЕ/м³. В пробах воздуха и образцах банковских бумаг (банкнот) идентифицировано виды грибов, которые являются опасными для здоровья человека: *Alternaria* sp., *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *Geotrichum candidum*, *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium* spp. и др., а также дрожжи рода *Candida*. После процесса брикетирования уничтоженных банковских бумаг (банкнот) в компрессорах значительная часть микроскопических грибов и дрожжей сохраняют жизнеспособность.

Ключевые слова: условно-патогенные микроскопические грибы, бумажные украинские банкноты.

T. Kondratiuk, PhD
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

REGULATION OF THE DEVELOPMENT OF MICROSCOPIC FUNGI IN THE AREAS WITH THE PRESERVATION AND DESTRUCTION OF BANKNOTES UKRAINIAN PAPER

The quantitative and species composition of microscopic fungi isolated from samples of indoor air retention, conversion and disposal of Ukrainian paper currency is characterized. Totally 41 species of 17 genera of Zygomycota, Ascomycota and Anamorphic fungi group are isolated. Using the method of sedimentation found that the number of colony forming units of Micromycetes in 1 m³ of air surveyed rooms ranged from 590 to 1320 CFU/m³. *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *Rhizopus stolonifer*, *Paecilomyces variotii* and others, as well as yeasts of the genera *Candida* and *Rhodotorula* were identified in the air samples and in the samples from Ukrainian paper currency. Some of these fungi mentioned are dangerous to human health. It is also found that much of yeasts and microscopic fungi survive after briquetting process for disposal of Ukrainian paper currency in compressors.

Key words: opportunistic microscopic fungi, Ukrainian paper currency.

УДК 616. 34-008.87.613.25

I. Лещенко, асп., Н. Скочко, канд. біол. наук, О. Вірченко, канд. біол. наук,
О. Гаділія, канд. біол. наук, Т. Фалалєєва, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ВПЛИВ МОНО-, ПОЛІ- ТА КОМБІНОВАНИХ ПРОБІОТИКІВ НА РОЗВИТОК ОЖИРІННЯ, ВИКЛИКАНЕ ГЛУТАМАТОМ НАТРІЮ

Дослідили вплив моно-, полі- та комбінованих пробіотиків на масу тіла та вісцерального жиру у щурів за умов неонатального введення глутамату натрію. Ожиріння викликали шляхом неонатального введення глутамату натрію (4 мг/г, підшкірно) на 2, 4, 6, 8, 10 день життя. Введення пробіотиків починали через 4 тижні після народження та продовжували двотижневими курсами з перервами у 2 тижні. Через 4 місяці у щурів всіх груп було проведено аналіз змін маси тіла і вісцерального жиру. Неонатальне введення глутамату натрію призводило до значного накопичення вісцерального жиру в черевній порожнині, що в 5,8 разів ($p < 0,05$) перевищувало показники інтактних щурів. Періодичне введення пробіотиків попереджало розвиток вісцерального ожиріння у щурів. Отримані результати дозволяють стверджувати про ефективність застосування пробіотичних штамів біфідобактерій та лактобацил для попередження розвитку ожиріння гіпоталамічно-гогогенезу.

Ключові слова: ожиріння, пробіотики.

Вступ. Сучасна наукова література свідчить про те, що основні патогенетичні механізми ожиріння зводяться до порушення енергетичного балансу [1]. Оскільки нестача їжі для організму становить набагато більшу небезпеку, ніж переїдання, то й еволюційно складені реакції організму більш спрямовані на забезпечення організму їжею. За останні 30 років раціон людини зазнав змін, збільшилася кількість продуктів із поліпшеними смаковими якостями та підвищеною калорійністю.

Наукові дослідження останніх років свідчать про зміну не лише раціону харчування, але й подальшу зміну мікрофлори шлунково-кишкового тракту. Протягом останнього десятиліття проведено декілька наукових досліджень, спрямованих на вивчення ролі мікрофлори у процесах метаболізму макроорганізму. Так, у 2010 р. проведено дослідження, в якому порівнювали мікрофлору кишечника у дітей, які проживають у Буркіна-Фасо та харчуються переважно їжею, багатою на харчові волокна, з мікрофлорою кишечника у дітей, що мешкають в Італії. Використання методу секвенування генів 16S рибосомальної РНК і біохімічного аналізу дозволило виявити суттєві відмінності у складі інтестинальної мікрофлори та рівня коротколанцюгових жирних кислот між двома групами дітей. У дітей Буркіна-Фасо переважали мікроорганізми роду *Bacteroides* spp., у дітей з Італії – *Firmicutes* spp. [2].

В іншому дослідженні порівнювали мікробіоценоз мишей із недостатньою масою тіла і мишей із генетично детермінованим ожирінням. Обидві групи мишей утримувалися на однаковій вуглеводній дієті. Згідно з даними дослідження, у мишей з ожирінням відзначали зменшення на 50% кількості бактерій роду *Bacteroides* spp. та пропорційне збільшення кількості бактерій роду *Firmicutes* spp. Також у мишей з ожирінням виявляли мікроорганізми класу *Archaeas* spp. (вид *Methanobrevibacter smithii*), що мають здатність підвищувати процес ферментації полісахаридів та продукують метан [3]. Калорійність фекалій мишей з ожирінням була вищою, ніж у мишей з недостатньою масою тіла, що свідчить про підвищену утилізацію калорій з їжі. Таким чином, мікрофлора може бути одним із факторів,

що спричиняють ожиріння. Також, в роботах останніх років були встановлені позитивні ефекти пробіотичних бактерій на розвиток ожиріння. Показано, що застосування *Lactobacillus gasseri* SBT2055 та *Lactobacillus paracasei* SSP paracasei F19 (F19) попередило розвиток дієто-індукованого ожиріння [4].

У зв'язку з зазначеним метою роботи було дослідити вплив моно-, полі- та комбінованих пробіотиків на масу тіла та вісцерального жиру у щурів за умов неонатального введення глутамату натрію.

Методи досліджень. Дослідження проведені на 45 щурах-самцях з дотриманням нормативів Конвенції з біоетики Ради Європи 1997 року, Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей, загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 року), інших міжнародних угод та національного законодавства у цій галузі. Тварин утримували в умовах акредитованого віварію згідно зі "Стандартними правилами по упорядкуванню, устаткуванню та утриманню експериментальних біологічних клінік (віваріїв)". Прилади, що використовувалися для наукових досліджень, підлягали метрологічному контролю.

Щури були розділені на 6 груп по 10 тварин в кожній. Новонародженим щурам I групи підшкірно у об'ємі 8 мкл/г вводили плацебо (фізіологічний розчин). Новонародженим щурам II та III-VI груп підшкірно у об'ємі мкл/г вводили глутамат натрію (4 мг/г) відповідно на 2, 4, 6, 8, 10 день життя [5]. Впродовж 4 місяців після народження щури знаходилися на звичайному харчовому раціоні. III група отримувала 2,5 мл/кг водного розчину суміші пробіотиків (2:1:1 *Lactobacillus casei* MVB-7280, *Bifidobacterium animalis* VKL, *Bifidobacterium animalis* VKB) у дозі 5×10^9 КУО/кг (50 мг/кг) (внутрішньошлунково, в/ш). Групам III-VI вводили 2,5 мл/кг водного розчину моноштамних пробіотиків *Bifidobacterium animalis* VKL, *Bifidobacterium animalis* VKB та *Lactobacillus casei* MVB-7280 відповідно у дозі 5×10^9 КУО/кг (50 мг/кг). Група II

відповідно отримувала 2,5 мл/кг води (в/ш). Введення починали через 4 тижні після народження та продовжували двотижневими курсами з перервами у 2 тижні. Впродовж 4 місяців у щурів всіх груп було проведено аналіз змін маси тіла. 4-місячних тварин декапітували, видалляли та зважували вісцеральний жир.

Результати досліджень. Встановлено, що у тварин, яким на 2-10 добу життя підшкірно вводили глутамат натрію у дозі 4 мг/г, через 4 місяці маса тіла не відрізнялася від показників інтактних тварин. Так, якщо

маса інтактних тварин складала 255 ± 7 г, то маса тварин з глутамат-індукованим ожирінням – 261 ± 5 г (рис. 1). Проте у цих тварин розвивалося суттєве вісцеральне ожиріння. Встановлено, що інтактні щури мали всього $2,5 \pm 0,2$ г жиру у черевній порожнині. Неонатальне введення глутамату натрію призводило до значного накопичення вісцерального жиру в черевній порожнині до $17,3 \pm 1,8$ г, що в 5,8 разів ($p < 0,05$) перевищувало показники інтактних щурів (рис. 2).

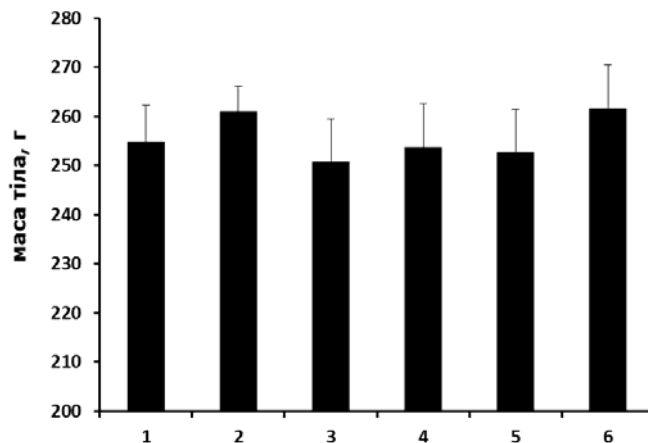


Рис. 1. Маса тіла щурів за умов ожиріння, викликаного неонатальним введенням глутамату натрію, за умов введення пробіотичних штамів ($3,2 \cdot 10^{10}$ КУО/кг) ($n=10$ в кожній групі). 1 – інтактні щури; 2 – контрольні щури з ожирінням; 3 – ожиріння + *Bifidobacterium animalis* VKL і VKB та *Lactobacillus casei* MVB-7280 (1:1:2); 4 – ожиріння + *Bifidobacterium animalis* VKL; 5 – ожиріння + *Bifidobacterium animalis* VKB; 6 – ожиріння + *Lactobacillus casei* MVB-7280

Отримані показники підтверджують результати інших дослідників, які встановили, що введення новонародженим гризунам глутамату натрію індукує розвиток вісцерального ожиріння у дорослих тварин та є моделлю ожиріння у гризунів [6]. Ще у 70-тих роках минулого сторіччя було показано, що введення глутамату натрію новонародженим щурам викликало затримку росту, зміни функції кори надниркових залоз, розвиток толерантності до глюкози [7]. Через кілька років був зроблений висновок про те, що введення глутамату новонародженим щурам уражає головним чином гіпоталамус, зокрема, дугоподібні і паравентрикулярні ядра [8], що в свою чергу викликає порушення ендокринної функції та розвиток вісцерального ожиріння.

За умов введення пробіотичних штамів не було зафіксовано відмінностей у масі тіла дослідних тварин (рис. 1). За умов застосування моноштамів маса вісцерального жиру виявилася меншою на 32,3% ($p < 0,05$) в групі щурів, яким вводили *Bifidobacterium animalis* VKL, на 38,7% ($p < 0,05$) при введенні *Bifidobacterium animalis* VKB та 43,4% ($p < 0,05$) при введенні *Lactobacillus casei* MVB-7280 у порівнянні з контрольними тваринами з ожирінням (рис. 2). Найменший показник маси вісцерального жиру був виявлений в групі щурів, які отримували комбінований пробіотик. Зменшення маси жиру в цій групі становило 48,6% ($p < 0,05$) порівняно з групою щурів з ожирінням. Проте показники інтактних тварин при введенні трьохштамного пробіотика не було досягнуто: маса жиру перевищувала значення інтактних тварин в 2,5 разів ($p < 0,05$) (рис. 2).

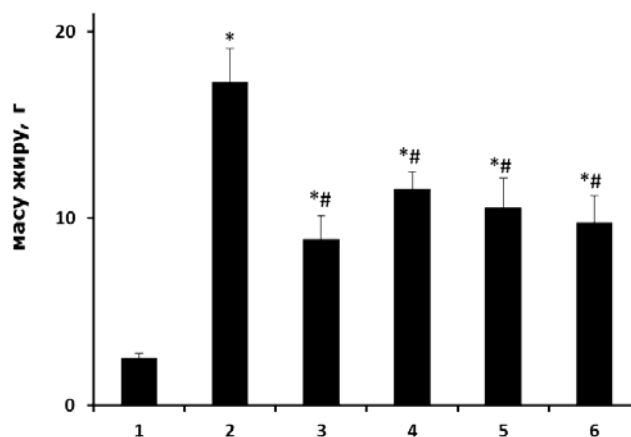


Рис. 2. Маса вісцерального жиру щурів за умов ожиріння, викликаного неонатальним введенням глутамату натрію, за умов введення пробіотичних штамів ($3,2 \cdot 10^{10}$ КУО/кг) ($n=10$ в кожній групі): 1 – інтактні щури; 2 – контрольні щури з ожирінням; 3 – ожиріння + *Bifidobacterium animalis* VKL і VKB та *Lactobacillus casei* MVB-7280 (1:1:2); 4 – ожиріння + *Bifidobacterium animalis* VKL; 5 – ожиріння + *Bifidobacterium animalis* VKB; 6 – ожиріння + *Lactobacillus casei* MVB-7280. * $p < 0,05$ – порівняно з інтактними щурами, ** $p < 0,05$ – порівняно з контрольними щурами з ожирінням

На оригінальних фотографіях видно різницю між ожирінням тварин, що було викликано неонатальним введенням глутамату натрію, та ожирінням тварин,

яким вводили трьохштамний пробіотик, який виявляв найбільш значущий терапевтичний ефект (рис. 3).

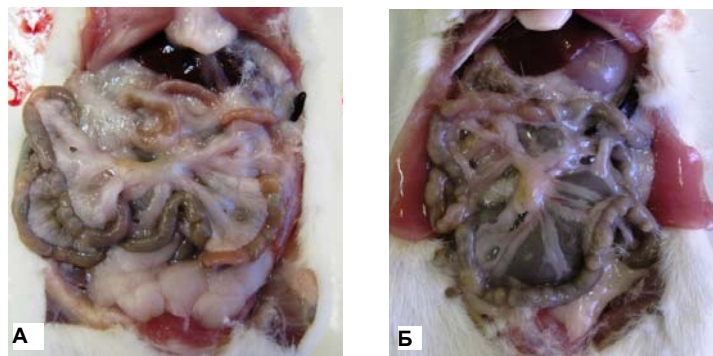


Рис. 3. Оригінальні фотографії вісцерального ожиріння щурів, викликаного неонатальним введенням глутамату натрію, за умов введення пробіотикотерапії: А – контрольний щур з ожирінням; Б – ожиріння + *Bifidobacterium animalis* VKL і VKB та *Lactobacillus casei* MVB-7280 (1:1:2) ($3,2 \cdot 10^{10}$ КУО/кр)

Отже, можна стверджувати про ефективність застосування пробіотичних штамів біфідобактерій та лактобацил для попередження розвитку ожиріння гіпоталамічного генезу. Найбільш суттєвий ефект був виявлений в групі тварин, які отримували композицію трьох пробіотичних штамів *Bifidobacterium animalis* VKL і VKB та *Lactobacillus casei* MVB-7280 (1:1:2). Отримані дані стали поштовхом для подальшого вивчення фізіологічних та біохімічних механізмів дії досліджуваних пробіотичних штамів за умов ожиріння.

Висновок. Отримані результати свідчать про ефективність застосування пробіотичних штамів біфідобактерій та лактобацил для попередження розвитку ожиріння гіпоталамічного генезу. Найбільший профілактичний ефект мав комбінований пробіотик.

Робота містить результати досліджень, проведених при грантовій підтримці Держаного фонду фундаментальних досліджень за конкурсним проектом "Механізми профілактично-лікувальної дії пробіотиків за умов розвитку ожиріння гіпоталамічного генезу" (2015 р., № держреєстрації 0115U004862).

Список використаних джерел

1. Литвиненко О. А. Особливості мікробіоценозів різних екотопів у людей з надмірною масою тіла / О. А. Литвиненко, І. Ю. Кучма, Т. П. Осолодченко // Український Медичний Часопис. – 2014. – Vol. 102, No. 4. – P. 14–17.
2. De Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from europe and rural africa. / C. De Filippo, D. Cavalieri, M. Di Paola [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2010. – Vol. 107, No. 33. – P. 14691–6.
3. Samuel B. S. A humanized gnotobiotic mouse model of host-archaeal-bacterial mutualism. / B. S. Samuel, J. I. Gordon // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2006. – Vol. 103, No. 26. – P. 10011–6.
4. Regulation of abdominal adiposity by probiotics (lactobacillus gasseri sbt2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. / Y. Kadooka, M. Sato, K. Imaizumi [et al.] // European journal of clinical nutrition. – 2010. – Vol. 64, No. 6. – P. 636–43.
5. Екзокринна функція підшлункової залози у щурів за умов експериментального ожиріння / І. В. Лещенко, В. Г. Шевчук, О. А. Савченко [та ін.] // Фізіологічний журнал. – 2014. – Vol. 60, No. 1. – P. 41–48.
6. Plasma lipoproteins of monosodium glutamate-induced obese rats. / K. Oida, T. Nakai, T. Hayashi [et al.] // International journal of obesity. – 1984. – Vol. 8, No. 5. – P. 385–91.
7. Lengvári I. Effect of perinatal monosodium glutamate treatment on endocrine functions of rats in maturity. / I. Lengvári // Acta biologica Academiae Scientiarum Hungaricae. – 1977. – Vol. 28, No. 1. – P. 133–41.
8. Abe M. Neuropeptide y in the specific hypothalamic nuclei of rats treated neonatally with monosodium glutamate. / M. Abe, M. Saito, T. Shimazu // Brain research bulletin. – 1990. – Vol. 24, No. 2. – P. 289–91.

Надійшла до редколегії 30.11.15

И. Лещенко, асп., Н. Скочко, канд. биол. наук, А. Вирченко, канд. биол. наук, О. Гадилія, канд. биол. наук, Т. Фалалеева д-р биол. наук
Киевский Национальный Университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ВЛИЯНИЕ МОНО-, ПОЛИ- И КОМБИНИРОВАННЫХ ПРОБИОТИКОВ НА РАЗВИТИЕ ОЖИРЕНИЯ, ВЫЗВАННОЕ ГЛУТАМАТОМ НАТРИЯ

Исследовано влияние моно-, поли- и комбинированных пробиотиков на массу тела и висцерального жира у крыс в условиях неонатального введения глутамата натрия. Ожирение вызывали путем неонатального введения глутамата натрия (4 мг / г, подкожно) на 2, 4, 6, 8, 10 день жизни. Введение пробиотиков начинали через 4 недели после рождения и продолжали недельными курсами с перерывами в 2 недели. Через 4 месяца у крыс всех групп был проведен анализ изменений массы тела и висцерального жира. Неонатальное введение глутамата натрия приводило к значительному накоплению висцерального жира в брюшной полости, что в 5,8 раз ($p < 0,05$) превышало показатели интактных крыс. Периодическое введение пробиотиков предупреждало развитие висцерального ожирения у крыс. Полученные результаты позволяют утверждать об эффективности применения пробиотических штаммов бифидобактерий и лактобацилл для предупреждения развития ожирения гипоталамического генеза.

Ключевые слова: ожирение, пробиотики.

I. Leshchenko, PhD stud, N. Skochko, PhD, O. Virchenko, PhD., O. Gadiliya, PhD., T. Falalyeyeva, DSc.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

EFFECT OF MONO-, POLY- AND COMBINED PROBIOTICS ON THE DEVELOPMENT OF OBESITY CAUSED BY MONOSODIUM GLUTAMATE

To investigate the effect of mono-, poly- and combined probiotics on body weight and visceral fat in rats with neonatal administration of monosodium glutamate. Obesity was caused by neonatal administration of sodium glutamate (4 mg / d, subcutaneously) at 2, 4, 6, 8, 10 day life. The introduction of probiotics started 4 weeks after birth and continued intermittently two-week courses with 2-week breaks. After 4 months in rats of all groups changes in body weight and visceral fat were analyzed. Neonatal MSG administration led to the significant accumulation of visceral fat in the abdomen, by 5.8 times ($p < 0,05$) exceeded the indicators of intact rats. Periodic administration of probiotics prevented development of visceral obesity in rats. Periodic administration of probiotic blends *Bifidobacteria* and *Lactobacteria* to rats that received monosodium glutamate in neonatal period prevented the development of obesity.

Keywords: obesity, probiotics.

УДК 612.362/364:577.181.5

Т. Довбинчук, асп., А. Базан, студ., Г. Толстанов, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ,
Л. Закордонець, канд. мед. наук
Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Київ

РІВЕНЬ ТРАНСПОРТНИХ ПРОТЕЇНІВ AQP8 ТА CFTR В СЛИЗОВІЙ ОБОЛОНЦІ ТОВСТОЇ КИШКИ ЩУРІВ ПІСЛЯ ВВЕДЕННЯ АНТИБІОТИКА ЦЕФТРІАКСОНА

Антибіотик цефтріаксон цефалоспоринового покоління викликає порушення у транспорті води та електролітів через епітелій товстої кишки. В наших дослідженнях встановлено, що 5- та 14-добове введення цефтріаксону викликає зміни у рівні протеїнів AQP8 та CFTR в слизовій оболонці товстої кишки щурів, що може лежати в основі молекулярних механізмів розвитку антибіотикасоційованої діареї.

Ключові слова: товста кишка, цефтріаксон, діарея.

Вступ. Всмоктування води в товстій кишці відбувається пасивно за осмотичним градієнтом, який створюється активним транспортом електролітів, переважно, хлориду натрію за двома шляхами: парацелюлярно (через міжклітинні проміжки) та трансцелюлярно за допомогою спеціальних каналів, вбудованих в апікальну та базолатеральну мембрани, що носять назву аквапорини (AQP) [1]. Аквапорини вперше були виявлені у 1991 році [2, 3] являють собою групу невеликих мембранних білків, які забезпечують різним епітеліальним тканинам проникність для води. Усього сімейство аквапоринів налічує 10 членів, з яких більшість проявляють чітку специфічність до тканин [4, 5, 6]. У шлунково-кишковому тракті (ШКТ) аквапорини мають широке розповсюдження, так в ШКТ були знайдені AQP1, AQP3, AQP4, AQP5, AQP7, AQP8, AQP9, які локалізовані в епітеліальних клітинах по всій довжині травної трубки та клітинах травних залоз [7, 8, 9, 10]. При цьому, була виявлена потужна роль саме AQP8 у забезпеченні всмоктування води у товстій кишці за нормальних умов та на фоні запальних процесів (виразкового коліту, хвороби Крона тощо) [11]. Нещодавно було показано, що аквапорини не тільки забезпечують водний гомеостаз у товстій кишці, але і відіграють значну роль у патогенез запальних захворювань кишечника [11].

Рушійною силою для забезпечення транспорту води є електрохімічний градієнт, який створюється за рахунок транспорту іонів. Доведено, що одним з основних факторів, що контролює як електрогенне, так і електронейтральне всмоктування електролітів через епітелій товстої кишки є хлор-селективні канали – трансмембранний регулятор муковісцидоза (CFTR канал) [12]. CFTR є переважачим Cl⁻ каналом в дихальних шляхах, потових залозах та товстій кишці дорослої людини, де він відповідальний за цАМФ- та за Ca²⁺-активовану секрецію хлору [13, 14, 15].

В попередніх дослідженнях нами показано, що введення антибіотику групи цефалоспоринових призводить до розвитку діареї обумовленої зменшенням всмоктування води через епітелій товстої кишки щурів [16]. Проте молекулярний механізм, що лежить в основі даного явища не встановлений.

Тому метою нашої роботи було дослідити рівень протеїнів AQP8 та CFTR каналів в слизовій оболонці товстої кишки щурів після 5-ти та 14-ти денної терапії цефтріаксоном.

Об'єкт та методи дослідження. Дослідження проводили на білих лабораторних щурах-самцях лінії Вістар, масою 180-250 г, n=20. Тварин утримували в

стандартних умовах виварію при сталій температурі та вологості повітря.

Контролем слугували щури, яким упродовж 5-ти чи 14-ти діб одноразово вводили 0,1 мл води для ін'єкцій, внутрішньом'язово. Дослідні групи щурів, отримували внутрішньом'язово цефтріаксон (Артеріум, БАТ "Київмедпрепарат" Україна) в дозі 50 мг/кг, один раз на добу впродовж 5-ти чи 14-ти діб. Відповідно на 6-тий та 15-й день після початку експерименту (першим днем експерименту вважали день початку введення антибіотику) проводили аутопсії.

Щурів умертвляли та вирізали ділянку товстої кишки від анального отвору до сліпої кишки. Обережно зішкрябували поверхневі шари кишки, залишаючи серозну оболонку, зважували та занурювали в рідкий азот.

Ізольовану ділянку товстої кишки гомогенізували в лізуючому буфері (50 мМ трис – HCl, pH 7,4; 150 мМ NaCl, pH 7,4; 1% деоксихолат натрію; 1% SDS; 1% Тритон – 100 з додаванням інгібітора протеаз (Sigma, США) та фосфатаз (10 мМ Na₃VO₄).

Концентрацію загального білку вимірювали за методом Бредфорда з використанням набору "Bio-Rad для білкового аналізу" (Bio-Rad, США). Розділення та визначення білку (100 мкг заг. білку/зразок) проводили у 15% чи 8% SDS поліакриламідному гелі методом Вестерн блот аналізу з подальшим переносом протеїнів на нітроцелюлозну мембрану. Для визначення рівня протеїнів AQP8 та CFTR в слизовій оболонці товстої кишки використовували антитіла до AQP8 (1:500; Sigma, США) та CFTR (1:500; Sigma, США) відповідно. Надалі інкубували із вторинними HRP – кон'югованими антитілами до AQP8 (1:250; Novus Biology) та CFTR (1:2500; Santa Cruz). Візуалізували Вестерн блот з допомогою ECL – реагенту з 3,3 мкл H₂O₂.

Статистичну обробку даних проводили з використанням програми Statistica 8.0. Для кожної з вибірок перевіряли чи є нормальним розподіл досліджуваного показника, застосовуючи критерій Шапіро-Вілка. За умов нормального розподілу вибірок використовували t тест Ст'юдента. Статистично значущою для всіх показників вважали різницю p<0,05.

Результати та їх обговорення. Встановлено, що в слизовій оболонці товстої кишки щурів за нормальних умов експресуються аквапоринові канали AQP8 (рис. 1 А,Б). Аналогічні дані були отримані іншими дослідниками [11]. Введення цефтріаксону впродовж 5 днів не викликало статистично вірогідних змін у рівні протеїну AQP8 в слизовій оболонці товстої кишки щурів (рис 1А).

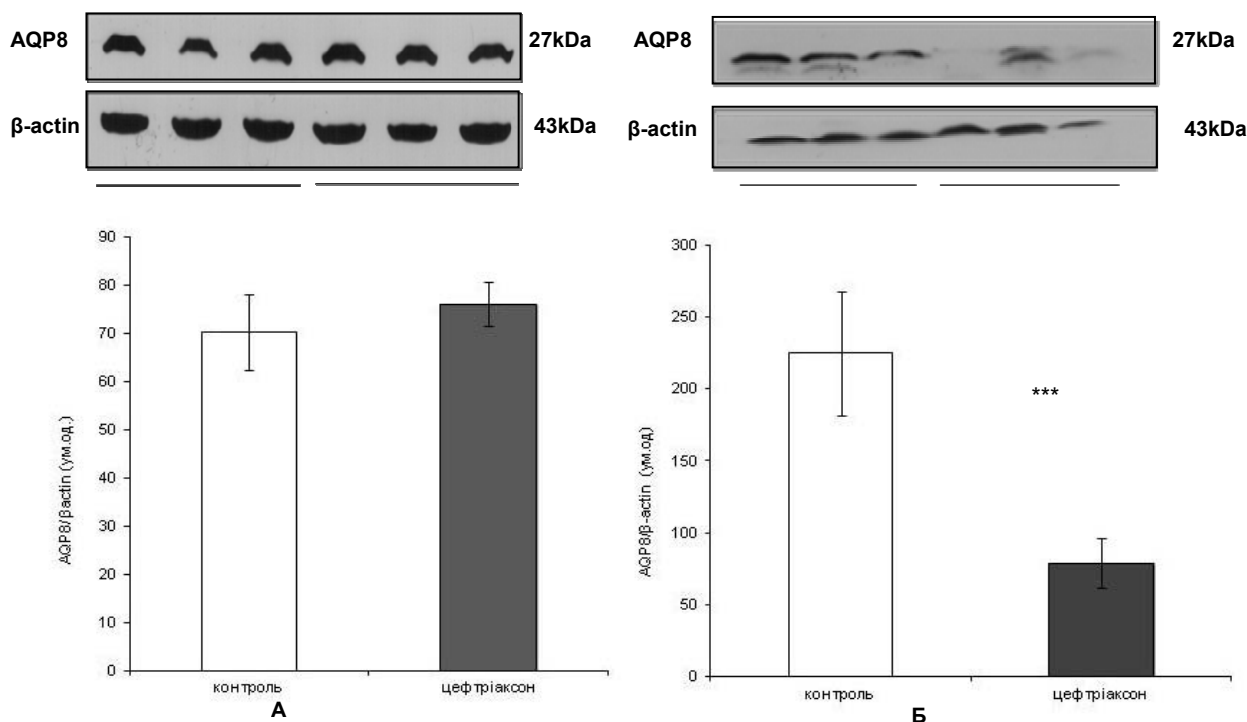


Рис.1. Рівень протеїну AQP8 в слизовій оболонці товстої кишки щурів, після 5-(А) та 14-(Б) добового введення цефтріаксону (50 мг/кг, внутрішньом'язово). Вестерн блот аналіз

*** – $p < 0,001$ відносно показників в контрольній групі

Проте, 14-добове введення цефтріаксону асоціювалось зі зменшенням в 2,9 разів ($p < 0,001$) рівня протеїну AQP8 порівняно з контрольною групою (рис. 1Б). В попередніх дослідженнях нами встановлено зменшення всмоктування води через епітелій товстої кишки щурів, як після 5- так і 14-добового введення цефтріаксону, що проявлялось клінічними ознаками діареї у 15% тварин [17]. Відповідно до отриманих нами даних можна припустити, що зменшення сумарного транспорту води після 5-добового введення цефтріаксону пов'язано з порушенням всмоктування електролітів. Після 14-добового введення цефтріаксону ефект посилюється за рахунок зменшення кількості каналів для транспорту води.

Важливу роль в регуляції сумарного транспорту іонів через епітелій товстої кишки відіграють цАМФ-залежні хлор-селективні канали – CFTR [18]. Зміни в їх активності призводять до порушення всмоктування натрію через електрогенні натрієві канали (ENaC) та Na^+/H^+ обмінник NHE3, що призводить до зсуву напрямку транспорту через епітелій товстої кишки в бік секреції [18, 12, 19].

Дані літератури свідчать про те, що в епітелії товстої кишки відбувається регуляція Na^+/H^+ та $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ обмінників за участю CFTR, що, в свою чергу, впливає на електронейтральне всмоктування NaCl , а також на внутрішньоклітинне рН та рН просвіту товстої кишки та інших відділів ШКТ [20]. Більш того, стимуляції секреції хлору через CFTR канали – є центральним механізмом ентеротоксин-викликаного діареї [21].

В наших попередніх дослідженнях було показано порушення транспорту іонів Na , K та Cl через епітелій товстої кишки щурів після антибіотикотерапії з цефтріаксоном [22]. Ми припустили, що це може бути пов'язано зі змінами у експресії CFTR каналів в слизовій оболонці товстої кишки.

Введення щурам цефтріаксону впродовж 5 діб призводило до підвищення в 1,5 разів рівня протеїну CFTR в слизовій оболонці товстої кишки щурів (рис.2А).

На відміну від 5-добової дії, після 14-добового введення антибіотику не спостерігалось вірогідних змін у рівні протеїну CFTR каналу (рис.2Б).

Активність CFTR каналів в більшій мірі залежить від їх кількості на поверхні цитоплазматичної мембрани, а не від загальної кількості протеїну CFTR [23]. Тому отримана наша відсутність змін у рівні даного протеїну через 14-добового введення цефтріаксону не виключає участі даного каналу в механізмах порушеного транспорту води та електролітів. Необхідні додаткові дослідження направлені на визначення клітинної локалізації CFTR каналів для відповіді на це питання.

Висновки. Вперше встановлено, що 5- та 14-добове введення цефтріаксону викликає зміни у рівні протеїнів AQP8 та CFTR в слизовій оболонці товстої кишки щурів, що може лежати в основі молекулярних механізмів розвитку антибіотикасоційованої діареї.

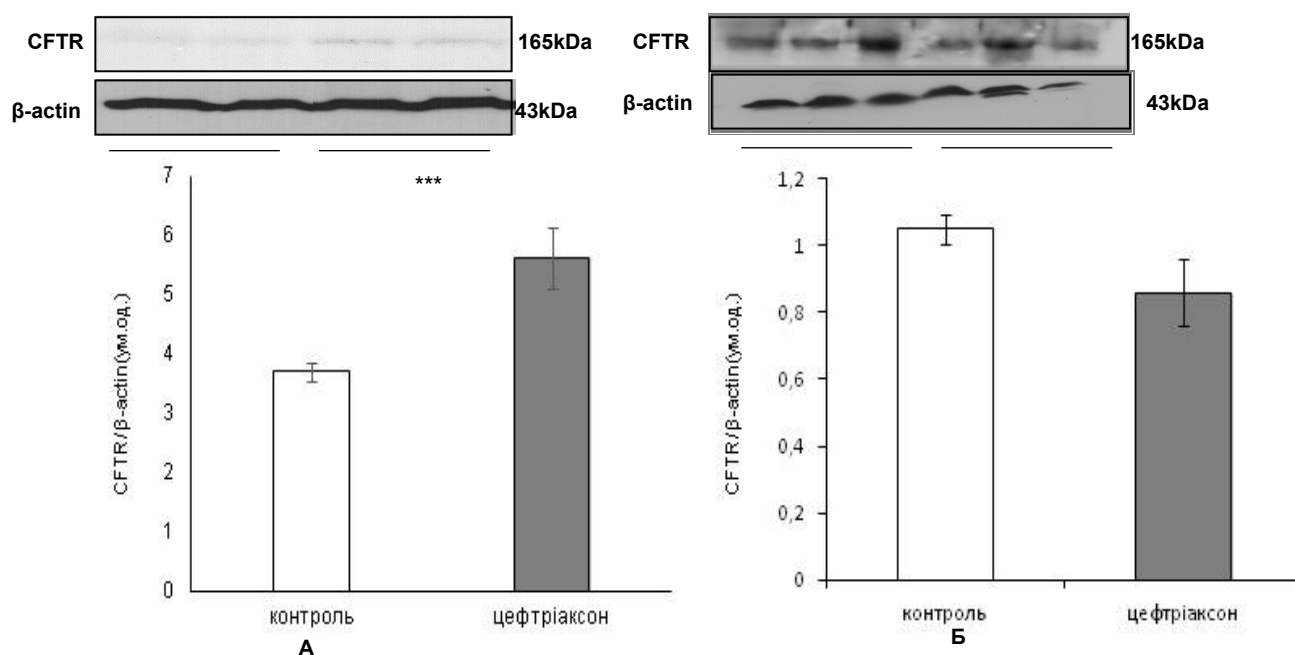


Рис. 2. Рівень протеїну CFTR в слизовій оболонці товстої кишки щурів після 5- (А) та 14- (Б) добового введення антибіотику цефтріаксону (50 мг/кг, в/м). Вестерн блот аналіз

*** – $p < 0,001$ відносно показників в контрольній групі

Список використаної літератури

- Kunzelmann K. Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease // K. Kunzelmann, M. Mall // *Physiological Reviews*. – 2002. – Vol. 82. – P. 245-289.
- Preston G.M., Agre P. Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family // *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1991. – Vol. 88. – P. 11110-11114.
- Preston G.M., Carroll T.P., Guggino W.B. et al Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein // *Science*. – 1992. – Vol. 256. – P. 385-7.
- Nielsen S., Frokiaer J., Marples D. et al Aquaporins in the kidney: From molecules to medicine // *Physiology Review*. – 2002. – Vol. 82. – P. 205-44.
- Ma TH, Verkman AS. Aquaporin water channels in gastrointestinal physiology // *J Physiol*. – 1999. – Vol. 517. – P. 317-26.
- Nielsen S., King L.S., Christensen B.M. et al Aquaporins in complex tissues. II. Subcellular distribution in respiratory and glandular tissues of rat // *American Journal Physiology*. – 1997. – Vol. 273. – P. 1549-61.
- Nielsen S., Nagelhus E. A., Amiry-Moghaddam M., Bourque C., Agre P., Ottersen O. P. Specialized Membrane Domains for Water Transport in Glial Cells: High-Resolution Immunogold Cytochemistry of Aquaporin-4 in Rat Brain // *The Journal of Neuroscience*. – 1997, Vol. 17, №1. – P. 171-180;
- Hasegawa T., TANII H., SUZUKI M., TANAKA S. Regulation of Water Absorption in the Frog Skins by Two Vasotocin-Dependent Water-Channel Aquaporins, AQP-h2 and AQP-h3 // *Endocrinology*. – 2003, Vol. 144, №9. – P. 4087-4096.
- Ma T., Verkman A.S. Topical Review Aquaporin water channels in gastrointestinal physiology // *Journal of Physiology*. – 1999. – Vol. 517, №2. – P. 317-326.
- Grazia P. Nicchia, Antonio Frigeri, Beatrice Nico, Domenico Ribatti, and Maria Svetlo Tissue Distribution and Membrane Localization of Aquaporin-9 Water Channel: Evidence for Sex-linked Differences in Liver // *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. – 2001. Vol. 49, №12. – P. 1547-1556.
- Ricanek P., Lunde L., Frye S., Støen M., Nygård S., Morth J., Rydning A., Vatn M., Amiry-Moghaddam M., Tønnum T. Reduced expression of aquaporins in human intestinal mucosa in early stage inflammatory bowel disease // *Clinical and Experimental Gastroenterology*. – 2015. – Vol. 8. – P. 49-67.
- Kunzelmann K., M. Mall. Electrolyte Transport in the Mammalian Colon: Mechanisms and Implications for Disease // *Physiology Review*. – 2002. – Vol. 82. P. 245-289.

- Barrett Ke And Keely Sj. Chloride secretion by the intestinal epithelium: molecular basis and regulatory aspects // *Annual Review Physiology*. – 2000. – Vol. 62. – P. 535-572.
- Mall M, Bleich M, Greger R, Schürlein M, Kuhlmann H, Seydewitz Hh, Brandis M, And Kunzelmann K. Cholinergic ion secretion in human colon requires co-activation by cAMP // *American Journal Physiology Gastrointestinal Liver Physiology*. – 1998. – Vol. 275. – P. G1274-G1281.
- Strabel D. And Diener M. Evidence against direct activation of chloride secretion by carbachol in the rat distal colon – *European Journal Pharmacology*. – 1995. – Vol. 274. – P. 181-191.
- Довбинчук Т., Закордонцев Л., Берегова Т., Толстонова Г. Транспорт води через епітелій товстої кишки щурів за дії антибіотику цефтріаксону // *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка "Біологія"*. – 2014. – Т. 3, №68. – С. 29-34.
- Dovbychuk T., Dranitsina A., Chervinska T., Zakordonets L., Beregova T., Ostapchenko L., Tolstanova G. The colonic ion transport and mucus secretion during treatment with broad spectrum antibiotic ceftriaxone // *Digestive Diseases Science*. Budapest, Hungary. – 2014. – Vol. 59, №8. – P. 1652-1653.
- Greger R. Role of CFTR in the colon // *Annu. Rev. Physiol*. – 2000. – Vol. 62. – P. 467-91.
- Mall M. Pharmacotherapy of the Ion Transport Defect in Cystic Fibrosis // *American Journal Respiratory Medicine*. – 2003. Vol. 2, №4. – P. 299-309.
- Poulsen J.H., Fischer H., Illek B., Machen T.E. Bicarbonate conductance and pH regulatory capability of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator // *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1994. – vol. 91, №. 12.
- Sonawane N. D., Hu J., Muanprasat C., Verkman A. S. Luminally active, nonabsorbable CFTR inhibitors as potential therapy to reduce intestinal fluid loss in cholera // *The FASEB Journal*. – 2005. – Published online №29.
- Довбинчук Т.В., Закордонцев Л.В., Путніков А.В., Варенюк І.М., Тяпко О.П., Рослова Н.М., Сергійчук Т.М., Линчак О.В., Дзержинський М.Е., Берегова Т.В., Толстонова Г.М. Різонаправлений ефект антибіотиків групи макролідів та цефалоспоринів на транспорт води та електролітів через епітелій товстої кишки щурів // *Фізіологічний журнал*. – 2015. – №6.
- Neil B.A., Tamas J., et al Regulation of Plasma Membrane Recycling by CFTR // *Science*. – 1992. – Vol. 256, №5056. – С. 530.

Надійшла до редколегії 19.10.15

Т. Довбинчук, асп., А. Базан, студ., А. Толстанов, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина,
Л. Закордонет, канд. мед. наук
Национальный медицинский университет им. О.О. Богомольца, Киев, Украина

УРОВЕНЬ ТРАНСПОРТНЫХ ПРОТЕИНОВ AQP8 И CFTR В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ТОЛСТОЙ КИШКИ КРЫС ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ АНТИБИОТИКА ЦЕФТРИАКСОНА

Антибиотикотерапия цефалоспорином III поколения цефтриаксоном вызывает нарушения в транспорте воды и электролитов через эпителий толстой кишки. В наших исследованиях установлено, что 5-ти и 14-суточное введение цефтриаксона вызывает изменения в уровне протеинов AQP8 и CFTR в слизистой оболочке толстой крыс, может лежать в основе молекулярных механизмов развития антибиотикассоциированной диареи.

Ключевые слова: толстая кишка, цефтриаксон, диарея.

T. Dovbynchuk PhD stud., A. Bazan stud., G. Tolstanova DSc.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
L. Zakordonets, PhD
O.O. Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

LEVEL AND TRANSPORT PROTEINS AQP8 CFTR IN THE LINING OF THE COLON OF RATS AFTER ANTIBIOTIC THERAPY

Antibiotic therapy ceftriaxone cephalosporin III generation causes a disturbance in the transport of water and electrolytes through the epithelium of the colon. In our study found that 5- and 14-daily administration of ceftriaxone causes changes in the level of CFTR protein and AQP8 in colon mucosa of rats that may underlie the molecular mechanisms of antibiotic-associated diarrhea.

Keywords: colon, ceftriaxone diarrhea.

УДК 612.8; 612.82/.83

Л. Купа, студ., Н. Філімонова, канд. фіз.-мат. наук, І. Зима, канд. біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

СТАТЕВІ ВІДМІННОСТІ В АКТИВНОСТІ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЛЮДИНИ ПРИ ВИЗНАЧЕННІ ВЕРБАЛЬНОГО ІНТЕЛЕКТУ

У дослідженні в якості обстежуваних добровільно взяли участь 40 осіб, серед яких 20 чоловіків та 20 жінок, правші, віком 18-23 роки, студенти I-IV курсів КНУ імені Тараса Шевченка. В результаті проведеного дослідження було виявлено, що завдання на визначення вербального інтелекту (субтести "Логічний Відбір", "Загальні Риси", "Аналогії" та "Класифікації" тесту структури інтелекту Амтхауера) у чоловіків вирішувались в рамках єдиної нейромережі. При цьому, порівняно з жінками, у них, в більшій мірі, була задіяна права півкуля, тобто залучались образні сприйняття та обробка вербальної інформації, а також, здійснювався більш селективний відбір інформації та вибір мети. У жінок, порівняно з чоловіками, в субтестах "Аналогії" та "Класифікації" у більшій ступені обробка інформації здійснювалась в локальних нейромережах задньої асоціативної зони неокортекс.

Ключові слова: тест структури інтелекту Амтхауера, вербальний інтелект, ЕЕГ.

Вступ. Перед будь-яким керівником або менеджером з персоналу рано чи пізно постає задача оцінки співробітників. На сьогоднішній день різноманітні психологічні тести та тести оцінки рівня інтелектуальності є основними методами оцінки персоналу. Здібності виділяють загальні та спеціальні. Загальні, або сукупність загальних здібностей ще називають обдарованістю та зазвичай ототожнюють з інтелектом. Інтелект – це вроджена здібність до пізнання та ефективного рішення проблем, зокрема до пізнання нового кола життєвих задач. В основі інтелекту лежить моделювання відношень навколишнього середовища [1]. В якості тесту інтелекту використовують тести IQ, Векслера, Stanford-Binet Intelligence Test та ін., серед яких слід виділити тест структури інтелекту Амтхауера, що був розроблений у 1953 році, для діагностування загальних розумових здібностей, визначення структури інтелекту [2] та вимірювання інтелектуального розвитку у осіб у віці від 13 до 61 року [3]. Тест характеризується хорошими методичними показниками: коефіцієнт тестової надійності складає 0,83-0,91, коефіцієнт надійності частин тесту (за методом "розщеплення") – 0,97 [2], що дає можливість проводити дослідження окремих компонент інтелекту відповідними субтестами. Тест складається з 9 субтестів по 16-20 завдань в кожному, 4 з яких направлені на дослідження вербального інтелекту, а саме: субтест №1 "Логічний Відбір" (ЛВ), що досліджує індуктивне мислення, відчуття обстежуваним мови, субтест №2 "Загальні Риси" (ЗР), який досліджує здатність до абстрагування, оперування вербальними

поняттями, субтест №3 "Аналогії" (А) – визначає комбінаторні здібності та субтест №4 "Класифікації" (К), що оцінює здатність приймати рішення. Аналіз механізмів сприйняття і обробки вербальної інформації та вивчення статевих відмінностей у цих процесах є дуже важливим для прогнозування успішної професійної діяльності в сферах, в яких необхідні спеціальні інтелектуальні здібності в роботі з текстами, а саме – в сфері освіти, бізнесу, силових структурах та ін.

Оскільки аналіз ЕЕГ при певних когнітивних навантаженнях дає можливість отримати кількісні оцінки активності відповідних зон кори головного мозку, що залучені до виконання цих завдань, метою роботи було дослідити статеві відмінності у реалізації вербального інтелекту. Завданням роботи було дослідити зміни активності головного мозку чоловіків та жінок під час тестування субтестів ЛВ, ЗР, А та К тесту структури інтелекту Амтхауера.

Матеріали та методи. У дослідженні добровільно взяли участь 40 осіб (20 чоловіків та 20 жінок), правші, віком від 18-23 років, студенти I-IV курсів КНУ імені Тараса Шевченка. Кожен з обстежуваних проходив 4 комп'ютерні субтести: ЛВ, ЗР, А та К. В субтесті ЛВ задачею обстежуваного було вибрати слово, яке завершить певне речення. Було запропоновано 20 завдань, які необхідно виконати не більше, ніж за 6 хв. В субтесту ЗР в кожному з 20 завдань обстежуваному було запропоновано п'ять слів, чотири з яких поєднані певним змістовим зв'язком, а п'яте слово – зайве, що і необхідно виділити серед інших. В субтесту А в кожному завданні обстежуваному

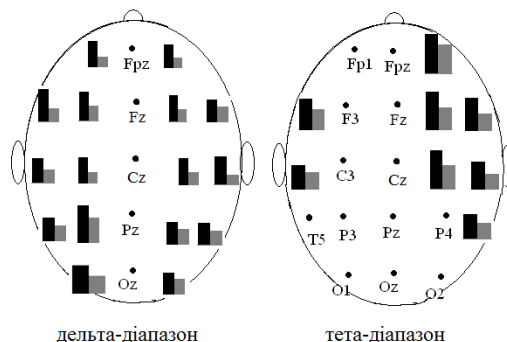
пропонувались дві пари слів, одна з яких – не повна. Із запропонованих п'яти слів, треба було вибрати підходяще. В субтесті К обстежуваний повинен був обрати слово із списку запропонованих, що точно передає зміст слів та об'єднує обидва надані слова. В усіх обстежуваних реєстрували ЕЕГ до початку обстеження (по 3 хв. фоновий запис з заплющеними та відкритими очима) та під час проведення тестування. Для реєстрації та аналізу ЕЕГ використовували комплекс "Нейрон-Спектр-4/ВП" (НейроСофт, Росія). Обстежувані знаходились в звукоізолюваному приміщенні, запис ЕЕГ здійснювався монополярно, референтний електрод було розташовано на мочці вуха з кожної сторони, частота квантування ЕЕГ дорівнювала 500 Гц. Було використано місткові посріблені електроди, які накладались за міжнародною системою 10-20% у 19 стандартних відведеннях. В кожному відведенні для частотних діапазонів ЕЕГ – дельта (0,5-3,9 Гц), тета (4,0-7,9 Гц), альфа (8-12,9 Гц), бета1 (13,0-19,9 Гц) та бета2 (20,0-35 Гц) обчислювалась повна потужність спектру – $S_{\text{повна}}$, $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$.

Статистичний аналіз даних проводили за допомогою пакету STATISTICA 8.0 (StatSoft, USA, 2008). Нормальність розподілів змінних перевірялась тестом Шапіро-Вілکا. Оскільки розподіл практично всіх параметрів за критерієм Шапіро-Вілка був відмінний від нормального ($p < 0,05$), для порівняння груп було використано критерій Манна-Вітні. Для опису вибіркового розподілу ненормально розподілених показників вказували медіану (M_e) і нижній (25%) та верхній (75%) квартилі: M_e [25%; 75%].

Результати та їх обговорення. При виконанні субтесту ЛВ в дельта – діапазоні у чоловіків порівняно з жінками $S_{\text{повна}}$ виявилась значуще вищою в обох півкулях (Рис.1), а саме – у відведеннях Fp1A1: 257,00 [170,00; 415,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 105,00 [89,00; 108,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$); в Fp2A2: 217,00 [159,00; 396,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 96,00 [91,50; 106,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$); F3A1: 140,00 [96,00; 286,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 74,00 [72,00; 97,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$); F4A2: 126,00 [94,00; 232,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 60,00 [44,00; 75,50] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$); F7A1: 148,00 [84,00; 228,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 59,00 [46,50; 84,50] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$); F8A2: 100,00 [72,00; 322,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 68,50 [51,50; 97,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$); C3A1: 119,00 [79,00; 172,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 53,00 [52,00; 84,50] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$); C4A2: 113,00 [76,00; 181,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 57,00 [48,00; 78,50] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$); T3A1: 109,00 [56,00; 157,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 57,00 [39,50; 69,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,01$); T4A2: 127,00 [50,00; 192,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 41,50 [37,50; 69,50] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,01$); T5A1:

106,00 [67,00; 149,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 71,00 [46,00; 105,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,01$); T6A2: 98,00 [57,00; 117,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 62,50 [35,50; 69,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$); P3A1: 93,00 [69,00; 150,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 63,50 [54,00; 81,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$); P4A2: 90,00 [68,00; 164,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 73,50 [61,00; 85,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,01$); O1A1: 111,00 [68,00; 165,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 70,50 [51,00; 81,50] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$); O2A2: 106,00 [69,00; 172,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 73,00 [58,50; 78,50] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,01$). Активність нейрональних коливань в дельта – діапазоні є інструментом відбору сенсорної інформації [4], крім того в нейромережах даного діапазону відбувається оцінка правильності виконання завдання [5]. Таким чином, можна припустити, що у чоловіків порівняно з жінками вибір слова, яке завершує речення потребував сприйняття не тільки вербальної інформації, але і її образного уявлення.

В тета – діапазоні у чоловіків порівняно з жінками $S_{\text{повна}}$ також виявилась значуще вищою у лівій півкулі у відведеннях, як F7A1: 28,00 [22,00; 39,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 19,00 [15,00; 20,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$) та T3A1: 23,00 [17,00; 42,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 50 [13,00; 20,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,01$) та правій півкулі, а саме – у відведеннях Fp2A2: 44,00 [28,00; 92,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ в порівнянні з 32,00 [24,00; 38,50] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,01$); F4A2: 40,00 [29,00; 59,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 24,00 [17,50; 33,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$); F8A2: 30,00 [20,00; 45,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 16,00 [13,00; 21,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$); T4A2: 24,00 [17,00; 60,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ в порівнянні з 13,50 [12,00; 15,50] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$); T6A2: 23,00 [16,00; 44,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 14,50 [11,00; 21,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,01$); C4A2: 34,00 [30,00; 58,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ в порівнянні з 21,00 [16,00; 36,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,01$) (Рис.1). В тета – діапазоні формується нейрональна мережа, в рамках якої відбувається вирішення поставленої задачі. При цьому префронтальна кора завдяки top-down контролю здійснює координуючу роль забезпечуючи міжрегіональну синхронізацію локальних нейрональних структур, що реалізують окремі під-функції [6] та оцінює правильність вирішення поставленого завдання [5]. Оскільки префронтальна кора та середня скроневая доля відомі як критичні структури, що задіяні у процесах пам'яті [6], виявлена активація правої фронто – темпоральної кори у чоловіків, порівняно з жінками, може свідчити про те, що чоловіки при формуванні рішення про завершення речення спирались на образну пам'ять. Крім того, вища активація в лівій скроневій зоні у чоловіків може свідчити про промовляння ними, в більшій мірі, наданих слів.

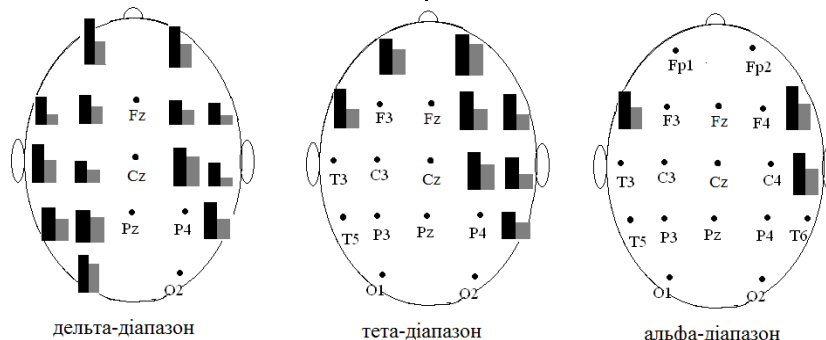


Умовні позначення:

- – медіани $S_{\text{повна}}$ під час виконання субтесту ЛВ у чоловіків, $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$
- – медіани $S_{\text{повна}}$ під час виконання субтесту ЛВ у жінок, $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$

Рис.1. Статеві відмінності у спектральній потужності ЕЕГ при проходженні субтесту ЛВ

У субтесті ЗР в дельта – діапазоні у чоловіків, в порівнянні з жінками, $S_{\text{повна}}$ виявилась значуще вищою у лівій півкулі у таких відведеннях як Fp1A1: 187,00 [115,00; 293,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 95,00 [79,50; 97,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$); F3A1: 174,00 [105,00; 207,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 74,50 [55,50; 81,50] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$); F7A1: 131,00 [79,00; 231,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 51,00 [38,00; 57,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$); C3A1: 96,00 [66,00; 107,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ в порівнянні з 60,00 [58,00; 72,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$); T3A1: 82,00 [56,00; 224,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ в порівнянні з 48,00 [38,00; 82,50] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p \leq 0,01$); T5A1: 78,00 [62,00; 169,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ в порівнянні з 51,00 [45,00; 67,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$); P3A1: 81,00 [70,00; 114,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ в порівнянні з 64,00 [58,00; 76,50] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$); O1A1: 84,00 [64,00; 172,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 65,00 [54,00; 84,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,01$). У правій півкулі $S_{\text{повна}}$ також, спостерігалась значуще вищою у чоловіків в порівнянні з жінками: Fp2A2: 174,00 [119,00; 446,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 99,00 [66,00; 113,50] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$); F4A2: 123,00 [89,00; 192,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 66,00 [49,00; 72,50] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$); F8A2: 100,00 [54,00; 220,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 44,00 [35,00; 72,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$); C4A2: 100,00 [72,00; 136,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 66,50 [57,00; 71,50] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$); T4A2: 98,00 [46,00; 311,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 36,00 [33,50; 45,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$); T6A2: 83,00 [47,00; 127,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 45,00 [37,50; 53,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$) (Рис.2). Отже у чоловіків порівняно з жінками, як і у попередньому субтесті, до сприйняття завдання були залучені практично всі зони неокортексу.



Умовні позначення:

- – медіани $S_{\text{повна}}$ під час виконання субтесту ЗР у чоловіків, $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$
- – медіани $S_{\text{повна}}$ під час виконання субтесту ЗР у жінок, $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$

Рис.2. Статеві відмінності у спектральній потужності ЕЕГ при проходженні субтесту ЗР

При вирішенні субтесту А в дельта – діапазоні у чоловіків, порівняно з жінками, $S_{\text{повна}}$ виявилась значуще вищою у F4A2: 85,00 [74,00; 86,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 63,00 [47,00; 81,50] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p \leq 0,01$); F8A2: 85,00 [64,00; 95,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 47,00 [34,00; 84,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p \leq 0,01$); C4A2: 95,00 [81,00; 99,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ в порівнянні з 65,00 [57,00; 71,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$); T4A2: 84,00 [52,00; 116,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 38,50 [35,50; 42,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$); T6A2: 75,00 [43,00; 95,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ в порівнянні з 45,50 [37,00; 57,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$); P4A2: 87,00 [78,00; 105,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 73,00 [56,50; 80,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p \leq 0,01$); F7A1: 95,00 [70,00; 190,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ в порівнянні з 63,00 [38,00; 72,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$) та P3A1: 77,00 [68,00; 96,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ в порівнянні з 62,50 [55,50; 81,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p \leq 0,01$), а також у жінок більшою за чоловіків у лівій префронтальній зоні у відведенні Fp1A1: 96,00 [89,00; 106,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 86,00 [82,00; 95,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p \leq 0,01$) (Рис.3). Таким чином, у чоловіків зберігалась вища активація правої

В тета – діапазоні у чоловіків в порівнянні з жінками $S_{\text{повна}}$ виявилась значуще вищою у лівій півкулі – у відведеннях: Fp1A1: 39,00 [33,00; 53,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 28,00 [25,00; 40,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,01$) та F7A1: 33,00 [21,00; 38,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ в порівнянні з 16,00 [13,00; 20,50] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$); та правій півкулі – у таких відведеннях: Fp2A2: 38,00 [29,00; 96,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 29,00 [23,50; 32,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$); F4A2: 44,00 [28,00; 60,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 24,00 [20,00; 33,50] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$); F8A2: 32,00 [19,00; 57,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 14,50 [13,00; 24,50] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$); T4A2: 28,00 [14,00; 69,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 13,50 [13,00; 17,50] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$); T6A2: 24,00 [17,00; 51,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ в порівнянні з 14,50 [11,50; 22,50] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,01$); C4A2: 33,00 [28,00; 50,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ в порівнянні з 22,00 [17,00; 29,50] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$) (Рис.2). Таким чином, у чоловіків зберігалась раніше сформована неймережа для вирішення завдань, а також відбулось посилення уваги.

В альфа – діапазоні у чоловіків, в порівнянні з жінками, спостерігалась значуще вища $S_{\text{повна}}$ у відведеннях F7A1: 17,00 [13,00; 31,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 10,00 [8,00; 15,50] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p \leq 0,01$); F8A2: 19,00 [14,00; 31,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 11,50 [6,90; 21,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,01$); T4A2: 19,00 [14,00; 48,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ в порівнянні з 12,00 [8,80; 18,50] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,01$) (Рис.2). Активність в альфа – діапазоні розглядають як високо селективний фільтр, який здійснює первинну обробку сенсорно – семантичної інформації та пригнічує нерелевантну інформацію в bottom-up процесах [8]. Таким чином, чоловіки залучаючи процеси пам'яті, здійснюють більш специфічний відбір інформації.

півкулі, тобто вони більшою мірою уявляли надані пари слів, але і використовували інтермодальні асоціації [9] з залученням лівої ангулярної звивини. В той час, як у жінок в більшій мірі проявився контролюючий вплив лівої префронтальної кори.

У тета – діапазоні у чоловіків $S_{\text{повна}}$ виявилась вищою ніж у жінок в F3A1: 37,00 [29,00; 51,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ в порівнянні з 32,50 [20,50; 35,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,01$), та F7A1: 31,00 [23,00; 54,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ в порівнянні з 19,50 [13,50; 29,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p \leq 0,01$); Fp2A2: 45,00 [35,50; 64,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 29,50 [19,50; 37,50] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$); F4A2: 43,00 [35,00; 50,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 17,00 [14,00; 33,50] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$); F8A2: 33,00 [23,00; 48,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 17,50 [10,50; 24,50] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p \leq 0,001$); C4A2: 36,00 [30,00; 48,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ в порівнянні з 24,00 [21,00; 31,50] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$); T4A2: 34,00 [22,00; 45,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 15,00 [13,00; 19,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$); T6A2: 24,00 [19,00; 42,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ в порівнянні з 15,00 [11,50; 22,50] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,01$); P4A2: 33,00 [27,00; 47,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з

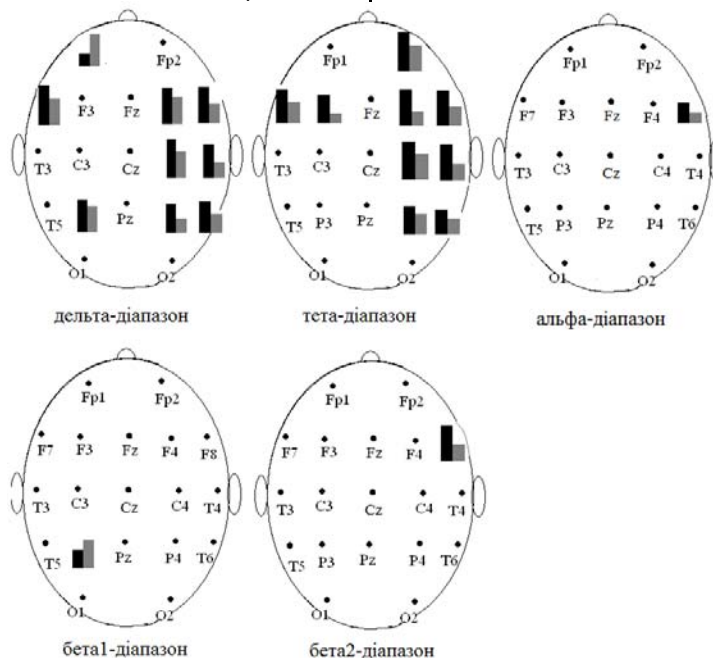
24,50 [22,50; 34,50] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,01$) (Рис.3). Тобто, у чоловіків практично не змінилась нейромережа для виконання даного субтесту.

В альфа – діапазоні у правій фронтальній зоні (відведення F8A2) $S_{\text{повна}}$ виявилась вищою у чоловіків 20,00 [14,00; 31,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$, ніж у жінок 11,00 [7,50; 29,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,01$), що свідчить про виділення ними релевантної цілі [10].

В бета1 – діапазоні було виявлена значуща вища $S_{\text{повна}}$ у лівій тім'яній зоні (відведення P3A1) у жінок 10,00 [9,65; 15,50] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ніж у чоловіків 9,30 [6,60; 11,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,01$) (Рис.3). Оскільки активність в бета – діапазоні визначає рівень уваги, когнітивного контролю та,

взагалі, status quo [11], можна припустити, що у жінок активація в зоні лівої ангулярної звивини свідчить про інтермодальну взаємодію [9] та включення вербальної асоціативної кори до пошуку відповідного слова.

В бета2 – діапазоні спостерігалась вища $S_{\text{повна}}$ у правій фронтальній зоні (відведення F8A2) у чоловіків 17,00 [8,60; 35,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ніж у жінок 8,05 [6,00; 22,50] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,01$) (Рис.3). Активність в бета2-діапазоні свідчить про пізнання рег се та безпосередню обробку інформації [12]. Таким чином, у чоловіків при вирішенні завдання в більшому ступені, ніж у жінок відбувались процеси виділення цілі та концентрації на ній.



Умовні позначення:

- – медіани $S_{\text{повна}}$ під час виконання субтесту А у чоловіків, $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$
- – медіани $S_{\text{повна}}$ під час виконання субтесту А у жінок, $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$

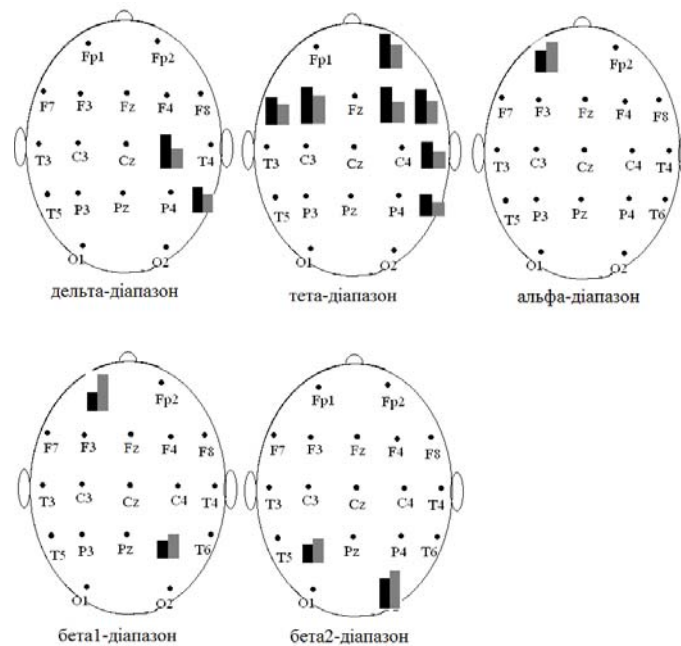
Рис. 3. Статеві відмінності спектральної потужності ЕЕГ при проходженні субтесту А

При вирішенні субтесту К у дельта – діапазоні у чоловіків виявлена значуща вища $S_{\text{повна}}$ ніж у жінок а правій півкулі у таких відведеннях, як С4А2: 76,00 [68,00; 84,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 65,00 [55,50; 71,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,01$) та Т4А2: 62,00 [51,00; 76,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 45,00 [32,00; 60,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,01$) (Рис.4). Таким чином, у чоловіків наприкінці тестування – тільки на 4 субтесті відбулась адаптація до вхідного інформаційного потоку.

У тета – діапазоні у чоловіків порівняно з жінками виявилась значуща вища $S_{\text{повна}}$ у лівій півкулі – у відведеннях F3A1: 34,00 [27,00; 56,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 26,00 [20,50; 36,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,01$) та F7A1: 27,00 [19,00; 31,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 20,00 [14,50; 24,50] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,01$) та правій півкулі, а саме у відведеннях: Fp2A2: 41,00 [31,00; 49,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 27,50 [24,00; 31,50] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$); F4A2: 42,00 [29,00; 58,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 24,50 [14,00; 32,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$); F8A2: 32,00 [20,00; 53,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 21,00 [11,50; 23,50] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,001$); T4A2: 26,00 [16,00; 42,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 16,00 [12,00; 16,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,01$); T6A2: 22,00 [14,00; 43,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ в порівнянні з 14,00 [11,00; 22,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,01$) (Рис.4), що свідчить про збереження чоловіками раніше сформованої мережі.

У лівій префронтальній зоні (відведення Fp1A1) у жінок була виявлена значуща більша $S_{\text{повна}}$ в альфа – діапазоні 28,50 [21,50; 51,50] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$, ніж у чоловіків 21,00 [16,00; 27,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,01$) та в бета1 – діапазоні - 19,00 [10,80; 37,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 10,00 [8,40; 14,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,01$) (Рис.4), що може свідчити про підвищення уваги та контролю за нерелевантною інформацією (Рис.4). Крім того, в бета1 – діапазоні у жінок виявилась значуща більша $S_{\text{повна}}$, порівняно з чоловіками в P4A2: 12,00 [9,10; 14,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 8,90 [6,80; 10,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,01$), що може свідчити про активацію правої ангулярної звивини та залучення образних метафор [9] до виділення спільних ознак у наданих словах.

У бета2 – діапазоні у жінок виявилась значуща більша $S_{\text{повна}}$, ніж у чоловіків у таких відведеннях, як P3A1: 13,00 [10,00; 18,50] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 10,00 [9,00; 12,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,01$) та O2A2: 19,00 [16,50; 34,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ порівняно з 15,00 [10,00; 17,00] $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$ ($p < 0,01$) (Рис.4). Таким чином, жінки, в більшій мірі ніж чоловіки задіяли ліву ангулярну звивину до створення вербальних інтермодальних асоціацій [9] при пошуку слова із списку запропонованих, що об'єднувало обидва надані слова.



Умовні позначення:

- – медіани $S_{\text{повна}}$ під час виконання субтесту К у чоловіків, $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$
- – медіани $S_{\text{повна}}$ під час виконання субтесту К у жінок, $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$

Рис. 4. Статеві відмінності у спектральній потужності ЕЕГ при проходженні субтесту К

Висновки. В результаті проведеного дослідження було виявлено, що завдання на визначення вербально-го інтелекту (субтести "Логічний Відбір", "Загальні Риси", "Класифікації" та "Аналогії" тесту структури інтелекту Амтхауера) у чоловіків вирішувались в рамках єдиної нейромережі. При цьому, порівняно з жінками, у них в більшій мірі була задіяна права півкуля, тобто залучались образні сприйняття та обробка вербальної інформації, а також, здійснювався більш селективний відбір інформації та вибір цілі. У жінок порівняно з чоловіками в субтестах "Класифікації" та "Аналогії" в більшому ступені обробка інформації здійснювалась в локальних нейромережах задньої асоціативної кори.

Список використаних джерел

1. Абульханова-Славская К.А., Брушлинский А.В., Рубинштейн С.Л. Философско-психологическая концепция. – М.: Наука, 1989. – С. 7-15.
2. Елисеев О. Тест структуры интеллекта (TSI) Амтхауера: Практикум по психологии личности. – Питер, 2001. – 560 с.
3. Дружинин В. Тест интеллекта // Амтхауера интеллекта структуры тест. – М.: Мир. 2002. – с. 62-75.

4. Schroeder C. Low-frequency neuronal oscillations as instruments of sensory selection/ Schroeder C., Lakatos P. // Trends in Neurosciences. – 2009. – Vol.32. – №1. – P. 9-18.
5. Bernat E., Separating Cognitive Processes with Principal Components Analysis of EEG Time-Frequency Distributions/ Bernat E., Nelson L., Holroyd C // – 2008. – Vol. 7074. – 10 p.
6. Sauseng P. Control mechanisms in working memory: A possible function of EEG theta oscillations/ Sauseng P., Griesmayr B., Freunberger R // Elsevier. – 2010. – Vol.34. – 1016 p.
7. Anderson K. Theta Oscillations Mediate Interaction between Prefrontal Cortex and Medial Temporal Lobe in Human Memory/ Anderson K., Rajagovindan R., Ghacibeh G. // Oxford university press. – 2010. – Vol.20. – 1604-1612 p.
8. Klimesch W. EEG alpha oscillations: The inhibition-timing hypothesis/ Klimesch W., Sauseng P., Hanslmayr S. // Elsevier. – 2007. – Vol.53. – P.66-67.
9. Рамачадран В. Рождение раз ума. – М.: Олимп-Бизнес, 2006 – 202 с.
10. Hampshire A. The role of the right inferior frontal gyrus: inhibition and attentional control/ Hampshire A., Chamberlain S., Monti M // Elsevier. – 2010. – Vol.50. – 1313-1319 p.
11. Engel A., Fries P. Beta-band oscillations – signalling the status quo? // Elsevier. – 2010. – Vol.20. – 156-165 p.
12. Kukleta M. Cognitive Network Interactions and Beta-2 Coherence in Processing Non-Target Stimuli in Visual Oddball Task/ Kukleta M., Brázdil M., Roman R. // Physiol. Res. – 2009. – V.58. – P.139-148.

Надійшла до редколегії 30.11.15

Л. Купа, студ., Н. Филимонова, канд. физ.-мат. наук, И. Зима, канд. биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ПОЛОВЫЕ ОТЛИЧИЯ В АКТИВНОСТИ ГОЛОВОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ВЕРБАЛЬНОГО ИНТЕЛЕКТА

В исследовании добровольно приняли участие 40 человек, среди которых 20 мужчин и 20 женщин, правши, возрастом 18-23 года, студенты 1-4 курсов КНУ имени Тараса Шевченко. В результате проведенного исследования было обнаружено, что задания на определение вербального интеллекта (субтесты "Логический Отбор", "Общие черты", "Аналогии" и "Классификации") у мужчин решались в рамках единой нейросети. При этом, в сравнении с женщинами, у них, в большей мере, было задействовано правое полушарие, то есть привлекались образные восприятие и обработка информации, а также осуществлялся более селективный отбор информации и выбор цели. У женщин, в сравнении с мужчинами, в субтестах "Аналогии" и "Классификации" в большей степени обработка информации осуществлялась в локальных нейросетях задней ассоциативной коры.

Ключевые слова: тест структуры интеллекта Амтхауера, вербальный интеллект, ЕЕГ.

L. Kupa stud., N. Filimonova PhD., I. Zima PhD
Taras Shevchenko National University of Kiev, Kyiv, Ukraine

SEX DIFFERENCES IN HUMAN BRAIN ACTIVITY IN DETERMINING VERBAL INTELLIGENCE

Research included 40 voluntarily participated persons, 20 men and 20 women, right-handed, 18-23 years old, students of 1-4 year of study of Kyiv National Taras Shevchenko University. As a result of research it was found that verbal intelligence determining tasks (subtests "Logic Selection", "General Features", "Analogy" and "Classification" Amthauer's test of structure of intelligence) men resolved within a single neural network. However, comparably to women, they used right hemisphere more, herewith involved imaginative perception and processing information, and also carried out rigorous selection of information and purposes selection. Women, comparably to men, in the subtest "Analogies" and "Classification" used processing of information more in the local neural networks posterior associative cortex.

Key words: Amthauer test structure of intelligence, verbal intelligence, EEG.

УДК 616.72-002: 577.122.8

К. Дворщенко, д-р біол. наук, О. Берник, канд. біол. наук,
Є. Тіхова, асп., А. Вовк, студ., О. Корокий, канд. біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ОКИСНА МОДИФІКАЦІЯ БІЛКІВ СИРОВАТКИ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЗАПАЛЕННЯ ЗАДНЬОЇ КІНЦІВКИ ЩУРІВ

Досліджено продукти вільнорадикального окиснення білків у сироватці крові щурів за умов локального гострого запалення задньої кінцівки, та при застосуванні хондропротектора. Встановлено зниження вмісту тіолових груп білків та накопичення альдегід і кетон-динітрофенілгідрозонів. Застосування хондропротектора "Драстоп" призводило до зростання рівня білкових тіолових груп та зниження ступеня окисної модифікації білкових молекул.

Ключові слова: окисна модифікація білків, тіолові групи, захворювання суглобів, хондропротектори.

Вступ. До поширених захворювань опорно-рухового апарату належать хвороби суглобів, патологія яких складається з двох основних форм: артритів (запальні ураження суглобів) та артрозів (дистрофічно-дегенеративні ураження). Запалення супроводжує обидва типи захворювань, але при артриті запалення є первинним, а при артрозі спочатку відбувається деформація суглобу, до якої поступово приєднується запальний процес [1].

Важливу роль у розвитку та прогресуванні запалення у суглобах відіграє оксидативний стрес, який виникає внаслідок постійної генерації вільних радикалів активованими фагоцитами та за рахунок гіпоксичних процесів при роботі суглобів, що призводить до пошкодження синовіальних клітин, деструкції хрящової тканини, ерозії кісток та суглобових поверхонь. Крім того, зниження антиоксидантного захисту клітин також сприяє формуванню патології суглобів [2].

В зв'язку з вище наведеним, важливим питанням є пошук засобів для відновлення суглобів. На сьогоднішній день встановлено, що дистрофічні зміни хрящової тканини пов'язані зі зниженням вмісту хондроїтин сульфату, який є природнім компонентом міжклітинної речовини хряща поряд з гіалуроновою кислотою та глюкозаміном сульфатом. Хондроїтин сульфат являє собою сульфатований протеоглікан, в якому сульфат ковалентно приєднаний до молекули хондроїтину. Він підтримує пружність та щільність хряща [3]. Тому дослідження препаратів, основу яких складає хондроїтин сульфат, є перспективним у профілактиці та лікуванні захворювань суглобів. В наших експериментах було досліджено препарат "Драстоп", основною складовою частиною якого є хондроїтин сульфат.

Метою роботи було дослідити дію препарату "Драстоп" на окисну модифікацію білків та рівень сульфгідрильних груп у сироватці крові при гострому локальному запаленні задньої кінцівки щурів.

Об'єкт та методи досліджень. Дослідження проведені на білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях масою 180-240 г з дотриманням загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 року), інших міжнародних угод та національного законодавства у цій галузі. За добу до проведення експерименту тварин піддавали харчовій депривації з вільним доступом до води.

Усіх тварин розділяли на три експериментальні групи. Моделювання набряку кінцівки щурів викликали субплантарним введенням 0,1 мл 1% розчину каррагі-

нану у задню праву кінцівку тварини [4]. Третій групі тварин за одну годину до введення каррагінану внутрішньом'язово вводили у терапевтичній дозі 3 мг/кг препарат "Драстоп" (об'єм речовини складав 1 мл/кг). Контрольна група щурів отримувала еквівалентну кількість фізіологічного розчину.

Вміст продуктів окисної модифікації білків (ОМБ) та олігопептидів визначали за рівнем карбонільних похідних, які виявляються в реакції з 2,4-динітрофенілгідрозоном [5]. Рівень загальних, білок-зв'язаних та небілкових сульфгідрильних (SH)-груп вимірювали за методом Елмана [6]. Статистичну обробку результатів дослідження проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики [7]. Вірогідність різниці між контрольними та дослідними вимірами оцінювали за t-критерієм Ст'юдента.

Результати та їх обговорення. Згідно даних літератури [8, 9], в умовах окисного стресу одним з ранніх індикаторів ураження клітин є окисна модифікація білків. Індукторами продукції ОМБ виступають активні форми кисню, збільшення вільного заліза, продукти перекисного окиснення ліпідів на фоні зниження системи антиоксидантного захисту. Вільні радикали атакують білки по всій довжині поліпептидного ланцюга, порушуючи не тільки первинну, але і вторинну та третинну їх структуру, що призводить до агрегації або фрагментації білкової молекули. Інтенсивність окисної модифікації білків визначається особливостями амінокислотного складу білків. Акцепторними групами, що здатні перехоплювати електрони, взаємодіючи з активними формами кисню та утворювати аніон-радикали, можуть бути дисульфідні, сульфгідрильні, карбонільні, карбоксильні та аміногрупи білків. Накопичення таких модифікованих білків порушує нормальне функціонування клітини та сприяє розвитку різних патологічних станів в організмі в цілому [10].

Встановлено, що у щурів при гострому запаленні задньої кінцівки, індукованого каррагінаном, у сироватці крові спостерігається збільшення рівня окисно-модифікованих білків (табл. 1). Зокрема, зростає рівень нейтральних альдегідних продуктів (макс. абсорбції при 356 нм) – в 1,8 раза та нейтральних кетонних продуктів (E_{max} = 370 нм) відповідно – в 1,7 раза порівняно з контролем. За тих же умов експерименту у сироватці крові кількість основних альдегідних продуктів (максимум поглинання при 430 нм) збільшується в 1,6 раза відносно контрольної групи тварин, при цьому вміст основних кетонних продуктів (E_{max} = 530 нм) залишається на рівні контролю (табл. 1).

Таблиця 1. Вміст продуктів окисної модифікації білків у сироватці крові щурів при гострому запаленні задньої кінцівки та при введенні хондропротектора, ум.од. × мг білка⁻¹ (M ± m, n = 4)

Показник	Продукти нейтрального характеру		Продукти основного характеру	
	356 нм, альдопохідні	370 нм, кетопохідні	430 нм, альдопохідні	530 нм, кетопохідні
Контроль	0,134 ± 0,014	0,114 ± 0,012	0,092 ± 0,009	0,043 ± 0,005
Каррагінан	0,232 ± 0,021*	0,193 ± 0,021*	0,141 ± 0,015*	0,051 ± 0,005
Каррагінан + Драстоп	0,161 ± 0,015#	0,132 ± 0,013#	0,113 ± 0,012#	0,052 ± 0,006

* – p < 0,05 відносно контролю; # – p < 0,05 відносно групи тварин, яким вводили каррагінан

При введенні препарату "Драстоп" щурам з експериментальною моделлю гострого локального запалення в сироватці крові спостерігається зниження ступеню окисної модифікації білків (табл. 1): знижується вміст нейтральних альдегідних продуктів – в 1,4 раза, нейтральних кетонних продуктів – в 1,5 раза та основних альдегідних продуктів – в 1,3 раза порівняно з групою тварин з експериментальною моделлю гострого локального запалення.

Другим важливим критерієм білкової модифікації є окиснення їх сульфгідрильних груп, яке може відбуватися як прямим, так і ферментативним шляхом за участю глутатіонпероксидази та гідроперекисей ліпідів.

Швидкість і характер окиснення сульфгідрильних груп залежать від багатьох чинників: концентрація реагентів, pH, температура, pKa, просторове розташування SH-груп у білку та їх мікрооточення [11].

Встановлено, що за умов гострого запалення у сироватці крові щурів вміст сульфгідрильних груп знижується: небілкових SH-груп – в 1,5 раза, білкових та загальних SH-груп – в 1,7 раза відносно контролю (табл. 2). Встановлене зниження вмісту сульфгідрильних груп у сироватці крові щурів за умов гострого запалення, індукованого каррагінаном, свідчить про накопичення ковалентних зв'язків за участю цистеїну та метіоніну, а також про окиснення SH-груп.

Таблиця 2. Вміст сульфгідрильних (SH-) груп у сироватці крові щурів при гострому запаленні задньої кінцівки та при введенні хондропротектора, мкмоль × мг білка⁻¹ (M ± m, n = 4)

Показник	Контроль	Каррагінан	Каррагінан + хондропротектор
небілкові SH-групи	0,23 ± 0,02	0,15 ± 0,01*	0,17 ± 0,01*
білкові SH-групи	4,11 ± 0,24	2,43 ± 0,25	3,76 ± 0,29#
загальні SH-групи	4,34 ± 0,27	2,58 ± 0,26	3,93 ± 0,32#

* – p < 0,05 відносно контролю; # – p < 0,05 відносно групи тварин, яким вводили каррагінан

При введенні хондропротектора тваринам з каррагінан-індукованим запаленням у сироватці крові рівень білкових та загальних сульфгідрильних груп зростає в 1,5 раза відносно групи щурів, яким вводили лише каррагінан. За даних експериментальних умов вміст небілкових тіолових груп залишається на рівні групи щурів при гострому запаленні задньої кінцівки (табл. 2).

Отримані результати свідчать, що в умовах гострого локального запалення задньої кінцівки у сироватці крові зростає рівень вільних радикалів, що призводить до порушення нативної конформації білків з утворенням білкових агрегатів або фрагментів білкової молекули. Утворення карбонільних похідних білків у сироватці крові щурів при каррагінановому запаленні може відбуватися декількома шляхами. По-перше, за участю залишків проліну, аргініну, лізину, треоніну з утворенням аддуктів Міхаеля, при цьому карбонілювання аргініну та лізину супроводжується втратою одного або декількох атомів азоту. По-друге, карбонільні похідні білків можуть формуватись за участю амінокислотних залишків лізину, цистеїну та гістидину з продуктами перекисного окиснення ліпідів. Карбонільні групи білків, які утворились внаслідок перетворення карбоксильних груп під дією вільних радикалів, можуть взаємодіяти з аміногрупами, утворюючи шиффові основи, які є баластом для клітин, що дестабілізує мембрани та сприяє деструкції клітин [12].

Виявлене нами зниження сульфгідрильних груп пов'язане з виснаженням рівня небілкових низькомолекулярних тіолів (цистеїну, глутатіону, дигідроліпоевої кислоти та ін.) та порушенням нативної структури і пригніченням активності тіолових ферментів за рахунок

блокування їх сульфгідрильних груп (глутатіонпероксидази, глутатіонтрансферази, глутатіонредуктази, АТФази, дегідрогенази). Крім того, зменшення рівня тіолових груп може порушувати процеси транспорту та пасивної проникності іонів крізь мембрану, а в крові зміна нативного стану тіолових груп може призвести до порушення функціонування гемоглобіну [13].

Отже, окисна модифікація викликає зміни структурної організації білків, їх агрегацію та денатурацію, що може призвести до порушення або втрати функціональної активності протеїнів (каталітичної, регуляторної, транспортної, рецепторної та ін.). Крім того, утворений пул модифікованих білків робить їх більш чутливими до протеолізу, що сприяє подальшій інтенсифікації деструктивних процесів. Окиснені білки здатні виступати в якості джерела вільних радикалів, виснажувати запаси клітинних антиоксидантів (глутатіон, аскорбінова кислота). У молекулярних механізмах вільнорадикальних процесів окисна модифікація білків може спричинити деструкцію інших молекул (ліпіди, ДНК) клітини, що сприятиме розвитку та прогресуванню захворювань [14, 15]. Відповідно, окиснені білки є не тільки показниками ступеня вільнорадикального пошкодження клітини, але і його активними співучасниками.

Виявлене зниження рівня окиснення білкових молекул у сироватці крові при введенні хондроїтин сульфату щурам з експериментальною моделлю гострого локального запалення пов'язано з антизапальними, антирадикальними та регенераційними властивостями препарату "Драстоп" на хрящову тканину. Хондроїтин сульфат є одним з основних компонентів екстрацелюлярно-

го матрикса хряща та є складовою протеогліканових комплексів основної речовини хрящової тканини. Він володіє вираженою гідрофільністю за рахунок наявності карбоксильної та сульфатної груп, що сприяє нормальному функціонуванню хряща та збереженню його еластичності. Хондроїтин сульфат активує анаболічні процеси за рахунок стимуляції синтезу протеогліканів і колагену, а також пригнічує синтез ферментів деструкції хряща (металопротеїнази 3, 9, 13, 14; катепсину-бета, лейкоцитарної еластази) [16].

Висновки. Таким чином, при гострому локальному запаленні задньої кінцівки, індукованого введенням каррагану, у сироватці крові зростає рівень окисно-модифікованих білків та знижується вміст сульфгидрильних, що свідчить про загальне зміщення редокс-балансу крові у прооксидантний бік. Встановлено, що при введенні хондропротектора "Драстоп" шурам з експериментальною моделлю локального запалення в сироватці крові відбувається відновлення досліджуваних показників білкової модифікації, що пов'язано з антизапальною та антиоксидантною дією досліджуваного препарату.

Список використаних джерел

1. Man G.S. Osteoarthritis pathogenesis – a complex process that involves the entire joint/ Man G.S., Mologhianu G. // Journal Medicine Life. – 2014. – Vol. 7, №1. – P. 37-41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
2. Ziskoven C. Physiology and pathophysiology of nitrosative and oxidative stress in osteoarthritic joint destruction / Ziskoven C., Jäger M., Kircher J. et al. // Cancer Journal Physiological Pharmacology. – 2011. – Vol. 89, №7. – P. 455-466. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
3. Muzzarelli R.A. Chitosan, hyaluronan and chondroitin sulfate in tissue engineering for cartilage regeneration: a review/ Muzzarelli R.A., Greco F., Busilacchi A. et al // Carbohydrate Polymers Journal. – 2012. – Vol. 89, №3. – P. 723-739. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
4. Morris C.J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse/ Morris C.J. // Methods in Molecular Biology. – 2003. – Vol. 225. – P. 115-121. Available from: <http://link.springer.com/protocol/10.1385/1-59259-374-7%3A115>
5. Дубинина Е.Е. Окислительные модификации белков сыворотки крови человека, метод ее определения/ Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О.,

Ходов Д.А., Поротов И.Г. // Вопросы медицинской химии. – 1995. – № 1. – С. 24–26. Available from: <http://pbmc.ibmc.msk.ru/index.php/ru/article/PBMC-1995-41-1-24-ru>

6. Ellman G. Tissue sulfhydryl groups / G. Ellman // Archives Biochemistry Biophysics. – 1959. – Vol. 82, №1. – P. 70–77. Available from: <http://aufsi.auburn.edu/recommendedmethods/01B06.pdf>

7. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. – М.: Информполиграф, 2002. – 305 с. Available from: <http://www.twirpx.com/file/1440496/>

8. Dahl J.U. Protein quality control under oxidative stress conditions/ Dahl J.U., Gray M.J., Jakob U. // Journal Molecular Biology. 2015. – Vol. 427, №7. – P. 1549-1563. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

9. Pajares M. Redox control of protein degradation/ Pajares M., Jiménez-Moreno N., Dias I.H. et al. // Redox Biology. – 2015. – Vol. 6. – P. 409-420. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

10. Breusing N. Biomarkers of protein oxidation from a chemical, biological and medical point of view/ Breusing N., Grune T. // Experimental Gerontology. – 2010. – Vol. 45, №10. – P. 733-737. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

11. Vázquez-Torres A. Redox active thiol sensors of oxidative and nitrosative stress/ Vázquez-Torres A. // Antioxidant Redox Signaling – 2012. – Vol. 17, №9. – P. 1201-1214. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

12. Domingues R.M. Lipoxidation adducts with peptides and proteins: deleterious modifications or signaling mechanisms?/ Domingues R.M., Domingues P., Melo T. et al. // Journal Proteomics. – 2013. – Vol. 92. – P. 110-131. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

13. Meyer A. Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups / A. Meyer, R. Hell // Photosynthesis Research. – 2005. – Vol. 86. – P. 435–457. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

14. Cecarini V. Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism/ Cecarini V., Gee J., Fioretti E. et al. // Biochemistry Biophysics Acta. – 2007. – Vol. 1773, №2. – P. 93-104. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

15. Valko M. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease/ Valko M., Leibfriz D., Moncol J. et al. // International Journal Biochemistry Cell Biology – 2007. – Vol. 39. – P. 44–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

16. Martel-Pelletier J. Discrepancies in composition and biological effects of different formulations of chondroitin sulfate/ Martel-Pelletier J., Farran A., Montell E. et al. // Molecules. – 2015. – Vol. 20, №3. – P. 4277-4289. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Надійшла до редколегії 03.12.15

К. Дворщенко, д-р биол. наук, О. Берник, канд. биол. наук, Е. Тихова, асп., А. Вовк, асп., А. Короткий, канд. биол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ СИРОВАТКИ КРОВИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ВОСПАЛЕНИЯ ЗАДНЕЙ КОНЕЧНОСТИ КРЫС

Исследованы продукты свободнорадикального окисления белков в сыворотке крови крыс в условиях локального острого воспаления задней конечности, и при введении хондропротектора. Установлено снижение содержания тиоловых групп белков и накопление альдегид и кетон-динитрофенилгидразонив. Применение хондропротектора "Драстоп" приводило к повышению уровня белковых тиоловых групп и снижению степени окислительной модификации белковых молекул.

Ключевые слова: окислительная модификация белков, тиоловые группы, заболевания суставов, хондропротекторы.

K. Dvorshchenko, DSc., O. Bernuk, PhD., E. Tihova, PhD stud., A. Vovk, PhD stud., A. Korotkiy, PhD
Taras Shevchenko National University of Kiev, Kyiv, Ukraine

OXIDATIVE MODIFICATION OF PROTEINS OF BLOOD SERUM OF RATS IN EXPERIMENTAL INFLAMMATION OF RAT HIND LIMBS

It was studied products of free radical oxidation of proteins in the rat's serum under acute local inflammation of the posterior limbs and with injection of chondroprotectors. We established decrease level of protein's SH-groups and the accumulation of aldehyde and keton-dinitrophenylhydrazoniv. Administration of chondroprotector "Drastop" led to increase level of protein SH-groups upon decrease oxidative modification of protein molecules.

Keywords: oxidative modification of proteins, SH-groups, joint diseases, chondroprotectors.

УДК 616.61-008-091:612.08

С. Зінабадінова, асп., Ю. Чайковський, д-р мед. наук
Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ,
Т. Сегеда, д-р біол. наук
Київський університет імені Бориса Грінченка, Київ

ОСОБЛИВОСТІ СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ НИРОК КУРЯЧИХ ЕМБРІОНІВ ПРИ ДІЇ ВОЛОКОН АЗБЕСТУ ТА ВУГЛЕЦЕВИХ НАНОВОЛОКОН

У сучасному світі виробляється величезна кількість речовин та матеріалів, їх вплив на організми, що розвиваються, залишається нез'ясованим. Структурна подібність вуглецевих нановолокон та волокон азбесту викликає серйозні хвилювання щодо їх безпечності. Як органи детоксикації, нирки, привертають особливу увагу. В статті досліджено токсичний вплив, який чинять вуглецеві нановолокна та волокна азбесту на тканини нирок. В дослідженні продемонстровано, що вуглецеві нановолокна потенційно здатні поводити себе як волокна азбесту. Вони викликають значні порушення нормальної структури тканин нирок курячих ембріонів. Нами були задокументовані паренхіматозні та змішані дистрофії, десквамації епітелію. Проведені комплексні (гістологічні та морфометричні) дослідження демонструють, що азбест становить найбільшу небезпеку.

Ключові слова: азбест, нирки, вуглецеві нановолокна, курячий ембріон.

Вступ. На сьогоднішній день в усьому світі зростає увага до розвитку нанотехнологій. Одними із найперспективніших є волокнисті вуглецеві наноматеріали. Враховуючи, що обсяги їх виробництва постійно розширюються, і надалі очікується тісний контакт людини та інших біологічних об'єктів із наночасточками, вивчення потенційних ризиків їх використання розглядається в якості одного з першочергових завдань [1]. Аналогічна ситуація, проте з природним волокнистим матеріалом – азбестом, спостерігалась в минулому у зв'язку з його активним впровадженням у будівництво та інші сфери людської діяльності. Ентузіазм світової спільноти різко впав після виявлення канцерогенних властивостей цього матеріалу. Тож цілком закономірно, що все більше дослідників працюють над проблемою порівняння біологічних ефектів і властивостей азбесту та вуглецевих нановолокон – найближчого структурного аналога азбесту серед наноматеріалів [2].

Відомі на сьогодні дослідження негативних впливів азбесту на живі організми стосуються переважно пневмоконіозів – хронічних захворювань легень, зумовлених тривалим вдиханням пилу. Вважається, що довжина та форма азбестового волокна визначають його фізичні властивості і біологічну агресивність. Так, волокна азбесту амфіболового типу більш щільні, довгі, практично не розчиняються в кислотах та біологічних рідинах. Хризотиліновий азбест вважають інертним щодо живих організмів, оскільки його волокна "м'якші" за амфіболові, розчиняються у біологічних рідинах, краще виводяться з організму [3-5].

З огляду на відмічену специфіку вивчення патогенної дії азбесту, більшість відомих на сьогодні досліджень щодо порівняння його біологічних впливів з вуглецевими наноматеріалами стосуються змін у дихальній системі [6]. Проте у літературі зустрічаються поодинокі документування фактів спроможності азбесту проникати через біологічні бар'єри, спричиняти злоякісні переродження у шлунково-кишковому тракті [7], у жіночій статевій системі [8], та викликати рак гортані [9]. Для вуглецевих нановолокон також існують беззаперечні підтвердження їх високої проникаючої здатності, тобто можливості легко проходити крізь мембрани клітин та долати різні біологічні бар'єри [10].

Отож, наголосимо на відсутності необхідного об'єму знань та доцільності розширення сфери вивчення біо-

логічних ефектів, спричинених дією азбесту і вуглецевих наноматеріалів.

Матеріали і методи. Експеримент здійснено на курячих ембріонах, інкубованих з яєць лінії Хай-Лайн. Матеріал був розділений на три групи:

I група – контрольна (КГ), Об'єктам (у кількості 43 штуки) вводили суспензію біосумісного декстрану.

II група – експериментальна (ЕГ-Х). Об'єктам (у кількості 19 штук) вводили суспензію хризотилінового азбесту.

III група – експериментальна (ЕГ-НВ). Об'єктам (у кількості 35 штук) вводили суспензію вуглецевих нановолокон.

Використана біологічна модель розроблена за методикою В.П. Терещенко, патент України №49464. Об'єктам на третю добу інкубації (терміни зумовлені закономірностями розвитку кровоносної системи) вводили суспензії волокон азбесту або вуглецевих нановолокон на біосумісному декстрані. Разова підтримуюча доза активованого вугілля для дорослої людини вагою 70 кг складає 1,0 г. З урахуванням середньої ваги жовтка яйця (22 г) ми вираховували дозу для введення у жовтковий мішок зародка: $22 \times 1:70 \cdot 000 = 0,31$ мг. Стерилізація матеріалу здійснювалась за $t^\circ 120^\circ\text{C}$ впродовж 60 хвилин. Кількість рідини, що вводилася (0,2 мл) є допустимим для введення у експериментах з курячими зародками. Відбір зародків проводили на 20 добу інкубації. Морфологічна верифікація здійснювалась на забарвлених гематоксиліном і еозинем гістологічних препаратах печінки. Для вивчення біологічних ефектів, спричинених інтродукованими волокнами, були обрані такі органи зародка, як нирки, оскільки за участю саме цих структур відбуваються основні процеси детоксикації та виведення шкідливих речовин з організму курячого ембріону. Результати були піддані статистичній обробці за допомогою U-критерію Манна-Уїтні.

Результати та їх обговорення. Гістологічні дослідження препаратів тканин нирок виявили значні структурні порушення у морфології даного органу, що спостерігались в експериментальних групах. Природа цих змін в цілому мала дистрофічний характер. Особливо деградаційним процесам підлягав епітелій каналців нирок, причому при плановому огляді дистрофічні зміни епітелію звивистих каналців носили більш тяжкий ступінь, аніж зміни епітелію прямих каналців (рис. 1).

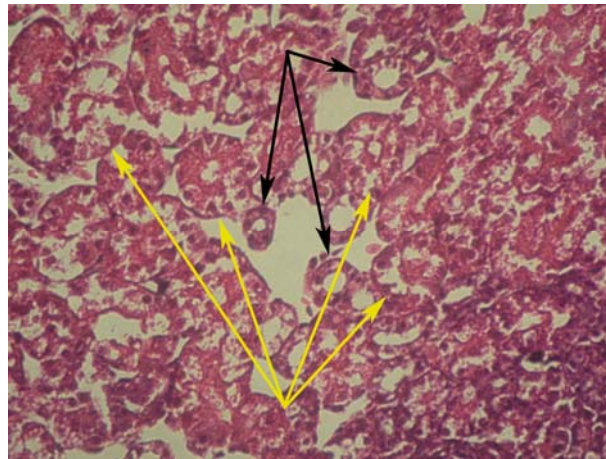


Рис. 1. Мікрофотографія тканини нирок 20-денного зародка ЕГ-НВ. Жовті стрілки – звивисті ниркові каналі, чорні стрілки – прямі каналці. Забарвлення гематоксином і еозином, об. 40х, ок. 10х.

До патологічних змін епітелію, характерних для обох експериментальних груп, можна віднести різко означену гідропічну (вакуольну) дистрофію. Були присутні базальний та апікальний набряк клітин епітелію.

із частковою або повною деградацією плазмалемми клітин. У експериментальній групі із введенням азбесту відмічалось відкладення кальцінатів в просвітах ниркових каналців (рис. 2).

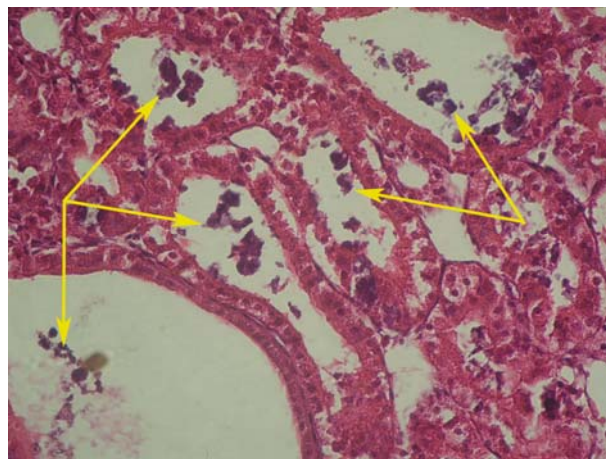


Рис. 2. Мікрофотографія тканин нирок 20-денного зародка ЕГ-Х. Стрілками показані кальцифікати у просвіті ниркових каналців. Забарвлення гематоксином і еозином, об. 40х, ок. 10х.

Отже за результатами досліджень виявлені патологічні зміни, індуковані дією часточок, в обох експериментальних групах мали переважно дистрофічний характер. Зміни морфо-функціонального стану тканин нирок, викликані дією нановолокон, мали менший прояв, ніж у групі із введенням азбесту, та були однотипного характеру: спостерігались ознаки білкової зернистої та гідропічної дистрофії епітелію ниркових каналців. Особливостями патологічних змін в експериментальній групі із введенням часточок азбесту стало накопичення кальцінатів в просвіті ниркових каналців.

Після проведення гістологічного дослідження тканин нирок ембріонів були відмічені значні порушення мор-

фології ниркових каналців. Для того, щоб мати змогу оцінити та порівняти ступінь пошкоджень, спричинених дією нановолокон та азбесту, були задіяні морфометричні методики. Для усіх груп були виміряні показники площі епітелію прямих та звивистих ниркових каналців, і на основі статистичної обробки результатів були зроблені наступні висновки.

Порівняльний аналіз площі епітелію звивистих каналців виявив достовірні відмінності за даним показником у всіх експериментальних групах порівняно із результатами контролю (таблиця 1).

Таблиця 1. Порівняльний аналіз площі епітелію звивистих ниркових каналців у зародків контрольної та експериментальних груп

Назва групи	Медіана з довірчим інтервалом для середнього, мкм ²
Контрольна	11221±3366
ЕГ-Х	23703±7111*
ЕГ-НВ	10725±3217*

Примітка: тут і далі * - різниця між контрольною та експериментальною групою вірогідна при $p \leq 0,05$.

У групі із введенням азбесту відмічалось збільшення середнього значення площі епітеліоцитів більш ніж у

два рази, порівняно з контрольною групою. Окрім того, у цій групі спостерігалась значна дисперсія цього пока-

зника. Спираючись на результати гістологічного дослідження, збільшення площі епітелію можна пояснити за рахунок значної вакуолізації клітин, що мала місце в ЕГ-Х із введенням азбесту. Отримані результати свідчать про значну деструктивну дію волокон азбесту на епітелій, а також передбачають вагомий вплив на процеси фільтрації ще й за рахунок звуження просвіту ниркових каналців. Результати морфометричного аналізу площі епітелію ниркових каналців у ЕГ-НВ із введенням нановолокон показали певне зменшення середнього значення цього показника порівняно з контролем. Також була відмічена достовірна різниця між даними значеннями для експериментальних груп із введенням азбесту та нановолокон, що беззаперечно свідчить про

різний ступінь дії, яку чинять волокна азбесту та нановолокна на епітелій звивистих ниркових каналців.

Морфометричний аналіз площі епітелію прямих ниркових каналців виявив достовірні відмінності за даним параметром при порівнянні показників ЕГ-Х із введенням азбесту та контрольною групою (було відмічено збільшення площі епітелію в ЕГ-Х більш ніж у 2,5 рази), а також при порівнянні середніх значень даного показника серед ЕГ із введенням азбесту та нановолокон (спостерігалось збільшення площі епітелію у 2,8 рази у групі із введенням азбесту). Статистична обробка даних вимірювання площі епітелію прямих ниркових каналців в ЕГ-НВ із введенням нановолокон не виявила значущих відмінностей порівняно з контрольною групою. Результати морфометричних досліджень представлені в таблиці 2.

Таблиця 2. Порівняльний аналіз площі епітелію прямих ниркових каналців у зародків контрольної та експериментальних груп

Назва групи	Медіана з довірчим інтервалом для середнього, мкм ²
Контрольна	3543±1119
ЕГ-Х	9476±2842*
ЕГ-НВ	3409±1367

Висновки.

На підставі аналізу отриманих експериментальних даних можна зробити наступні висновки:

1. Вуглецеві нановолокна та волокна азбесту викликають значні порушення нормальної структури тканин нирок курячих ембріонів.

2. Для обох експериментальних груп характерні набряки досліджуваних органів, а також прояви паренхіматозних (білкових) дистрофій.

3. Відмінними ознаками тератогенного впливу азбесту на курячі ембріони є розвиток змішаних дистрофій (утворення кальцифікатів).

4. За даними комплексних (гістологічних та морфометричних) досліджень документовано більшу виразність руйнівного впливу на органи детоксикації волокон азбесту порівняно з нановолокнами.

Список використаних джерел

1. Картель М.Т. Концепція методології ідентифікації та токсичних досліджень наноматеріалів і оцінки ризику для людського організму та довкілля при їх виробництві та застосуванні / М.Н. Картель, В.П. Терещенко // Хімія, фізика і технологія поверхності. – Вып.14. – К.: Наукова думка, 2008. – С. 565-583.

2. Asbestos-like Pathogenicity of Long Carbon Nanotubes Alleviated by Chemical Functionalization / Hanene Ali-Boucetta, Antonio Nunes, Raquel Sainz [et.al.] // Angewandte Chemie International Edition. – 2013. – Vol. 52, №8. – P. 2274-78.

3. Гігієнічні проблеми використання хризотилового азбесту в Україні / Ю.І. Кундієв, В.І. Чернюк, Т.К. Кучерук, А.Н. Каракашян // Гігієна і санітарія. – 2008. – Т.4, №16. – С. 116-124.

4. Greillier L. Mesothelioma and asbestos-related pleural diseases // Respiration. – 2008. – Vol. 76, №1. – P. 3-15.

5. Pfau J.C. Directions and needs in asbestos research / J.C. Pfau, M. Pershouse, E.A. Putnam // Immunotoxicol. – 2008. – Vol. 2, №5. – P. 123-127.

6. The toxicological impact of nanoparticles / S.E. Miles, A. Sandrini, A.R. Johnson [et.al.] // Occup. Med. Toxicol. – 2008. – Vol. 8, №3. – P. 201-212.

7. Chrysotile-asbestos induces cytogenetic effects in the rat's mesothelium in vitro and in vivo / L.N. Pylev, O.V. Smirnova, L.A. Vasileva [et.al.] // Гігієна і санітарія. – 2014. – №2. – С. 97-100.

8. Rai A.J. Association of malignant mesothelioma and asbestos related conditions with ovarian cancer: shared biomarkers and a possible etiological link // Chem Lab Med. – 2011. – V. 49, №1. – P. 5-17.

9. Sturgis E.M. Asbestos exposure and laryngeal cancer // Ear Nose Throat J. – 2010. – Vol. 89, №3. – P. 104.

10. Barua S. Challenges associated with Penetration of Nanoparticles across Cell and Tissue Barriers: A Review of Current Status and Future Prospects / S. Barua, S. Mitragotri // Nano Today. – 2014. – Vol 9, №2. – P. 223-243.

Надійшла до редколегії 22.12.15

С. Зинабадинова, асп., Ю. Чайковский, д-р мед. наук
Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, Киев, Украина,
Т. Сегеда, д-р биол. наук
Киевский университет имени Бориса Гринченка, Киев, Украина

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПОЧЕК КУРИНЫХ ЭМБРИОНОВ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ВОЛОКОН АСБЕСТА И УГЛЕРОДНЫХ НАНОВОЛОКОН

В современном мире происходит огромное количество веществ и материалов, влияние которых на развивающиеся организмы остается невыясненным. Очевидное структурное сходство углеродных нановолокон и волокон асбеста вызывает серьезные опасения по поводу их безопасности. Изучение почек, как органов детоксикации, особенно важно. В данной статье исследовано токсическое влияние, которое оказывают углеродные нановолокна и волокна асбеста на ткани почек. В исследовании продемонстрировано, что углеродные нановолокна потенциально способны вести себя как асбестовые волокна. Они вызывают значительные нарушения нормальной структуры тканей почек куриных эмбрионов. Мы задокументировали паренхиматозные и смешанные дистрофии, десквамации эпителия. Проведенные комплексные (гистологические и морфометрические) исследования демонстрируют, что асбест является наиболее опасным.

Ключевые слова: асбест, почки, углеродные нановолокна, куриный эмбрион.

S. Zinabadinova, PhD stud., Yu. Tchaikovsky, MD
Bogomolets national medical university, Kyiv, Ukraine,
T. Segeda, DSc
Borys Grinchenko Kyiv University, Kyiv, Ukraine

FEATURES OF STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CONDITIONS OF CHICKEN EMBRYO KIDNEYS WHICH ARE CAUSED BY ASBESTOS FIBERS AND CARBON NANOWIRES

There is a great number of substances and materials produced nowadays but their influence on the developing organisms remains unclear. The apparent structural link between carbon nanowires and asbestos fibers has generated serious doubts about their safety profile. As a detoxifying organs, kidneys become particularly important. In this study we investigate the toxic effects of asbestos fibers and carbon nanowires on kidney tissues. Our research demonstrate that carbon nanowires have the potential to behave like asbestos fibers. They cause considerable disruption of normal kidney tissues structure of chick embryos. We documented the parenchymal and mixed dystrophy, epithelial desquamation. The carried out complex (histologic and morphometric) studies show that the fibers of asbestos poses the greatest danger.

Keywords: asbestos, kidneys, carbon nanowires, chicken embryo.

Наукове видання



ВІСНИК

КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

**ПРОБЛЕМИ РЕГУЛЯЦІЇ
ФІЗІОЛОГІЧНИХ ФУНКЦІЙ**

Випуск 2(19)

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. № 215-7370.
Гарнітура Arial. Папір офсетний. Друк офсетний. Вид. № Б 7.
Підписано до друку 14.07.15

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