

Наведено експериментальні дані про особливості будови, розвитку і функціонування рослинних і тваринних організмів, флору і фауну України, одержані науковцями ННЦ "Інститут біології та медицини" 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.

Приведены экспериментальные данные об особенностях строения, развития и функционирования растительных и животных организмов, полученные учеными УНЦ "Институт биологии и медицины" 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 ESC "Institute of Biology and medicine". Results of newly pathophysiological aspects and biochemical mechanisms of cell and organism processes regulation under the influence of different factors are presented.

For scientists, professors, aspirants and students.

ВІДПОВІДАЛЬНИЙ РЕДАКТОР	Л. І. Остапченко, д-р біол. наук, проф.
РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ	Є. О. Торгалло, канд. біол. наук (відп. секр.); С. Є. Вакал, канд. біол. наук (техн. секр.); О. В. Жолос, д-р біол. наук, проф.; Брайон Каленгхем, д-р мед. наук, проф. (м. Кембридж, Великобританія); Т. В. Берегова, д-р біол. наук, проф.; С. В. Пилипенко, д-р біол. наук, проф. (м. Полтава, Україна); М. Є. Дзержинський, д-р біол. наук, проф.; О. Я. Склярів, д-р мед. наук, проф. (м. Львів, Україна); Абенаволі Людовіко, д-р мед. наук (м. Катандзаро, Італія)
Адреса редколегії	ННЦ "Інститут біології та медицини"; просп. акад. Глушкова, 2а, Київ, Україна, 03127 ☎ (38044) 521-35-98; www.biovestnik.com ; bulletin.vestnik@gmail.com
Затверджено	Вченою радою ННЦ "Інститут біології та медицини" 12.11.18 (протокол № 5)
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 № 16052-4524 Р від 09.11.09
Засновник та видавець	Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет". Свідоцтво внесено до Державного реєстру ДК № 1103 від 31.10.02
Адреса видавця	ВПЦ "Київський університет" (кімн. 43), 6-р Т. Шевченка, 14, Київ, Україна, 01601 ☎ (38044) 239 31 72, 239 32 22; факс 239 31 28
Журнал входить до наукометричних баз:	Index Copernicus (з 2012 р. ICV-2017 = 56,09), 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.).

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

For scientists, professors, aspirants and students.

Наведено експериментальні дані про особливості будови, розвитку і функціонування рослинних і тваринних організмів, флору і фауну України, одержані науковцями ННЦ "Інститут біології та медицини" 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.

Приведены экспериментальные данные об особенностях строения, развития и функционирования растительных и животных организмов, полученные учеными УНЦ "Институт биологии и медицины" 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.

EDITOR-IN-CHIEF	Ostapchenko Lyudmila, D. Sci., Prof.
EDITORIAL BOARD	Torgalo Elizabeth, PhD; Sergii Vakal, PhD (Tech. Editor); Alexander Zholos, D. Sci., Prof.; Brian Callingham, D. Sci., M. D., Prof. (Cambridge, United Kingdom); Tetiana Berehova, D. Sci., Prof.; Sergey Pilipenko, D. Sci., Prof. (Poltava, Ukraine); Mykola Dzerzhynskyi, D. Sci., Prof.; Olexandr Sklyarov, D. Sci., M. D., Prof. (Lviv, Ukraine); Ludovico Abenavoli, PhD, M. D., Assoc. Prof. (Catanzaro, Italy)
Editorial address	ESC "Institute of Biology and Medicine", 2a, acad. Glushkov av., Kyiv, 03127, Ukrainian ☎ (38044) 521 35 98; www.biovestnik.com; bulletin.vestnik@gmail.com
Approved by	The Academic Council of the ESC "Institute of Biology and Medicine" 12.11.18 (Protokol № 5)
Attested by	Higher Attestation Commission of Ukraine HAC Presidio decree № 1-05/3 (April 14th, 2010)
Registered by	Ministry of Justice of Ukraine. Registration certificate KV № 16053-4524 ПР (November 9th, 2009)
Founded and Published	Kyiv National Taras Shevchenko University, Kiev, Ukraine, Publishing and Printing Center "Kiev University". The certificate is entered in the State Register DK № 1103 (October 31th 2002)
Publisher's Address	Publishing and Printing Centre "Kiev University" (off. 43), 14 Taras Shevchenko av., Kiyv, 01601, Ukraine ☎ (38044) 239 31 72, 239 32 22; Fax: 239 31 28
Abstracted and Indexed:	Index Copernicus (of 2012. ICV-2017 = 56,09), Cite Factor (of 2014), Research Bible (of 2013). Academic Keys (of 2013), DOAJ (of 2013), EBSCO.EJS (of 2012), Free medical journals list of Geneva Foundation for Medical Education and Research (of 2014); HINARI (of 2013 of); Medical Journals Links (of 2013); OAJI (of 2012); The Knowledge Network (of 2014); Ulrich's Periodicals Directory (of 2012); WorldCat (of 2013); E-Library.ru (of 2014).

ЗМІСТ

Блохіна О., Драницина А., Кот Л., Хілько В., Дворченко К. Вільнорадикальні процеси в сироватці крові щурів за умов каррагінан-індукованого запалення задньої кінцівки та тривалого профілактичного введення хондроїтину сульфату	6
Василюк Д., Дмитрик В., Луговська Т., Яковлев П. Біохімічні показники крові на різних стадіях раку сечового міхура	9
Заєць В., Османова К., Крупська І. Клонування та гетерологічна експресія фрагмента кДНК гена протеїнкінази Akt1 миші в <i>ESCHERICHIA COLI</i>	14
Калмикова О., Юрченко А., Держинський М. Вплив різних режимів введення мелатоніну на розвиток висококалорійного ожиріння у щурів	19
Вознюк В., Філімонова Н., Макарчук М., Зима І., Горбунов О., Кальниш В. Регуляція серцевого ритму та активність головного мозку бійців із черепно-мозковими травмами та посттравматичним стресовим розладом при здійсненні реакції вибору	26
Шевцова А., Ткаченко В., Кот Ю. Неферментативна модифікація білків та рівень галектину-3 у щурів з експериментальною ішемією міокарда	31
Янко Р. Поєднаний вплив переривчастої нормобаричної гіпоксії та мелатоніну на морфофункціональну активність паренхіми печінки щурів	36
Вілецька Ю., Мінченко Д., Давидов В., Мінченко О. Рівень експресії генів <i>ADM</i> , <i>SLC1A3</i> , <i>HSPA5</i> та <i>PDGFC</i> у підлітків і дорослих чоловіків з ожирінням	41
Вовк А., Короткий О., Янковський Д., Торгалю Є., Дворченко К. Вміст ТБК-активних сполук і активність антиоксидантних ферментів у сироватці крові щурів за умов експериментального остеоартрозу і тривалого введення мультипробіотика	46
Дяченко Л., Степченко Л. Зміни морфофункціональних показників крові щурів на тлі застосування кормових добавок гумінової природи та за дії стрес-факторів	50
Наконечна О., Безродна А., Кривонос К. Вплив блоксополімерів на регуляцію й основні показники білкового та вуглеводного обміну в щурів в умовах підгострого токсикологічного експерименту	55
Прилуцький М., Стародуб М., Лебєдєва Т., Шпильовий П. Експресний контроль рівня поліамінів за допомогою імунобіосенсора на основі ППР	59

СОДЕРЖАНИЕ

Блохина О., Драницина А., Кот Л., Хилько В., Дворщенко К. Свободнорадикальные процессы в сыворотке крови крыс в условиях каррагинан-индуцированного воспаления задней конечности и длительного профилактического введения хондроитина сульфата.....	6
Василюк Д., Дмитрик В., Луговская Т., Яковлев П. Биохимические показатели крови при разных стадиях рака мочевого пузыря	9
Заец В., Османова М., Крупская И. Клонирование и гетерологическая экспрессия фрагмента кДНК гена протеинкиназы Akt1 мыши в <i>ESCHERICHIA COLI</i>	14
Калмыкова О., Юрченко А., Дзержинский Н. Влияние разных режимов введения мелатонина на развитие высококалорийного ожирения у крыс	19
Вознюк В., Филимонова Н., Макачук Н., Зима И., Горбунов О., Кальниш В. Регуляция сердечного ритма и активность головного мозга бойцов с черепно-мозговыми травмами и посттравматическим стрессовым расстройством при осуществлении реакции выбора	26
Шевцова А., Ткаченко В., Кот Ю. Неферментативная модификация белков и уровень галектина-3 у крыс с экспериментальной ишемией миокарда	31
Янко Р. Сочетанное влияние прерывистой нормобарической гипоксии и мелатонина на морфофункциональную активность паренхимы печени крыс.....	36
Вилецька Ю., Минченко Д., Давыдов В., Минченко О. Уровень экспрессии генов <i>ADM</i> , <i>SLC1A3</i> , <i>HSPA5</i> и <i>PDGFC</i> у подростков и взрослых мужчин с ожирением	41
Вовк А., Короткий А., Янковский Д., Торгалю Е., Дворщенко Е. Содержание ТБК-активных соединений и активность антиоксидантных ферментов в сыворотке крови крыс в условиях экспериментального остеоартроза и длительного введения мультипробиотика.....	46
Дяченко Л., Степченко Л. Изменения морфофункциональных показателей крови крыс на фоне использования кормовых добавок гуминовой природы и под влиянием стресс-факторов	50
Наконечная О., Безродная А., Кривonos К. Влияние блоксополимеров на регуляцию и основные показатели белкового и углеводного обмена у крыс в условиях подострого токсикологического эксперимента	55
Прилуцкий М., Стародуб Н., Лебедева Т., Шпылевой П. Экспрессный контроль уровня полиаминов с помощью иммуобиосенсора на основе ППР	59

CONTENTS

Blokhina O., Dranitsina A., Kot L., Khilko V., Dvorshchenko K. Free-radical processes in serum of rats under conditions of carrageenan-induced inflammation of the hind limb and prolonged prophylactic administration of chondroitin sulfate	6
Vasyliuk D., Dmytryk V., Luhovska T., Yakovlev P. Biochemical indicators of blood in different grades of bladder cancer	9
Zayets V., Osmanova K., Krupskaya I. Cloning and heterological expression of cDNA fragment of mouse protein kinase gene Akt1 in <i>ESCHERICHIA COLI</i>	14
Kalmukova O., Yurchenko A., Dzerzhinsky M. The effects of different mode of melatonin administration on the development of high-calorie diet-induced obesity in rats	19
Vozniuk V., Filimonova N., Makarchuk M., Zyma I., Horbunov O., Kalnyh V. Features of heart rate regulation and activity of the brain during testing the reaction of choice in the military man with traumatic brain injury	26
Shevtsova A., Tkachenko V., Kot Yu. Non-enzymatic modification of proteins and the level of galectin-3 in the rats with experimental myocardial ischemia	31
Yanko R. The combined influence of the intermittent normobaric hypoxia and melatonin on morphofunctional activity of the rat's liver parenchyma	36
Viletska Y., Minchenko D., Davydov V., Minchenko O. The level of <i>ADM</i> , <i>SLC1A3</i> , <i>HSPA5</i> and <i>PDGFC</i> gene expressions in obese adolescents and adult men	41
Vovk A., Korotkyi O., Yankovsky D., Torgalo Ye., Dvorshchenko K. Content of TBA-active compounds and activity of antioxidant enzymes in rat serum under experimental osteoarthritis and long-term administration of multiprobiotic	46
Diachenko L., Stepchenko L. Changes of morpho-functional indicators in blood of rats after the influence of feed additives of humic natural and for actions of stress factors	50
Nakonechna O., Bezrodnaya A., Krivonos K. Effect of bloxopolymers on regulation and main indicators of the protein and carbohydrate metabolism in rats under conditions of subject toxicological experiment	55
Prylutskyi M., Starodub N., Lebyedyeva T., Shpylovyy P. Express control of levels of polyamines by immune biosensor based on SPR	59

ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНІ ПРОЦЕСИ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ КАРРАГІНАН-ІНДУКОВАНОГО ЗАПАЛЕННЯ ЗАДНЬОЇ КІНЦІВКИ ТА ТРИВАЛОГО ПРОФІЛАКТИЧНОГО ВВЕДЕННЯ ХОНДРОЇТИНУ СУЛЬФАТУ

Досліджено профілактичну дію хондроїтину сульфату на вміст активних форм кисню та продуктів перекисного окиснення ліпідів у сироватці крові щурів при локальному запаленні задньої кінцівки.

Дослідження проведені на білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях масою 180–240 г із дотриманням загальних етичних принципів експериментів на тваринах. Усіх тварин поділяли на чотири експериментальні групи. Перша група – контроль: тваринам субплантарно вводили 0,1 мл 0,9 %-го розчину NaCl у задню праву кінцівку. Друга група – щурам щоденно протягом 28 днів внутрішньом'язово вводили терапевтичну дозу 3 мг·кг⁻¹ хондроїтину сульфату. Третя група – тваринам щоденно протягом 28 днів внутрішньом'язово вводили 0,1 мл 0,9 %-го розчину NaCl у задню праву кінцівку та на 29-й день моделювали її запальний набряк (субплантарно вводили 0,1 мл 1 %-го розчину каррагінану в задню праву кінцівку). Четверта група – щурам щоденно протягом 28 днів внутрішньом'язово вводили терапевтичну дозу 3 мг·кг⁻¹ хондроїтину сульфату, після чого на 29-й день моделювали запальний набряк кінцівки. Загальна кількість тварин, залучених до експериментальних досліджень, становила 40 особин. Вміст супероксидного радикала в сироватці крові визначали за утворенням ХТТ-формазану. Вміст пероксиду водню вимірювали в системі сорбітол-ксиленол оранж. Вміст дієнових кон'югатів визначали в гептан-ізопропанольному екстракті спектрофотометричним, шиффових основ – флуориметричним методом; вміст ТБК-активних сполук – за реакцією з тіобарбітуровою кислотою.

Установлено, що при каррагінан-індукованому запаленні задньої кінцівки в сироватці крові зростає вміст активних форм кисню (O₂^{·-}, H₂O₂) і продуктів перекисного окиснення ліпідів. Показано, що при профілактичному введенні препарату на основі хондроїтину сульфату тваринам з каррагінан-індукованим запаленням вищевказані показники відновлювались.

Ключові слова: гостре запалення кінцівки, хондроїтину сульфат, активні форми кисню, перекисне окиснення ліпідів, сироватка крові.

Вступ. Провідне місце серед захворювань займають патології опорно-рухового апарату, зокрема хвороби суглобів. Патогенез більшості захворювань суглобів (ревматоїдний, реактивний, інфекційний артрити, ідіопатичний анкілозуючий спондилоартрит, подагричний артрит, деформуючий остеоартроз, бурсит) відбувається внаслідок розвитку запалення, яке проявляється як місцево в самому суглобі, так і системно – в організмі в цілому. Згідно з даними літератури важливу роль у запальних процесах відіграє інтенсифікація вільнорадикальних процесів. Тому стан окисно-антиоксидантної системи в організмі має важливе значення в патогенезі захворювань суглобів [1, 2].

При тривалому запаленні в суглобі спостерігаються дегенеративні зміни хрящової тканини, що призводить до його структурно-функціональних змін. У зв'язку з цим важливим є пошук препаратів, які б володіли регенераційними, протизапальними й антирадикальними властивостями. Серед таких сполук важливе місце займає хондроїтину сульфат, який є специфічним компонентом хряща, що забезпечує його пружність і щільність [3]. За даними літератури, крім відомої структурної функції, молекули хондроїтину сульфату здатні проявляти антизапальні й антиоксидантні властивості [4, 5]. Тому дослідження біологічної дії хондроїтину сульфату на організм є перспективним у профілактиці та лікуванні захворювань суглобів.

У зв'язку з цим метою роботи було дослідити профілактичну дію хондроїтину сульфату на вміст активних форм кисню та продуктів перекисного окиснення ліпідів у сироватці крові щурів за умов каррагінан-індукованого запалення задньої кінцівки.

Об'єкт і методи досліджень. Дослідження проведені на білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях масою 180–240 г із дотриманням загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 року), інших міжнародних угод і національного законодавства у цій галузі. За добу до проведення експерименту тварин піддавали харчовій депривації з вільним доступом до води.

Усіх тварин розділяли на чотири експериментальні групи. Перша група – контроль: тваринам субплантарно вводили 0,1 мл 0,9 %-го розчину NaCl у задню праву кінцівку. Друга група – тваринам щоденно протягом 28 днів внутрішньом'язово вводили терапевтичну дозу 3 мг·кг⁻¹ хондроїтину сульфату (препарат "Драстоп", "WORLD MEDICINE", Great Britain). Третя група – тваринам щоденно протягом 28 днів внутрішньом'язово вводили 0,1 мл 0,9 %-го розчину NaCl у задню праву кінцівку та на 29-й день моделювали її запальний набряк: тваринам субплантарно вводили 0,1 мл 1 %-го розчину каррагінану в задню праву кінцівку [6]. Четверта група – тваринам щоденно протягом 28 днів внутрішньом'язово вводили терапевтичну дозу 3 мг·кг⁻¹ хондроїтину сульфату, після чого щурам субплантарно вводили 0,1 мл 1 %-го розчину каррагінану в задню праву кінцівку. Тварин умертвляли через 3 год після ін'єкції розчину каррагінану згідно з протоколом етичного комітету, після чого швидко робили забір крові для подальших досліджень. Загальна кількість тварин, залучених до експериментальних досліджень, становила 40 особин.

Вміст супероксидного радикала визначали за утворенням ХТТ-формазану [7]. Вміст пероксиду водню вимірювали у системі сорбітол-ксиленол оранж [8]. Вміст дієнових кон'югатів визначали в гептан-ізопропанольному екстракті спектрофотометричним методом, шиффових основ – флуориметричним методом [9, 10]. Вміст ТБК-активних сполук визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [11]. Статистичну обробку результатів дослідження проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики [12].

Результати та їх обговорення. У нашій роботі ми досліджували інтенсивність вільнорадикальних процесів

сів за вмістом у сироватці крові АФК: супероксидного радикала та пероксиду водню. Установлено, що в щурів при експериментальному запаленні задньої кінцівки в сироватці крові вміст АФК зростає: супероксидного радикала – в 1,7 раза, пероксиду водню – в 1,5 раза відносно контролю (табл. 1). У групі тварин з експериментальною моделлю локального запалення, яким профілактично вводили препарат на основі хондроїтину сульфату, у сироватці крові спостерігається відновлення досліджуваних показників. За даних експериментальних умов у сироватці крові знижується рівень супероксидного радикала в 1,4 раза та пероксиду водню – в 1,3 раза порівняно з групою щурів з гострим запаленням кінцівки (табл. 1). Показано, що хондропротектор не впливає на рівень досліджуваних показників у сироватці крові контрольної групи тварин.

Таблиця 1. Вміст активних форм кисню в сироватці крові щурів за умов каррагінан-індукованого запалення задньої кінцівки та тривалого профілактичного введення хондроїтину сульфату ($M \pm m$, $n = 10$)

Групи тварин	Показник	Супероксидний радикал, мкмоль ХТТ-формазану $\times$ мг білка ⁻¹	Пероксид водню, мкмоль $\times$ мг білка ⁻¹
Контроль		4,63 $\pm$ 0,45	0,28 $\pm$ 0,03
Хондроїтин сульфат		4,24 $\pm$ 0,42	0,31 $\pm$ 0,03
Каррагінан		7,83 $\pm$ 0,75*	0,43 $\pm$ 0,04*
Каррагінан + хондроїтин сульфат		5,75 $\pm$ 0,54*#	0,34 $\pm$ 0,03#

* – $p < 0,05$ відносно контролю; # – $p < 0,05$ відносно групи тварин, яким вводили каррагінан

Виявлене нами посилення генерації АФК у сироватці крові щурів за умов запалення задньої кінцівки може спричиняти інтенсифікацію процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), що може призводити до порушення основних біохімічних процесів у організмі.

У ході проведених експериментів нами було досліджено вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів у сироватці крові, а саме: первинних продуктів ПОЛ – дієнових кон'югатів, проміжних продуктів ПОЛ – ТБК-

активних сполук, головним з яких є малоновий діалдегід, і кінцевих продуктів ПОЛ – шиффових основ. Установлено, що в щурів при запаленні задньої кінцівки, індукованому каррагінаном, у сироватці крові вміст продуктів перекисації ліпідів зростає: дієнових кон'югатів – в 1,6 раза, ТБК-активних сполук – в 1,5 раза та шиффових основ – в 1,3 раза порівняно з показниками контрольних тварин (табл. 2).

Таблиця 2. Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів у сироватці крові щурів за умов каррагінан-індукованого запалення задньої кінцівки та тривалого профілактичного введення хондроїтину сульфату ($M \pm m$, $n = 10$)

Групи тварин	Показник	Дієнові кон'югати, нмоль $\times$ мг білка ⁻¹	ТБК-активні сполуки, нмоль $\times$ мг білка ⁻¹	Шиффові основи, ум. од. $\times$ мг білка ⁻¹
Контроль		46,38 $\pm$ 4,27	18,23 $\pm$ 1,79	3,54 $\pm$ 0,33
Хондроїтин сульфат		48,23 $\pm$ 4,52	16,92 $\pm$ 1,68	3,62 $\pm$ 0,35
Каррагінан		75,67 $\pm$ 7,31*	27,89 $\pm$ 2,61*	4,72 $\pm$ 0,43*
Каррагінан + хондроїтин сульфат		58,19 $\pm$ 5,42*#	22,11 $\pm$ 2,14#	3,82 $\pm$ 0,36#

* – $p < 0,05$ відносно контролю; # – $p < 0,05$ відносно групи тварин, яким вводили хондропротектор

При тривалому профілактичному введенні хондроїтину сульфату тваринам з каррагінан-індукованим запаленням у сироватці крові спостерігається зниження рівня продуктів ПОЛ: дієнових кон'югатів і ТБК-активних сполук – в 1,3 раза та шиффових основ – в 1,2 раза відносно групи тварин з моделлю гострого запалення задньої кінцівки (табл. 2). Виявлено, що введення щурам хондроїтину сульфату не впливає на вміст досліджуваних параметрів ліпідної перекисації в сироватці крові контрольної групи тварин (табл. 2).

Виявлене нами в сироватці крові щурів при каррагінан-індукованому запаленні задньої кінцівки підвищення генерації АФК є пусковою ланкою каскаду реакцій, які зумовлюють виникнення інших вільних радикалів. Супероксидний радикал і пероксид водню є попередниками утворення сильного окиснювача – гідроксид-радикала, продукту трьохелектронного відновлення кисню, який пошкоджує біологічні молекули. Біологічні ефекти вищезазначених інтермедіатів кисню реалізуються опосередковано – через посилення процесів перекисного окиснення ліпідів і накопичення відповідних радикалів і гідропероксидів. Зафіксоване нами накопичення продуктів ПОЛ за даних експериментальних умов указує на розвиток запалення, оскільки відомо, що продукти ПОЛ є маркерами ексудативно-деструктивного запалення, які, з одного боку, виконують роль регуляторів запального процесу, а з іншого – цитотоксичних факторів, що роблять внесок у розвиток ускладнень [13, 14, 15].

Тривале профілактичне введення хондроїтину сульфату тваринам із запаленням задньої кінцівки сприяє зниженню прояву окисного стресу в організмі: вміст АФК і продуктів ПОЛ знижується в сироватці крові. Установлений ефект пов'язаний як з антизапальними, так і з антиоксидантними властивостями досліджуваного препарату. З літературних даних відомо, що хондроїтин сульфат у хондроцитах і клітинах синовіальної мембрани знижує ядерну транслокацію NF κ B – ядерного фактора, який є ключовою ланкою в розвитку запальних та імунних реакцій [16]. Крім того, молекула хондроїтину сульфату володіє власною антиоксидантною активністю. За рахунок функціональних груп вона здатна хелатувати іони перехідних металів (залізо, мідь та ін.), які беруть безпосередню участь у ініціюванні реакцій Фентона та Хабер-Вейса, що призводить до зменшення утворення вільних радикалів [17].

Висновки. Згідно з отриманими результатами експериментальних досліджень показано, що при каррагінан-індукованому запаленні задньої кінцівки в сироватці крові щурів спостерігається інтенсифікація утворення АФК і продуктів ПОЛ, що свідчить про зсув окисно-антиоксидантної рівноваги у прооксидантний бік і розвиток окисного стресу. Тривале профілактичне введення хондроїтину сульфату щурам з експериментальною моделлю локального запалення задньої кінцівки в си-

роватці крові зумовлює зниження утворення вільних радикалів і продуктів ліпідної пероксидації.

Список використаних джерел:

1. Insights on Molecular Mechanisms of Chondrocytes Death in Osteoarthritis / E. Charlier, B. Relic, C. Deroyer et al. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2016. – Vol. 17(12).
2. Reactive oxygen species and NADPH oxidase 4 involvement in osteoarthritis / S. Drevet, G. Gavazzi, L. Grange et al. // *Exp/Gerontol.* – 2018. – Vol. 111. – P. 107–117.
3. Chondroitin sulphate: a focus on osteoarthritis / M. Bishnoi, A. Jain, P. Hurkat, S. Jain // *Glycoconj. J.* – 2016. – Vol. 33, № 5. – P. 693–705.
4. Chondroitin sulphate: antioxidant properties and beneficial effects / G. M. Campo, A. Avenoso, S. Campo et al. // *Mini Rev. Med. Chem.* – 2006. – Vol. 6(12). – P. 1311–1320.
5. Chondroitin-4-sulphate inhibits NF- κ B translocation and caspase activation in collagen-induced arthritis in mice / G. M. Campo, A. Avenoso, S. Campo et al. // *Osteoarthritis and cartilage.* – 2008. – Vol. 16, Issue 12. – P. 1474–1483. doi: <https://doi.org/10.1016/j.joca.2008.04.002>.
6. Morris C. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse / C. Morris // *Methods Mol. Biol.* – 2003. – Vol. 225. – P. 115–121.
7. Able A. Use of new tetrazolium-based assay to study the production of superoxide radicals by tobacco cell cultures challenged with avirulent zoospores of *Phytophthora parasitica varnicotianae* / A. Able, D. Guest, M. Sutherland // *Plant Physiol.* – 1998. – Vol. 177, № 2. – P. 491–499.
8. Jiang Z. Y. Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation / Z. Y. Jiang, A. C. Woollard, S. P. Wolff // *FEBS Lett.* – 1990. – Vol. 268, № 1. – P. 69–71.
9. Гаврилов В. Б. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов / В. Б. Гаврилов, А. Р. Гаврилова, Н. Ф. Хмара // *Лабораторное дело.* – 1988. – № 2. – С. 60–63.
10. Колесова О. Е. Окисление липидов и методы определения продуктов липопероксидации в биологических средах / О. Е. Колесова, А. А. Маркин, Т. Н. Федорова // *Лабораторное дело.* – 1984. – № 9. – С. 540–546.
11. Стальная И. Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили // *Современные методы в биохимии.* – М.: Медицина, 1977. – С. 66–68.
12. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных / О. Ю. Реброва. – М.: Информполиграф, 2002.
13. Emerging Players at the Intersection of Chondrocyte Loss of Maturational Arrest, Oxidative Stress, Senescence and Low-Grade Inflammation in Osteoarthritis / M. Minguzzi, S. Cetrullo, S. D'Adamo et al. // *Oxid. Med. Cell Longev.* – 2018: 3075293.
14. Umesh C. Ramana Regulation of NF- κ B-Induced Inflammatory Signaling by Lipid Peroxidation-Derived Aldehydes / C. Umesh, F. Yadav, V. Kota // *Oxid. Med. Cell Longev.* – 2013: 690545.
15. The role of oxidative and nitrosative stress in the pathology of osteoarthritis: Novel candidate biomarkers for quantification of degenerative changes in the knee joint / A. Franz, L. Laura Joseph, C. Mayer et al. // *Orthop. Rev. (Pavia).* – 2018. – Vol. 10(2). – P. 7460.
16. Chondroitin sulphate inhibits NF- κ B activity induced by interaction of pathogenic and damage associated molecules / T. Stabler, Z. Huang, E. Montell et al. // *Osteoarthritis Cartilage.* – 2017. – Vol. 25(1). – P. 166–174.
17. Effect of the chelation of metal cation on the antioxidant activity of chondroitin sulfates / K. Ajsaka, Y. Oyanagi, T. Miyazaki, Y. Suzuki // *Biosci Biotechnol Biochem.* – 2016. – Vol. 80(6). – P. 1179–1185.

References

1. Charlier E., Relic B., Deroyer C., Malaise O., Neuville S., Collée J., Malaise M., De Seny D. Insights on Molecular Mechanisms of Chondrocytes Death in Osteoarthritis // *Int. J. Mol. Sci.* – 2016. – Vol. 17(12). – pii: E2146. doi: [10.3390/ijms17122146](https://doi.org/10.3390/ijms17122146).
2. Drevet S., Gavazzi G., Grange L., Dupuy C., Lardy B. Reactive oxygen species and NADPH oxidase 4 involvement in osteoarthritis // *Exp/*

Gerontol. – 2018. – Vol. 111. – P. 107–117. doi: [10.1016/j.exger.2018.07.007](https://doi.org/10.1016/j.exger.2018.07.007).

3. Bishnoi M., Jain A., Hurkat P., Jain S. Chondroitin sulphate: a focus on osteoarthritis // *Glycoconj. J.* – 2016. – Vol. 33, №5. – P. 693–705. doi: [10.1007/s10719-016-9665-3](https://doi.org/10.1007/s10719-016-9665-3).
4. Campo G., Avenoso A., Campo S., Ferlazzo A., Calatroni A. Chondroitin sulphate: antioxidant properties and beneficial effects // *Mini Rev. Med. Chem.* – 2006. – Vol. 6(12). – P. 1311–1320.
5. Campo G., Avenoso A., Campo S., D'Ascola A., Traina P., Calatroni A. Chondroitin-4-sulphate inhibits NF- κ B translocation and caspase activation in collagen-induced arthritis in mice // *Osteoarthritis and cartilage.* – 2008. – Vol. 16, Issue 12. – P. 1474–1483. doi: <https://doi.org/10.1016/j.joca.2008.04.002>.
6. Morris C.J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse // *Methods Mol. Biol.* – 2003. – Vol. 225. – P. 115–121. Available from: <http://link.springer.com/protocol/10.1385/1-59259-374-7%3A115>
7. Able A., Guest D., Sutherland M. Use of new tetrazolium-based assay to study the production of superoxide radicals by tobacco cell cultures challenged with avirulent zoospores of *Phytophthora parasitica varnicotianae* // *Plant Physiol.* – 1998. – Vol. 177, № 2. – P. 491–499.
8. Jiang Z., Woollard A., Wolff S. Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation // *FEBS Lett.* – 1990. – Vol. 268, № 1. – P. 69–71.
9. Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Хмара Н.Ф. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов // *Лабораторное дело.* – 1988. – № 2. – С. 60–63.
10. Колесова О.Е., Маркин А.А., Федорова Т.Н. Перекисное окисление липидов и методы определения продуктов липопероксидации в биологических средах // *Лабораторное дело.* – 1984. – № 9. – С. 540–546.
11. Стальная И.Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И.Д. Стальная, Т.Г. Гаришвили // *Современные методы в биохимии.* – М.: Медицина, 1977. – С. 66–68. Available from: <http://www.twirpx.com/file/254926/>
12. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. – М.: Информполиграф, 2002. – 305 с. Available from: <http://www.twirpx.com/file/1440496/>
13. Minguzzi M., Cetrullo S., D'Adamo S., Silvestri Y., Flamigni F., Borzi R.M. Emerging Players at the Intersection of Chondrocyte Loss of Maturational Arrest, Oxidative Stress, Senescence and Low-Grade Inflammation in Osteoarthritis // *Oxid. Med. Cell Longev.* – 2018: 3075293. Published online 2018 Feb 11. doi: [10.1155/2018/3075293](https://doi.org/10.1155/2018/3075293).
14. Umesh C., Yadav F., Kota V. Ramana Regulation of NF- κ B-Induced Inflammatory Signaling by Lipid Peroxidation-Derived Aldehydes // *Oxid. Med. Cell Longev.* – 2013: 690545. Published online 2013 Apr 17. doi: [10.1155/2013/690545](https://doi.org/10.1155/2013/690545).
15. Franz A., Laura Joseph L., Mayer C. et al. The role of oxidative and nitrosative stress in the pathology of osteoarthritis: Novel candidate biomarkers for quantification of degenerative changes in the knee joint // *Orthop. Rev. (Pavia).* – 2018. – Vol. 10(2). – P. 7460. doi: [10.4081/or.2018.7460](https://doi.org/10.4081/or.2018.7460)
16. Stabler T., Huang Z., Montell E., Vergés J., Kraus V. Chondroitin sulphate inhibits NF- κ B activity induced by interaction of pathogenic and damage associated molecules // *Osteoarthritis Cartilage.* – 2017. – Vol. 25(1). – P. 166–174. doi: [10.1016/j.joca.2016.08.012](https://doi.org/10.1016/j.joca.2016.08.012).
17. Ajsaka K., Oyanagi Y., Miyazaki T., Suzuki Y. Effect of the chelation of metal cation on the antioxidant activity of chondroitin sulfates // *Biosci Biotechnol Biochem.* – 2016. – Vol. 80(6). – P. 1179–1185. doi: [10.1080/09168451.2016.1141036](https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1141036).

Надійшла до редколегії 10.09.2018

Отримано виправлений варіант 8.10.2018

Підписано до друку 8.10.2018

Received in the editorial 10.09.2018

Received a revised version on 8.10.2018

Signed in the press on 8.10.2018

О. Блохина, асп.,
А. Драницина, канд. биол. наук,
Л. Кот, канд. биол. наук,
В. Хилько, студ.,
К. Дворченко, д-р биол. наук,
УНЦ "Інститут біології і медицини",
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС В УСЛОВИЯХ КАРРАГИНАН-ИНДУЦИРОВАННОГО ВОСПАЛЕНИЯ ЗАДНЕЙ КОНЕЧНОСТИ И ДЛИТЕЛЬНОГО ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО ВВЕДЕНИЯ ХОНДРОИТИНА СУЛЬФАТА

Исследовано профилактическое действие хондроитина сульфата на содержание активных форм кислорода и продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови крыс при локальном воспалении задней конечности.

Исследования проведены на белых нелинейных половозрелых крысах-самцах массой 180–240 г с соблюдением общих этических принципов экспериментов на животных. Всех животных разделяли на четыре экспериментальные группы. Первая группа – контроль: животным субплантарно вводили 0,1 мл 0,9 %-го раствора NaCl в заднюю правую конечность. Вторая группа – крысам ежедневно в течение 28 суток внутримышечно вводили терапевтическую дозу 3 мг·кг⁻¹ хондроитина сульфата. Третья группа – животным ежедневно в течение 28 суток внутримышечно вводили 0,1 мл 0,9 %-го раствора NaCl в заднюю правую конечность и на 29-й день моделировали ее воспалительный отек (субплантарно вводили 0,1 мл 1 %-го раствора каррагинана в заднюю правую конечность). Четве-

ртая группа – крысам ежедневно в течение 28 дней внутримышечно вводили терапевтическую дозу $3 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ хондроитина сульфата, после чего на 29-й день моделировали воспалительный отек конечности. Общее количество животных, вовлеченных в экспериментальные исследования, составило 40 особей. Содержание супероксидного радикала в сыворотке крови определяли по образованию ХТТ-формаза. Содержание пероксида водорода измеряли в системе сорбитол-ксиленол-оранж. Содержание диеновых конъюгатов определяли в гептан-изопропанольном экстракте спектрофотометрическим, шиффовых оснований – флуориметрическим методом; содержание ТБК-активных соединений – по реакции с тиобарбитуровой кислотой.

Установлено, что при каррагинан-индуцированном воспалении задней конечности в сыворотке крови возрастает содержание активных форм кислорода (O_2^- , H_2O_2) и продуктов перекисного окисления липидов. Показано, что при профилактическом введении препарата на основе хондроитина сульфата животным с каррагинан-индуцированным воспалением вышеуказанные показатели восстанавливались.

Ключевые слова: острое воспаление конечности, хондроитина сульфат, активные формы кислорода, перекисное окисление липидов, сыворотка крови.

O. Blokhina, PhD stud.,
A. Dranitsina, PhD,
L. Kot, PhD,
V. Khilko, stud.,
K. Dvorshchenko, DSc,
ESC "Institute of Biology and Medicine",
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

FREE-RADICAL PROCESSES IN SERUM OF RATS UNDER CONDITIONS OF CARRAGEENAN-INDUCED INFLAMMATION OF THE HIND LIMB AND PROLONGED PROPHYLACTIC ADMINISTRATION OF CHONDROITIN SULFATE

The aim of the work was to investigate the preventive effect of Chondroitin Sulfate on the content of reactive oxygen species and lipid peroxidation products in blood serum of rats at local inflammation of the hind limb.

The studies were conducted on white non-linear, sexually mature male rats weighing 180–240 g, in compliance with the general ethical principles of experiments on animals. All animals were divided into four experimental groups. The first group – control: animals sub-planar injected 0.1 ml of 0.9 % NaCl solution into the posterior right limb. The second group – animals received a therapeutic dose of $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ chondroitin sulfate daily for 28 days daily. The third group – animals were infused intramuscularly with 0.1 ml of 0.9 % NaCl solution in the posterior right limb for 28 days and for 29 days inflammatory edema of the limb was stimulated (animals were sub-planar injected with 0.1 ml of 1 % carrageenan solution to the posterior right limb). The fourth group – for 28 days rats were daily intramuscularly injected with a therapeutic dose of $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ chondroitin sulfate, after which on 29th day, inflammatory edema of the limb was stimulated. The total number of animals involved in experimental studies was 40 individuals. The content of the superoxide radical was determined by the level of ХТТ-formazan. The level of hydrogen peroxide was measured in the sorbitol-xylenol orange system. The content of diene conjugates was determined in the heptane-isopropanol extract by the spectrophotometric method. The content of Schiff bases was determined by the fluorimetric method. The content of TBA-active compounds was determined by the reaction with thiobarbituric acid.

It has been established that with carrageenan-induced inflammation of the posterior limb, the content of reactive oxygen species and lipid peroxidation products increases in the serum. It was shown that the prophylactic administration of chondroitin sulfate based drug on animals with carrageenan-induced inflammation restored the abovementioned parameters.

Key words: acute inflammation of the limb, chondroitin sulfate, reactive oxygen species, lipid peroxidation, blood serum.

УДК: 616.62-006.6-073

Д. Василюк, студ.,
В. Дмитрик, асп.,
Т. Луговська, канд. біол. наук
ННЦ "Інститут біології та медицини",
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
П. Яковлев, канд. мед. наук
Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Київ, Україна

БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ КРОВІ НА РІЗНИХ СТАДІЯХ РАКУ СЕЧОВОГО МІХУРА

Частота діагностованих онкологічних захворювань неупинно зростає. Рак сечового міхура (PCM) є сьомим за частотою випадків онкологічних захворювань серед чоловіків і сімнадцятим серед жінок у всьому світі. PCM поширеніший у розвинених країнах, на заході є четвертим за частотою випадків серед чоловіків і дев'ятим серед жінок. Характеризується високим показником смертності. Діагностика PCM не доповнена порівняно з іншими урологічними онкологічними захворюваннями. Важливою є діагностика залежно від гістопатологічної градації. Злоякісні клітини характеризуються високою проліферацією, що забезпечується прозапальними молекулами, до яких відносять IL-1 β та IL-6. Паралельно хронічному запальному процесу підвищення проникності судин може зумовлювати зміни концентрації токсинів, метаболітів і продуктів розпаду тканин у пухлинах. За умов злоякісних захворювань можуть виникати значні зміни в системі мікроциркуляції, унаслідок чого відбуваються порушення функцій лімфатичної системи, метаболізму, а також зміни біохімічних показників крові. Загальний клінічний аналіз крові, особливо кількість лейкоцитів, указує на значну відповідь клітинного імунітету в онкохворих. Найменші відхилення в гематологічних параметрах можуть свідчити про прогресування онкологічних захворювань. У нашому дослідженні біохімічних показників крові пацієнтів, хворих на PCM, простежується залежність показників загального клінічного аналізу та деяких показників біохімічного аналізу від стадії PCM за гістопатологічною градацією. Визначення досліджуваних параметрів у крові хворих на PCM виявило підвищення вмісту прозапальних цитокінів, ендотеліального фактора росту судин, сечовини, креатиніну, кількості лейкоцитів і нейтрофілів та зниження кількості еритроцитів, моноцитів, лімфоцитів і еозинофілів у динаміці згідно з гістопатологічною градацією.

Ключові слова: рак сечового міхура, IL-1 β , IL-6, VEGF, клінічний аналіз крові, біохімічний аналіз крові, гістопатологічна градація.

Вступ. Рак сечового міхура (PCM) є сьомим за частотою випадків онкологічних захворювань серед чоловіків і сімнадцятим серед жінок у всьому світі. PCM більш поширений у розвинених країнах і є четвертим за частотою випадків серед чоловіків і дев'ятим серед жі-

нок на заході [7]. Злоякісні клітини характеризуються високою проліферацією, що забезпечується прозапальними молекулами, до яких відносять IL-1 β та IL-6 [6, 14]. Паралельно хронічному запальному процесу підвищення проникності судин може призводити до зміни

концентрації токсинів, метаболітів і продуктів розпаду тканин у пухлинах. За умов злоскісних захворювань можуть виникати значні зміни в системі мікроциркуляції, унаслідок чого відбуваються порушення функцій лімфатичної системи та зміни біохімічних показників крові. Біохімічний склад крові реагує на зміни проникності клітинних мембран, ступінь і глибину клітинних пошкоджень. Дані літератури свідчать про підвищення проникності судин унаслідок неопластичного процесу. Ендотеліальний фактор росту (від англ. Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) сприяє утворенню нових кровоносних судин і підвищенню проникності судинної стінки. Рутинні дослідження загального клінічного аналізу крові є невід'ємною частиною діагностики функціонального стану онкохворих і обов'язкові перед хірургічним втручанням. Загальний клінічний аналіз крові, особливо кількість лейкоцитів, указує на значну відповідь клітинного імунітету в онкохворих. Найменші відхилення в гематологічних параметрах можуть указувати на прогресування онкологічних захворювань. Існуючі дані засвідчують прогностичну цінність кількості нейтрофілів, лімфоцитів, середнього об'єму тромбоцитів і швидкості осадження еритроцитів (ШОЕ) при різних онкологічних захворюваннях [1, 2, 20, 25, 26, 30, 31].

Метою роботи було оцінити зміни в параметрах загального клінічного аналізу крові, основних біохімічних показників, прозапальних цитокінів IL-1 β та IL-6 і VEGF у крові на різних стадіях PCM згідно з гістопатологічною градацією.

Матеріали та методи. У нашому дослідженні проведено багатопланове обстеження хворих на PCM різ-

них стадій згідно з гістопатологічною градацією. Плазма отримана з крові чоловіків із PCM. Пацієнти були поділені на чотири групи залежно від ступеня диференціації пухлини згідно з гістопатологічною градацією [16]. Заключний діагноз ставився після рентгенологічних, ендоскопічних, клінічних досліджень з обов'язковою морфологічною верифікацією. Групу хворих на PCM зі стадією G1 становили 12 чоловіків, зі стадією G2 – 14, із G3 – 13 чоловіків. Групу контролю становили 11 чоловіків без онкологічних і хронічних патологій в анамнезі. Критерії включення в аналіз – хворі на PCM різних стадій за гістопатологічною градацією. Критерій виключення – хворі на PCM з іншими захворюваннями. Кількість пацієнтів із PCM стадії G4 була недостатньою для статистичної обробки даних. Визначення клінічного та біохімічного складу плазми крові проводилися за загальноприйнятими методиками за допомогою біохімічного та гематологічного аналізаторів і мікроскопії. Вміст прозапальних цитокінів і VEGF у плазмі крові визначали методом імуноферментного аналізу в модифікації ELISA [16,19].

Результати та обговорення. Середній вік хворих стадії G1 становив 71,8 року, наймолодшому пацієнту було 62 роки, найстаршому – 82. Середній вік із G2 стадією становив 67,4 року, наймолодшому пацієнту було 46 років, найстаршому – 85. У пацієнтів із PCM зі стадією G3 середній вік становив 71,3 року, наймолодшому було 59, найстаршому – 88 років. У групі контролю середній вік становив 69,2 року. Залежності стадії PCM за гістопатологічною градацією не спостерігали, більшість пацієнтів старше 65 років (табл. 1).

Таблиця 1. Розподіл хворих залежно від стадії PCM

Показник / Група	Контроль	G1	G2	G3
Кількість хворих	11	12	14	13
Середній вік	70,1 $\pm$ 5,6	71,8 $\pm$ 6,4	67,4 $\pm$ 11,2	71,3 $\pm$ 8,9

Для контролю M $\pm$ m, n=11; для G1 M $\pm$ m, n=12; для G2 M $\pm$ m, n=14; для G3 M $\pm$ m, n=13

У клінічній практиці важливим є пошук простих і економічно доцільних способів оцінки прозапальної відповіді на злоскісні процеси. Участь імунної системи в прогресуванні злоскісних процесів активно досліджується, деякі гематологічні параметри, у тому числі зміни кількості лейкоцитів, тромбоцитів, нейтрофілів були описані як діагностичні та прогностичні фактори при різних типах злоскісних новоутворень, включаючи рак шлунка, молочних залоз, верхніх органів дихання [1, 2, 20, 25,

26, 30]. Лейкоцити, які інфільтрують пухлини, продукують прозапальні та проангіогенні фактори [1, 2, 4]. Нами було досліджено лейкоцитарну формулу крові пацієнтів, хворих на PCM, на різних стадіях. У пацієнтів, хворих на PCM, вміст лейкоцитів був достовірно збільшений на 30,4 % для G1, на 48 % – для G2 та на 66,2 % – для G3 стадії порівняно з контрольною групою. Зазначено недостовірне збільшення рівня лейкоцитів у крові пацієнтів з різними стадіями (табл. 2).

Таблиця 2. Загальний клінічний аналіз крові пацієнтів, хворих на PCM, при різних ступенях згідно з гістопатологічною градацією

Показник / Група	Контроль	G1	G2	G3
Лейкоцити (10 ⁹ /л)	4,7 $\pm$ 0,07	6,13 $\pm$ 1,26*	6,96 $\pm$ 2,11*	7,81 $\pm$ 2,66*
Еритроцити 10 ¹² /л	4,9 $\pm$ 0,05	4,68 $\pm$ 0,82	4,25 $\pm$ 0,46*	3,94 $\pm$ 0,66*
Гематокрит, %	41,51 $\pm$ 2,52	42,14 $\pm$ 8,75	37,79 $\pm$ 5,01	32,9 $\pm$ 7,15
Тромбоцити 10 ⁹ /л	247 $\pm$ 16	236 $\pm$ 2,9	226,4 $\pm$ 44,4	231,5 $\pm$ 68,7
Нейтрофіли, %	47,3 $\pm$ 4,6	57,34 $\pm$ 5,1*	66,7 $\pm$ 12,6*	71,90 $\pm$ 9,53*
Нейтрофіли 10 ⁹ /л	2,8 $\pm$ 0,54	2,83 $\pm$ 0,67	4,95 $\pm$ 1,43*	5,75 $\pm$ 2,3*
Лімфоцити, %	33,8 $\pm$ 2,2	34,4 $\pm$ 3,8	27,54 $\pm$ 10,8	23,06 $\pm$ 7,9*
Лімфоцити 10 ⁹ /л	1,6 $\pm$ 0,021	1,9 $\pm$ 0,29	1,93 $\pm$ 0,62	1,8 $\pm$ 0,84
Моноцити, %	6,95 $\pm$ 0,45	6,27 $\pm$ 1,97	4,68 $\pm$ 1,6*	4,54 $\pm$ 2,16
Моноцити 10 ⁹ /л	0,43 $\pm$ 0,08	0,36 $\pm$ 0,12	0,29 $\pm$ 0,07	0,32 $\pm$ 0,13
Еозинофіли, %	2,2 $\pm$ 0,14	2,42 $\pm$ 0,39	2,36 $\pm$ 0,62	1,57 $\pm$ 1,26
ШОЕ, мм/г	5,2 $\pm$ 0,21	4,8 $\pm$ 1,34	13,8 $\pm$ 11,9	29,6 $\pm$ 13,6*

Для контролю M $\pm$ m, n=11; для G1 M $\pm$ m, n=12; для G2 M $\pm$ m, n=14; для G3 M $\pm$ m, n=13

Нейтрофіли (нейтрофільні гранулоцити) – вид лейкоцитів, вроджені клітини імунної системи – беруть активну участь у загоєнні ран. В останні роки зростає кі-

лькість інформації, яка вказує на важливу роль нейтрофілів у розвитку, прогресуванні та резистентності пухлини до терапії [9]. Дані літератури вказують на про-

пухлинну участь нейтрофілів і на поганий подальший прогноз [24]. Рівень нейтрофілів (%) був достовірно збільшений на 21,2 % для стадії G1, на 41 % – для стадії G2 і на 52 % – для стадії G3 порівняно з контролем.

Вміст лімфоцитів, еозинофілів та моноцитів і показник гематокриту недостовірно знижувалися залежно від градієнта диференціації клітин при PCM.

Швидкість осадження еритроцитів – один з найчастіших лабораторних тестів у клінічній практиці, що використовується для дослідження імунного статусу, включаючи відповіді на інфекції, автоімунні захворювання та злоякісні новоутворення [5]. Відхилення в ШОЕ часто відс-

тежується в онкохворих. Показник ШОЕ залежить від типу злоякісного новоутворення, стадії та тривалості хвороби [29]. До того ж відхилення в ШОЕ ідентифіковане як важливий прогностичний фактор виживаності онкохворих [10, 22]. Ряд досліджень указують на підвищений рівень ШОЕ при раку товстої кишки [23], ЛОР-органів [22], голови та шиї [8], молочних залоз [10], гліоми [27], раку передміхурової залози [17] і на поганий прогноз. Нами було досліджено зміни в ШОЕ, зазначено значне, недостовірне сповільнення ШОЕ залежно від стадії PCM згідно з гістопатологічною градацією.

Таблиця 3. Основні біохімічні показники крові хворих залежно від стадії PCM згідно з гістопатологічною градацією

Показник / Група	Контроль	G1	G2	G3
Загальний білок (г/л)	63,4±1,7	73±6,3*	70,89±9,7	72,28±5,34*
Білірубін (мкмоль/л)	12,2±0,5	12,5±4,17	14,21±3,68	11,57±2,83
Креатинін (мкмоль/л)	28,6±0,4	87,8±20,8*	102,6±22,7*	101,8±35,08*
Сечовина (ммоль/л)	3,4±0,3	5,8±1,6*	6,59±2,11*	8,40±3,55*
Глюкоза (ммоль/л)	4,7±0,06	5,97±0,5*	5,9±0,6*	6,28±0,98*

Для контролю M±m, n=11; для G1 M±m, n=12; для G2 M±m, n=14; для G3 M±m, n=13

При розвитку злоякісних новоутворень спостерігається порушення обміну речовин, що має вплив на біохімічні показники крові. Зміна біохімічних показників плазми крові може бути достатньо раннім чутливим діагностичним критерієм при різних патологічних станах. У нашому дослідженні зазначено значне збільшення вмісту креатиніну: у 3,07 раза для G1; 3,56 раза – для G2 та 3,56 раза – для G3 порівняно з контролем. Рівень сечовини збільшувався в 1,7 раза для G1, 1,94 – для G2 та 2,5 раза – для G3 порівняно з контрольною групою. Концентрація глюкози була збільшена залежно від стадії PCM згідно з гістопатологічною градацією.

Під час канцерогенезу відбувається посилення ангіогенезу в тканинах пухлин. Ангіогенез є ключовим для

розвитку пухлин [12]. Клітини пухлин та оточуючі клітини секретиують VEGF, який бере участь у регуляції проліферації ендотеліоцитів, хемотаксису і диференціюванні попередників ендотеліоцитів, відіграє важливу роль у реорганізації структури позаклітинного матриксу [3, 11, 15]. VEGF є сильним мітогеном зі специфічністю до ендотеліальних клітин, а також потужним фактором посилення проникності судин [28]. У ході нашого дослідження зазначено достовірне збільшення вмісту VEGF у 2,23 раза для G1, 2,36 раза – для G2 та 2,53 раза – для G3 порівняно з контролем (табл. 4).

Таблиця 4. Вміст прозапальних цитокінів і фактора росту ендотелію судин у крові хворих залежно від стадії PCM

Показник/ Група	Контроль	G1	G2	G3
VEGF (ум. од/мл)	0,39±0,001	0,87±0,04*	0,92±0,04*	0,99±0,04*
IL-1β (ум. од/мл)	0,155±0,007	0,186±0,008*	0,227±0,01*	0,240±0,012*
IL-6 (ум. од/мл)	0,097±0,004	0,112±0,04*	0,129±0,005*	0,136±0,005*

Для контролю M±m, n=11; для G1 M±m, n=12; для G2 M±m, n=14; для G3 M±m, n=13

Прозапальні цитокіни IL-1β та IL-6 також є важливими проангіогенними факторами, які сприяють васкуляризації пухлини. Інтерлейкін 1β є плейотропним цитокіном, який відіграє значну роль у фізіологічному та патологічному станах. Відомо підвищення синтезу IL-1β при різних онкологічних захворюваннях і описана його участь як фактора прогресії пухлин через його вплив на синтез факторів росту й експресію генів, задіяних у ангіогенезі та метастатичних процесах. Онкологічні захворювання, при яких відбувається посилений синтез IL-1β, відзначаються поганим прогнозом. Інтерлейкін-6 – цитокін, який регулює імунну систему, контролюючи проліферацію й активацію цитотоксичних Т-клітин, проліферацію та диференціацію β-клітин і продукцію білків гострої фази. Дослідження інших авторів свідчать про регуляторну функцію IL-1β та IL-6 при клітинному рості та диференціації інших клітин і значну прогностичну роль вмісту циркулюючих прозапальних цитокінів та VEGF при раку простати, яєчників і верхніх органів дихання [4, 18, 21]. Зазначено значне достовірне збільшення вмісту прозапальних цитокінів і VEGF у плазмі

крові хворих на PCM при різних стадіях, а також збільшення вмісту досліджуваних показників залежно від ступеня PCM за гістопатологічною градацією, що може свідчити про посилення запальних процесів і ангіогенезу залежно від стадії PCM.

Діагностика PCM є недоповненою та бідною порівняно з іншими урологічними онкологічними захворюваннями. Важливою є діагностика залежно від гістопатологічної градації. У нашому дослідженні біохімічних показників крові пацієнтів, хворих на PCM, простежується залежність деяких показників загального клінічного та біохімічного аналізів крові від стадії PCM за гістопатологічною градацією. Дослідження вмісту прозапальних цитокінів підтверджує наявність і залежність запального процесу від стадії PCM. Показано збільшення вмісту циркулюючого в крові VEGF, який бере участь у ангіогенезі й посилює проникність судинної стінки. Отримані дані погоджуються з літературними даними при інших онкологічних захворюваннях і можуть зробити вагомий внесок у діагностичні можливості при PCM.

Список використаних джерел:

1. Venous thromboembolism and cancer: two-way clinical association / G. Agnelli et al. // *Thromb. Haemost.* – 1997. – Vol. 78, N 1. – P. 117–120.
2. Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization / K. Bajou, A. Noel, R. D. Gerard et al. // *Nat Med.* – 1998. – Vol. 4. – P. 923–928.
3. Urine based markers of angiogenesis in bladder cancer / M. Becker, D. Tilki, T. Szarvas et al. // *Urologie A.* – 2009. – Vol. 48. – P. 609–614.
4. Plasmin/plasminogen system in colorectal cancer / D. H. Berger et al. // *World J. Surg.* – 2002. – Vol. 26. – P. 767–771.
5. Cicco M. The prothrombotic state in cancer: pathogenic mechanisms / M. Cicco // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* – 2004. – Vol. 50, № 3. – P. 187–196.
6. Urokinase plasminogen activator: a prognostic marker in multiple types of cancer / M. J. Duffy, T. M. Maguire, E. W. McDermott et al. // *J. Surg. Oncol.* – 1999. – Vol. 71. – P. 130–135.
7. Prognostic significance of preoperative plasma fibrinogen in endometrial cancer / L. M. Ghezzi et al. // *Gynecol. Oncol.* – 2010. – Vol. 119. – № 2. – P. 309–313.
8. Metastasis markers in bladder cancer: a review of the literature and clinical considerations / P. Gontero, S. Banisadr, B. Frea, M. Brausi // *Eur Urol.* – 2004. – Vol. 46. – P. 296–311.
9. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-I: novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer / N. Harbeck, R. E. Kates, K. Gauger et al. // *Thromb. Haemost.* – 2004. – Vol. 91. – P. 450–456.
10. Trousseau's syndrome: cancer-associated thrombosis / S. Ikushima, R. Ono, K. Fukuda et al. // *Jpn. J. Clin. Oncol.* – 2016. – Vol. 46. – P. 204–208.
11. Plasma levels of MMPs and TIMP-1 in urinary bladder cancer patients / T. Ishchuk, D. Glavachek, O. Savchuk et al. // *Biomedical Research and Therapy.* – 2018. – Vol. 5. 1931–1940. 10.15419/bmrat.v5i1.407.
12. Plasma fibrinogen and serum C-reactive protein are associated with non-small cell lung cancer / J. M. Jones et al. // *Lung Cancer.* – 2006. – Vol. 53. – P. 97–101.
13. Kakkar A. Thrombosis and cancer: implications beyond Trousseau / A. K. Kakkar, M. N. Levine // *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* – 2004. – Vol. 2. – Issue 8. – P. 1261–1262.
14. Plasminogen activator inhibitor 1 may promote tumour growth through inhibition of apoptosis / H. C. Kwaan, J. Wang, K. Svoboda, P. J. Declerck // *Br. J. Cancer.* – 2000. – Vol. 82. – P. 1702–1708.
15. Lademann U. A. Regulation of programmed cell death by plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) / U. A. Lademann, M. U. Romer // *Thromb. Haemost.* – 2008. – Vol. 100. – P. 1041–1046.
16. Preoperative plasma fibrinogen levels in gastric cancer patients correlate with extent of tumour / J. H. Lee et al. // *Hepatogastroenterology.* – 2004. – Vol. 51. – P. 1860–1863.
17. Lima L. G. Activation of blood coagulation in cancer: implications for tumor progression / L. G. Lima, R. Q. Monteiro // *Biosci. Rep.* – 2013. – Vol. 33. – P. 701–710.
18. Loreto M. Coagulation and cancer: implications for diagnosis and management / M. F. Loreto, D. E. Martinis, M. P. Corsi // *Pathol. Oncol. Res.* – 2000. – Vol. 6, N 4. – P. 302–312.
19. Mackman R. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis / R. Mackman, Tilley & N. Key // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2007. – Vol. 27. – P. 1687–1693.
20. Plasminogen activator inhibitor-1 and -3 increase cell adhesion and motility of MDA-MB-435 B breast cancer cells / D. Palmieri, J. W. Lee, R. L. Juliano, F. C. Church // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P. 40950–40957.
21. Palta S. Overview of the coagulation system / S. Palta, R. Saroa // *Indian J. Anaesth.* – 2014. – Vol. 58. – P. 515–523.
22. Fibrinogen is an important determinant of the metastatic potential of circulating tumor cells / J. S. Palumbo et al. // *Blood.* – 2000. – Vol. 96. – P. 3302–3309.
23. Prandoni P. Cancer and venous thromboembolism: an overview / P. Prandoni, A. Piccoli, A. Girolami // *Hematologica.* – 1999. – Vol. 84. – P. 437–445.
24. Cytokine profile indicators in rat blood serum in a model of esophagus burn induced by antioxidant chemical preparation / Ya. Raetska, N. Chornenka, T. Koval et al. // *Biomedical Research and Therapy.* – 2017. – Vol. 4. 1591. 10.15419/bmrat.v4i9.367.
25. Repetto O. Coagulation and fibrinolysis in gastric cancer / O. Repetto, V. De Re // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2017. – Vol. 1404. – P. 27–48.
26. Rice K. Venous thromboembolism in urologic surgery: prophylaxis, diagnosis, and treatment / K. R. Rice, S. A. Brassell, D. G. McLeod // *Reviews in urology.* – 2010. – Vol. 12. – P. 111–24.
27. Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors: biochemical aspects / D. C. Rijken et al. // *Baillieres Clin. Haematol.* – 1995. – Vol. 8. – P. 291–312.
28. Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy / M. Schmitt, N. Harbeck, C. Thomssen et al. // *Thromb. Haemost.* – 1997. – Vol. 78. – P. 285–296.
29. The prognostic value of plasma fibrinogen levels in patients with endometrial cancer: a multi-centre trial / V. Seebacher et al. // *British Journal of Cancer.* – 2010. – Vol. 102. – P. 952–956.
30. Association of plasma urokinase-type plasminogen activator and its receptor with clinical outcome in patients undergoing radical cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder / S. F. Shariat, M. A. Monoski, B. Andrews et al. // *Urology.* – 2003. – Vol. 61. – P. 1053–1058.
31. Components of the plasminogen activator system and their complexes in renal cell and bladder cancer: comparison between normal and matched cancerous tissues / P. N. Span, J. A. Witjes, N. Grebenchtchikov et al. // *BJU Int.* – 2008. – Vol. 102. – P. 177–182.
32. Stahl A. Melanoma cell migration on vitronectin: regulation by components of the plasminogen activation system / A. Stahl, B. M. Mueller // *Int. J. Cancer.* – 1997. – Vol. 71. – P. 116–122.
33. Association between blood rheology, thrombosis and cancer survival in patients with gynecologic malignancy / G. F. Von Tempelhoff et al. // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* – 2000. – Vol. 22. – P. 107–130.

Reference

1. Agnelli G. Venous thromboembolism and cancer: two-way clinical association. Agnelli G, et al. *Thromb. Haemost.* 1997;78, N 1:117–120.
2. Bajou K., Noel A., Gerard R., et al. Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat Med.* 1998;4:923–928.
3. Becker M., Tilki D., Szarvas T., Rubben H., Ergun S. Urine based markers of angiogenesis in bladder cancer. *Urologie A.* 2009;48:609–614.
4. Berger D. Plasmin/plasminogen system in colorectal cancer. *World J Surg.* 2002;26:767–771.
5. Cicco M. The prothrombotic state in cancer: pathogenic mechanisms. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2004; 50:3:187–196
6. Duffy M., Maguire T., McDermott E., O'Higgins N. Urokinase plasminogen activator: a prognostic marker in multiple types of cancer. *J Surg Oncol.* 1999;71:130–135.
7. Ghezzi L., et al. Prognostic significance of preoperative plasma fibrinogen in endometrial cancer. *Gynecol. Oncol.* 2010;119: 309–313
8. Gontero P., Banisadr S., Frea B., Brausi M. Metastasis markers in bladder cancer: a review of the literature and clinical considerations. *Eur Urol.* 2004;46:296–311.
9. Harbeck N., Kates R., Gauger K., et al. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-I: novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer. *Thromb. Haemost.* 2004;91:450–456.
10. Ikushima, S., Ono R., Fukuda K., et al. Trousseau's syndrome: cancer-associated thrombosis. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 2016; 46: 204–208.
11. Ishchuk T., Glavachek D., Savchuk O., Yakovlev P., Falaleeva T., Beregova T., Ostapchenko L. (2018). Plasma levels of MMPs and TIMP-1 in urinary bladder cancer patients. *Biomedical Research and Therapy.* 5. 1931–1940. 10.15419/bmrat.v5i1.407.
12. Jones J., et al. Plasma fibrinogen and serum C-reactive protein are associated with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2006; 53:97–101
13. Kakkar, A., Levine M. Thrombosis and cancer: implications beyond Trousseau. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2004; 8: 1261–1262.
14. Kwaan H., Wang J., Svoboda K., Declerck P. Plasminogen activator inhibitor 1 may promote tumour growth through inhibition of apoptosis. *Br J Cancer.* 2000;82:1702–1708.
15. Lademann U., Romer M. Regulation of programmed cell death by plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1). *Thromb. Haemost.* 2008;100:1041–1046.
16. Lee J., et al. Preoperative plasma fibrinogen levels in gastric cancer patients correlate with extent of tumour. *Hepatogastroenterology.* 2004; 51: 1860–1863
17. Lima, L., Monteiro R.. 2013. Activation of blood coagulation in cancer: implications for tumour progression. *Biosci. Rep.* 33. <https://doi.org/10.1042/BSR20130057>
18. Loreto M., Martinis D., Corsi M. Coagulation and cancer: implications for diagnosis and management. *Pathol. Oncol. Res.* 2000; 6:302–312.
19. Mackman N., Tilley R., Key N. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc.* 2007. *Biol.* 27: 1687–1693.
20. Palmieri D., Lee J., Juliano R., Church F. Plasminogen activator inhibitor-1 and -3 increase cell adhesion and motility of MDA-MB-435 B breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2002;277:40950–40957
21. Palta, S., Saroa R., Palta A. 2014. Overview of the coagulation system. *Indian J. Anaesth.* 58: 515–523.
22. Palumbo J., et al. Fibrinogen is an important determinant of the metastatic potential of circulating tumor cells. *Blood.* 2000; 96:3302–3309
23. Prandoni P., Piccoli A., Girolami A. Cancer and venous thromboembolism: an overview. *Hematologica.* 1999; 84: 437–445.
24. Raetska Ya., Chornenka N., Koval T., Savchuk O., Beregova T., Ostapchenko L. Cytokine profile indicators in rat blood serum in a model of

esophagus burn induced by antioxidant chemical preparation. Biomedical Research and Therapy. 2017. 4. 1591. 10.15419/bmrat. v4i9.367.

25. Repetto L., Ombretta D. Coagulation and fibrinolysis in gastric cancer. Annals of the New York Academy of Sciences. 2017.1404. 10.1111/nyas.13454.

26. Rice K., Brassell S., McLeod D. Venous thromboembolism in urologic surgery: prophylaxis, diagnosis, and treatment //Reviews in urology. – 2010. – V.12. – P.111-24.

27. Rijken D. Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors: biochemical aspects. Baillieres Clin Haematol. 1995 ;8:291-312.

28. Schmitt M., Harbeck N., Thomssen C., et al. Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy. Thromb Haemost. 1997;78:285-296.

29. Seebacher V., et al. The prognostic value of plasma fibrinogen levels in patients with endometrial cancer: a multi-centre trial. British Journal of Cancer. 2010; 102: 952–956.

30. Shariat S., Monoski M., Andrews B., et al. Association of plasma urokinase-type plasminogen activator and its receptor with clinical outcome in patients undergoing radical cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder. Urology. 2003; 61: 1053-1058.

31. Span P., Witjes J., Grebenchtchikov N., et al. Components of the plasminogen activator system and their complexes in renal cell and bladder cancer: comparison between normal and matched cancerous tissues. BJU Int. 2008; 102: 177-182.

32. Stahl A., Mueller B. Melanoma cell migration on vitronectin: regulation by components of the plasminogen activation system. Int J Cancer. 1997;71:116-122.

33. Von Tempelhoff G., et al. Association between blood rheology, thrombosis and cancer survival in patients with gynecologic malignancy. Clin. Hemorheol. Microcirc. 2000; 22:107–130.

Надійшла до редколегії 10.09.2018

Отримано виправлений варіант 8.10.2018

Підписано до друку 8.10.2018

Received in the editorial 10.09.2018

Received a revised version on 8.10.2018

Signed in the press on 8.10.2018

Д. Василюк, студ.,

В. Дмитрик, асп.,

Т. Луговская, канд. биол. наук

УНЦ "Институт биологии и медицины"

Киевского национального университета имени Тараса Шевченко, Киев, Украина,

П. Яковлев, канд. мед. наук

Национальный медицинский университет имени А. А. Богомольца, Киев, Украина

БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ ПРИ РАЗНЫХ СТАДИЯХ РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

Частота диагностированных онкологических заболеваний возрастает. Рак мочевого пузыря (РМП) является седьмым по частоте случаев онкологических заболеваний среди мужчин и семнадцатым среди женщин во всем мире. РМП более распространен в развитых странах, на западе он четвертый по частоте случаев среди мужчин и девятый среди женщин. Характеризуется высоким показателем смертности. Диагностика РСМ является не дополненной по сравнению с другими урологическими онкологическими заболеваниями. Важна диагностика в зависимости от гистопатологической градации. Злокачественные клетки характеризуются высокой пролиферативной способностью, что обеспечивается воспалительными молекулами, к которым относят IL-1 β и IL-6. Параллельно хроническим воспалительным процессам повышение проницаемости сосудов может привести к изменению концентрации токсинов, метаболитов и продуктов распада тканей в опухолях. В условиях злокачественных заболеваний могут возникать значительные изменения в системе микроциркуляции, в результате чего происходят нарушения функций лимфатической системы, метаболизма, а также изменения биохимических показателей крови. Общий клинический анализ крови, особенно количество лейкоцитов, указывает на значительный ответ клеточного иммунитета у онкобольных. Малейшие отклонения в гематологических параметрах могут свидетельствовать о прогрессировании онкологических заболеваний. В нашем исследовании биохимических показателей крови пациентов с РМП прослеживается зависимость показателей общего клинического анализа и некоторых параметров биохимического анализа от стадии РМП по гистопатологической градации. Определение исследуемых параметров в крови у больных РМП выявило повышение содержания провоспалительных цитокинов, эндотелиального фактора роста сосудов, мочевины, креатинина, количества лейкоцитов и нейтрофилов и снижение количества эритроцитов, моноцитов, лимфоцитов и эозинофилов в динамике согласно гистопатологической градации.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, IL-1 β , IL-6, VEGF, клинический анализ крови, биохимический анализ крови, гистопатологическая градация.

D. Vasyliuk, stud.,

V. Dmytryk, PhD stud.,

T. Luhovska, PhD

ESC "Institute of Biology and Medicine",

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,

P. Yakovlev, PhD.

O. Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

BIOCHEMICAL INDICATORS OF BLOOD IN DIFFERENT GRADES OF BLADDER CANCER

The frequency of diagnosed cancer is increasing. Bladder cancer (BC) is the 7th most frequent case of oncological diseases among men, and 17th among women all around the world. BC is more common in developed countries, in the western world there are the 4th most frequent cases among men and the 9th among women. This disease is characterized by a high mortality rate. There is a lack of diagnostic methods in comparison with other urological oncological diseases. Important diagnostic studies depending on the histopathological gradation. Malignant cells are characterized by high proliferative capacity, which is provided by inflammatory molecules, such as IL-1 β and IL-6. In parallel with chronic inflammatory processes, increased vascular permeability can lead to a change in the concentration of toxins, metabolites, and products of tissue disintegration in tumors. During malignant diseases, significant changes in the microcirculation system can occur, as a result of which there is a disruption in the functions of the lymphatic system, metabolic disturbances and as result – changes in biochemical parameters of the blood. A general clinical blood test, especially the number of leukocytes, indicates a significant response of cellular immunity in cancer patients. The slightest deviations in the hematological parameters may indicate the progression of cancer. In our study of the biochemical parameters of the blood of patients with BC, the dependence of the parameters of the general clinical analysis and certain biochemical parameters of the blood on histopathological gradation is traced. Determination of the investigated parameters in blood in patients with BC revealed an increase in the content of pro-inflammatory cytokines, the vascular endothelial growth factor, urea, creatinine, the number of leukocytes and neutrophils. Also, we showed a decrease in the number of erythrocytes, monocytes, lymphocytes, and eosinophils in dependence on histopathological gradation.

Key words: bladder cancer, IL-1 β , IL-6, VEGF, complete blood count, biochemical parameters, histopathological gradation.

УДК 577.217.5

В. Заєць, канд. біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
К. Османова, інженер,
І. Крупська, канд. біол. наук
Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ, Україна

КЛОНУВАННЯ ТА ГЕТЕРОЛОГІЧНА ЕКСПРЕСІЯ ФРАГМЕНТА КДНК ГЕНА ПРОТЕЇНКІНАЗИ АКТ1 МИШІ В *ESCHERICHIA COLI*

Протеїнкіназа Akt/PKB є серин/треонін-специфічною протеїнкіназою В, яка має в організмі тварин три ізоформи: Akt1, Akt2 і Akt3. Протеїнкіназа Akt/PKB є координаційним центром для багатьох сигнальних шляхів і відіграє ключову роль у регуляції багатьох клітинних процесів, таких як проліферація і виживання клітин, метаболізм глюкози, клітинний цикл, синтез білка, а також ангиогенез. Akt1 більше задіяна в процесі проліферації та виживання клітин, Akt2 специфічніша в інсулінозалежному сигнальному шляху, а Akt3 переважно експресується в мозку. Порушення регуляції сигнальних шляхів за участю Akt прямо пов'язане з найпоширенішими й невиліковними захворюваннями людини. Установлено, що гіперактивність Akt1 є частиною патологічного процесу в кількох типах найпоширеніших злоякісних пухлин людини. Дeregуляція Akt-активності ядерних факторів транскрипції NF- κ B викликає розвиток аутоімунних хвороб. Виявлено порушення Akt-кіназного фосфорилування при деяких нейродегенеративних захворюваннях головного мозку, таких як хвороби Альцгеймера та Хантінгтона. Серцево-судинні захворювання, пов'язані з Akt, характеризуються порушенням фосфорилування Akt у сигнальних системах у різних тканинах і клітинах, зокрема ендотеліальних клітинах судинної системи та кардіоміоцитах, де Akt регулює ріст серця, скоротливу функцію і коронарний ангиогенез. У проведений експериментальній роботі нами за допомогою ПЛР було отримано фрагмент кДНК гена протеїнкінази Akt1 миші, клоновано даний фрагмент в експресуючий вектор pET42a та оптимізовано експресію рекомбінантного білка в штамі *E. coli* BL21(DE3). Імуноблот-аналіз показав, що рекомбінантний білок є делетованою кіназою Akt1 і може бути використаний після його напрацювання для отримання поліклональних антитіл до протеїнкінази Akt/PKB для дослідження її ролі в молекулярних механізмах сигнальних шляхів апоптозу кардіоміоцитів людини.

Ключові слова: протеїнкіназа Akt, клонування, бактеріальна експресія.

Вступ. Протеїнкіназа Akt/PKB є серин/треонін-специфічною протеїнкіназою В, яка має в організмі тварин три ізоформи: Akt1, Akt2 і Akt3. Протеїнкіназа Akt/PKB є координаційним центром для багатьох сигнальних шляхів і відіграє ключову роль у регуляції багатьох клітинних процесів, таких як проліферація і виживання клітин, метаболізм глюкози, клітинний цикл, синтез білка, а також ангиогенез [1, 2].

Активність Akt-кінази стимулюється різними факторами росту, цитокінами, гемокінами, тепловим шоком, гіпоксією, інтегринами, Т-клітинними рецепторами. Akt бере участь у проліферації клітин шляхом взаємодії з низкою білків, що беруть участь у клітинному циклі, у тому числі цикліном D1, p21 і Myt1 [2-4]. Було показано, що Akt індукуює виживання і пригнічує апоптоз [1, 2, 5]. Механізм, за допомогою якого Akt сприяє виживанню клітин, включає фосфорилування проапоптичних білків BAD, каспаз і FoxO-факторів транскрипції, що знижує проапоптичний потенціал цих білків [6]. Була розкрита здатність Akt пригнічувати MAPK/ERK-шлях через фосфорилування Raf-1 у м'язових волокнах і подолання конститутивно активованої MAPK-індукованої зупинки клітинного циклу. В останні роки була розкрита роль Akt у нейродегенерації через фосфорилування хантінгіну й атаксіну-1. Протеїнкіназа Akt є також ключовим модулятором сигнального шляху Akt-mTOR, який контролює процес інтеграції нових нейронів у нейрогенезі, включаючи правильне їх позиціонування, розвиток дендритів і формування синапсів [2].

Порушення регуляції сигнальних шляхів за участю Akt прямо пов'язане з найбільш поширеними і невиліковними захворюваннями людини [7]. Установлено, що гіперактивність Akt1 є частиною патологічного процесу в кількох типах найпоширеніших злоякісних пухлин людини, включаючи рак молочної залози, простати, легень, шлунково-кишкового тракту і центральної нервової системи [8-11]. Дeregуляція активності ядерних факторів транскрипції NF- κ B викликає розвиток аутоімунних хвороб [12]. Крім того, виявлено порушення Akt-кіназного фосфорилування в ряді нейродегенеративних захворювань головного мозку, таких як хвороба Альцгеймера, хвороба Хантінгтона [2, 13].

Серцево-судинні захворювання, пов'язані з Akt, характеризуються порушенням фосфорилування Akt у сигнальних системах у різних тканинах і клітинах, зокрема ендотеліальних клітинах судинної системи і кардіоміоцитах, де Akt регулює ріст серця, скоротливу функцію і коронарний ангиогенез [14].

Таким чином, вивчення сигнальних шляхів протеїнкінази Akt/PKB і впливу їх порушень на організм людини та тварин має надзвичайно велике значення як з наукового погляду, так і для практичного застосування в медицині [11].

Метою нашої роботи було клонування фрагмента кДНК гена протеїнкінази Akt1 в експресуючому векторі для подальшого напрацювання рекомбінантного білка й отримання на його основі поліклональних антитіл до протеїнкінази Akt/PKB для дослідження її ролі в молекулярних механізмах сигнальних шляхів апоптозу кардіоміоцитів людини.

Матеріали і методи. Для відбору рекомбінантних клонів та експресії фрагмента кДНК гена Akt1 використовували відповідно генноінженерні штами *E. coli* DH5 α та BL21(DE3). Ампліфікацію фрагмента кДНК гена Akt1 проводили методом ПЦР за допомогою прямого 5'-gtccacatggagtagctgaagctactgggcaagg – 3' та зворотного 5'-gtctaagctttcatgtgccactggctgagtaggag – 3' праймерів у буферній суміші для Pfu полімерази фірми "ThermoScientific", яка містила 200 мкМ кожного dNTP, 1 мкМ праймерів, 50 нг матричної плазмиди та 2,5 U Pfu полімерази фірми "ThermoScientific". Початкова денатурація матриці проводилась протягом 3 хв при 94 °C. Наступні 30 циклів реакції складалися з етапів денатурації протягом 30 сек при 94 °C, відпалювання протягом 30 сек при 58 °C і елонгації протягом 2 хв при 72 °C. Останній етап синтезу проводили протягом 10 хв при 72 °C.

Компетентні клітини *E. coli* отримували згідно з методом Нішимури і співавт. [15]. Усі процедури з клонування фрагмента кДНК гена протеїнкінази Akt1 у плазмідному векторі pET42a – рестрикцію, фосфатазну реакцію, лігування, трансформацію та виділення плазмідної ДНК – проводили за допомогою ендонуклеаз рестрикції, лужної фосфатази та лігази фірми "ThermoScientific" (Литва) згідно з методиками [16] та

інструкціями фірми. Аналіз плазмідних конструкцій проводили за допомогою електрофорезу в окрашеному бромистим етідієм 0,7–1 %-му агарозному гелі. Для виділення необхідних фрагментів ДНК із гелю застосовували набір реагентів AxyPrep™ DNA Gel Extraction Kit фірми "Axygen Biosciences" (Германія). Для клонування використовували плазмідні вектори pUSEamp-myrAkt1 фірми "Merck" та pET42a фірми "Novagen" (США).

Вирощування трансформованої плазмідною pET42a-фрAkt1 культури *E. coli* BL21(DE3) та індукцію експресії фрагмента кДНК гена Akt1 рекомбінантною плазмідною pET42a-фрAkt1 у бактеріальній культурі *E. coli* проводили в середовищі Лурія – Бертрани (LB) із 30 мкг/мл канаміцину. Трансформовані рекомбінантною плазмідною pET42a-фр Akt1 компетентні клітини *E. coli* BL21(DE3)pLysE вирощували на шейкері (Environmental Shaker Incubator ES-20) при 37 °C до оптичної густини $A_{600}=0,7$ та індукували синтез цільового білка додаванням 1М ізопропіл- β -D-тіогалактопіранозидом (IPTG) до 1 мМ концентрації з наступною інкубацією протягом 1 та 3 год при 37 °C.

Електрофоретичне фракціонування білків у поліакриламідному гелі в присутності детергента додецилсульфату натрію проводили за методом Леммлі з використанням 4 % концентруючого та 12 % розділяючого гелів [17]. Гелі окрашували барвником Кумасі R250. Розділені в ДДС-ПААГ переносили на нітроцелюлозну мембрану методом напіссухого активного електроперенесення за допомогою приладу CSL Semi Dry Blotting Units (Cleaver Scientific Ltd, Великобританія) при силі струму 200 мА протягом 40 хв. Для Western блот-аналізу використовували моноклональні кроличі антитіла до протеїнкінази Akt C67E7 фірми "Cell Signalling Technology".

Результати та їх обговорення. Для клонування фрагмента кДНК гена *Akt1* в експресуючому векторі й напрацювання рекомбінантного білка для подальшого отримання на його основі поліклональних антитіл до протеїнкінази було вирішено використати бактеріальну гетерологічну систему *E. coli* [18, 19]. Як джерело гена в роботі нами був використаний еукаріотичний вектор pUSEamp(+)*myrAkt* із клонованою повною послідовністю кДНК гена *Akt1* миші. Для напрацювання фрагмента кДНК гена *Akt1* було вирішено використати полімеразну ланцюгову реакцію, а клонувати фрагмент у бактеріальному експресуючому векторі серії pET. Дані вектори засновані на системі експресії на основі РНК-полімерази фага T7, яка є однією з найефективніших бактеріальних систем [20]. На відміну від більшості бактеріальних та еукаріотичних РНК-полімераз, T7 РНК-полімераза складається з однієї субодиниці й водночас здатна здійснювати повний цикл транскрипції за відсутності додаткових білкових факторів. У ролі продуцента рекомбінантних білків у такій системі виступає штам *E. coli* BL21(DE3) та його похідні. Ген РНК-полімерази фага T7 перебуває під контролем *lac UV5* промотора і локалізується в бактеріальній хромосомі, куди він інтегрований у складі фага λ . Індукція синтезу T7 полімерази та подальша високоефективна транскрипція клонованого гена у складі рекомбінантної плазмиди спостерігаються лише після додавання в культуральне середовище індуктора синтезу IPTG.

Для клонування кДНК гена *Akt1* був вибраний вектор pET42a, у якому при клонуванні послідовності екзогенних генів зливаються з послідовністю гена високорозчинного білка глутатіон-S трансферази, що

значно підвищує розчинність експресованих білків і знижує перехід їх у процесі синтезу в нерозчинні тільця включення.

Аналіз нуклеотидної послідовності кДНК гена *Akt1* миші показав, що в ній відсутні сайти ендонуклеаз рестрикції NcoI, який збігається з ініціюючим трансляцію кодоном ATG, і HindIII. У векторі pET42a ці сайти містяться по краях послідовності поліклонального локуса. Таким чином, при клонуванні по даним сайтам непотрібна послідовність цього локуса не входить у рекомбінантний білок.

Для ПЦР синтезу фрагмента кДНК гена нами були спроектовані прямий і зворотний праймери до частини клонованої в плазміді pUSEamp(+)*myrAkt* послідовності протейнінази. Для збереження можливості клонування ампліфікованих фрагментів у вектор pET42a у прямий праймер був введений сайт нуклеази рестрикції NcoI, а в зворотний – HindIII зі стоп-кодоном.

Нуклеотидна послідовність клонованого гена протейнінази складається з 1440 нуклеотидних пар, що відповідає 480 амінокислотним залишкам. Амінокислотна послідовність білка має чітко виражену консервативну доменну структуру [1]. Вона складається з N-кінцевого плекстрингомологічного сегмента зі 100 амінокислотних залишків (РН), центрального каталітичного домену та C-кінцевої регуляторної області з близько 40 амінокислотних залишків. Оскільки РН домен є спільним для багатьох протейніназ, не тільки для Akt/PKB, то для клонування нами була вибрана в кДНК гена *Akt1* частина послідовності менш подібного поміж протейніназ каталітичного та унікальнішого регуляторного домену білка. Олігонуклеотидні праймери до вибраної послідовності *Akt1* розраховували за допомогою програми Primer 3 згідно з класичними вимогами до ПЛР праймерів, які включають наявність пуринових залишків на їх 5' та 3'-кінцях, близьку температуру плавлення прямого та зворотного праймерів і відсутність їх гібридизації один до одного. Аналіз праймерів проводили за допомогою програми BioMath. Спроектовані нами праймери охоплювали послідовність гена довжиною 987 н.п.

Відомо, що основними параметрами, які відповідають за ефективність ПЛР реакції, є температура плавлення праймерів (T_m) і концентрація іонів магнію в реакційній суміші. Оскільки всі програми обчислення T_m -праймерів дають лише наближені значення, то нами було проведено кілька аналітичних ПЛР реакцій із варіюючими значеннями температури відпалювання та різними концентраціями Mg. Було встановлено, що оптимальними умовами для ПЛР напрацювання фрагмента білка Akt1 є 58 °C та 1 мМ Mg. Це дозволило отримати достатню його кількість для подальшого клонування в бактеріальному векторі. На рис. 1 наведено результат ПЛР ампліфікації фрагмента кДНК гена *Akt1* із плазмиди pUSEamp(+) в якості матриці. Видно, що довжини синтезованого і теоретично обчисленого фрагментів збігаються. Для виключення можливості появи мутацій в ампліконах у процесі синтезу в ПЛР реакціях нами використовувалася лише високоточна Pfu полімераза.

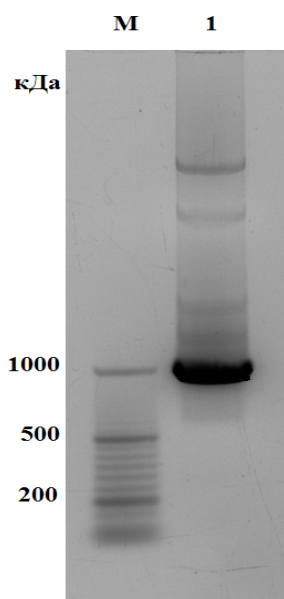


Рис. 1. Електрофоретичний аналіз ПЛР синтезованого фрагмента гена *Akt1* у 1 %-му агарозному гелі:
М – маркер молекулярної маси; 1 – ПЛР амплікон фрагмента кДНК гена *Akt1* миші

Ампліфікований фрагмент кДНК гена протеїнкінази *Akt1* було прокловано у векторі рЕТ42а за сайтами ендонуклеаз рестрикції *NcoI* та *HindIII*. Рестриктний сайт *NcoI* збігається з АТГ кодоном, з якого починається синтез більшості ендогенних білків *E. coli*. У процесі клонування плазмідну ДНК та ампліфіковану ДНК фрагмента гена *Akt1* розщепляли цими ендонуклеазами, очищали в агарозному гелі та лігували в молярному співвідношенні 1 : 3 за допомогою лігази. Лігазною сумішшю трансформували компетентні клітини штаму *E. coli* XL1. У процесі аналізу плазмід рекомбінантних колоній, що вирости на агарі з канаміцином, були відібрані ті колонії, які мали вектор рЕТ42а із клонованою послідовністю фрагмента гена *Akt1* (плазмідна конструкція рЕТ42а/фр*Akt1*). Наявність вставки фрагмента кДНК гена протеїнкінази у вектор була підтверджена ПЛР та рестриктним аналізами.

Для отримання експресії клонованого у векторі рЕТ42а фрагмента гена протеїнкінази *Akt1* у бактеріальній культурі рекомбінантною плазмідною конструкцією рЕТ42а/фр*Akt1*, яку напрацювали в штамі *E. coli* XL1, трансформували у створений для експресії плазмід серії рЕТ штам *E. coli* BL21(DE3). Вирощування трансформованої бактеріальної культури та індукцію експресії рекомбінантного фрагмента білка *Akt1* плазмідною конструкцією проводили у середовищі LB, яке містило канаміцин. Експресію рекомбінантного білка індукували додаванням до культурального середовища 1 мМ IPTG, після чого клітини інкубували протягом 3 год при 37 °С. На рис. 2 наведено результати електрофоретичного аналізу лізатів клітин *E. coli* BL21pLysE, у яких індукували експресію фрагмента *Akt1*. Аналіз показав синтез очікуваного білка з молекулярною масою близько 70 кДа.

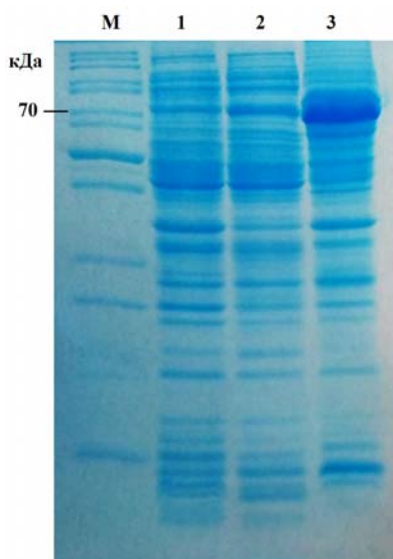


Рис. 2. Електрофореграма лізатів, отриманих із культури клітин *E. coli* BL21(DE3), трансформованих рекомбінантною плазмідною конструкцією рЕТ42а/фр*Akt1*:
М – маркер молекулярної маси; 1 – лізат клітин *E. coli* до додавання 1 мМ IPTG (контроль);
2 – лізат клітин *E. coli* через 1 год після додавання 1 мМ IPTG; 3 – лізат клітин *E. coli* через 3 год після додавання 1 мМ IPTG

Для підтвердження того, що в процесі клонування ПЦР амплікону кДНК фрагмента гена протеїнкінази *Akt1* не відбулося зсуву рамки зчитування триплетів полімеразою і що синтезований плазмідною конструкцією рЕТ42а/фрAkt1 у клітинах *E. coli* BL21(DE3) рекомбінантний білок є дійсно фрагментом протеїнкінази Akt1, був проведений імунологічний

аналіз отриманого протеїна за допомогою поліклональних антитіл до протеїнкінази Akt1 людини. На рис. 3 наведено результати імуноблот-аналізу клітинних лізатів трансформованих рекомбінантною плазмідною рЕТ42а/Akt1 бактеріальних клітин *E. coli* BL21(DE3) до індукції та після індукції IPTG.

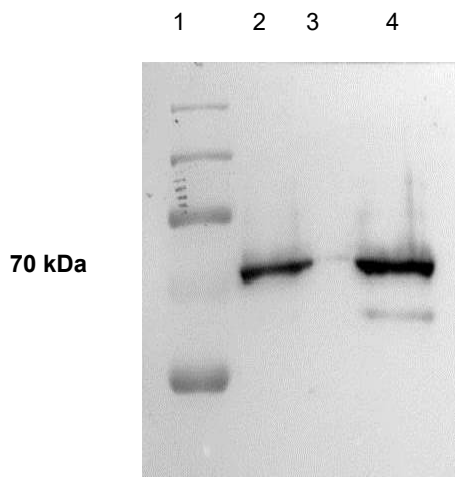


Рис. 3. Експресія рекомбінантного фрагмента протеїнкінази Akt1 в індуктованих IPTG клітинах *E. coli* BL21(DE3), трансформованих плазмідною конструкцією рЕТ42а/Akt1. Імуноблот-аналіз із використанням поліклональних анти-Akt1 антитіл:
1 – маркерні білки; 2 – сумарний лізат *E. coli* BL21(DE3) після індукції IPTG (інкубація культури 1 год);
3 – сумарний лізат *E. coli* BL21(DE3) до індукції IPTG;
4 – сумарний лізат *E. coli* BL21(DE3) після індукції IPTG (інкубація культури 3 год)

Як видно з імуноблота, використані в експерименті антитіла до протеїнкінази Akt1 проявляють специфічність до новосинтезованого білка. Ці експериментальні дані свідчать, що експресований рекомбінантний білок створеною нами плазмідною конструкцією рЕТ42а/фрAkt1 у штамі *E. coli* BL21(DE3) є фрагментом протеїнкінази Akt1.

Для оптимізації процесу синтезу фрагмента протеїнкінази Akt1 у штамі *E. coli* BL21(DE3) було проведено експерименти з визначення впливу температури інкубації бактеріальної культури та концентрації IPTG на синтез рекомбінантного білка. Було встановлено, що оптимальними умовами отримання рекомбінантного фрагмента Akt1 у штамі *E. coli* BL21(DE3) є індукція синтезу білка в бактеріальній культурі 1 мМ IPTG та інкубація культурального середовища при температурі 28 °C.

Таким чином, у процесі проведеної експериментальної роботи нами було створено експресуючу плазмідну конструкцію рЕТ42а/фрAkt1 із клонуваним фрагментом кДНК протеїнкінази Akt1 миші під промотором фага T7 і визначено оптимальні умови його експресії.

Висновок. Отримані результати свідчать про клонування фрагмента кДНК гена протеїнкінази Akt1 миші в плазміді рЕТ42а, а визначені умови індукції експресії рекомбінантного фрагмента білка Akt1 у рекомбінантній плазміді рЕТ42а/фрAkt1 дають можливість напрацювати рекомбінантний білок у препаративній кількості для імунізації та отримання на його основі поліклональних антитіл до протеїнкінази Akt1.

Список використаних джерел

1. Song G. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival / G. Song, G. Ouyang, S. Bao // *J. Cell. Mol. Med.* – 2005. – Vol. 9, № 1. – P. 59–71.
2. Manning B. D. AKT/PKB signaling: navigation the network / B. D. Manning, A. Toker // *Cell.* – 2017. – Vol. 169. – P. 381–405.

3. Activation of Akt/protein kinase B overcomes a G(2)/m cell cycle checkpoint induced by DNA damage / E. S. Kandel, J. Skeen, N. Majewski et al. // *Mol. Cell. Biol.* – 2002. – Vol. 22, № 22. – P. 7831–7841.
4. Akt1 and Akt2 are required for alphabeta thymocyte survival and differentiation / M. M. Juntia, J. A. Wolford, M. J. Birnbaum et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2007. – Vol. 104, № 29. – P. 12105–12110.
5. Duronio V. The life of a cell: Apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway / V. Duronio // *Biochem. J.* – 2008. – Vol. 415, № 3. – P. 333–344.
6. Webb A. E. FOXO transcription factors: key regulators of cellular quality control / A. E. Webb, A. Brunet // *Trends Biochem. Sci.* – 2014. – Vol. 39. – P. 159–169.
7. Hers I. Akt signalling in health and disease / I. Hers, E. E. Vincent, J. M. Tavaré // *Cell Signal.* – 2011. – Vol. 23, № 10. – P. 1515–1527.
8. Fresno J. A. PI3K/Akt signalling pathway and cancer / J. A. Fresno, A. E. Casado, J. de Castro et al. // *Cancer Treat. Rev.* – 2004. – Vol. 30, № 2. – P. 193–204.
9. Costa R. L. B. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in triple-negative breast cancer: a review / R. L. B. Costa, H. S. Han, W. J. Gradishar // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2018. – Vol. 169, № 3. – P. 397–406.
10. Selective activation of Akt1 by mammalian target of rapamycin complex 2 regulates cancer cell migration, invasion, and metastasis / E. K. Kim, S. G. Yun, J. M. Ha et al. // *Oncogene.* – 2011. – Vol. 30, № 26. – P. 2954–2963.
11. Mitsiades C. S. The Akt pathway: molecular targets for anti-cancer drug development / C. S. Mitsiades, N. Mitsiades, M. Koutsilieris // *Curr. Cancer Drug Targets.* – 2004. – Vol. 4, № 3. – P. 235–56.
12. Expression of active protein kinase B in T cells perturbs both T and B cells homeostasis and promotes inflammation / V. G. Parsons, R. G. Jones, M. S. Tsao et al. // *J. Immunol.* – 2001. – Vol. 167. – P. 42–48.
13. Nixon R. A. The role of autophagy in neurodegenerative disease / R. A. Nixon // *Nat. Med.* – 2013. – Vol. 19, № 8. – P. 983–997.
14. Akt1 in endothelial cell and angiogenesis / P. R. Somanath, O. V. Razorenova, J. Chen, T. V. Byzova // *Cell Cycle.* – 2006. – Vol. 5, № 5. – P. 512–518.
15. Rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells / A. Nishimura, M. Morita, Y. Nishimura, Y. Sugino // *Nucl. Acids Res.* – 1990. – Vol. 18, № 20. – P. 6169.
16. Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. / J. Sambrook, T. Fritsch, T. Manniatis. – 2th ed. – N. Y.: Cold Spring Harbor. – 1989.
17. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – Vol. 227, № 5259. – P. 680–685.
18. Sahdev S. Production of active eucariotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies

/ S. Sahdev, S. K. Khattar, K. S. Saini // Mol. Cell. Biochem. – 2008. – Vol. 307, № 2. – P. 249–264.

19. Rosano G. L. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges / G. L. Rosano, E. A. Cessarelli // Front. Microbiol. – 2014. – Vol. 5. – P. 1–17.

20. Studier F. W. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high level expression of cloned genes / F. W. Studier, B. A. Moffatt // J. Mol. Biol. – 1986. – Vol. 189, № 1. – P. 113–130.

References

1. Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med.* 2005; 9 (1): 59 – 71.
2. Manning BD, Tokar A. AKT/PKB signaling: navigation the network. *Cell.* 2017;169(): 381 – 405.
3. Kandel ES, Skeen J, Majewski N, Di Cristofano A, Pandolfi PP, Feliciano CS, Gartel A, Hay N. Activation of Akt/protein kinase B overcomes a G(2)/m cell cycle checkpoint induced by DNA damage. *Mol Cell Biol.* 2002; 22 (22): 7831–41.
4. Juntia MM, Wolford JA, Birnbaum MJ, Rathmell JC, Koretzky GA. Akt1 and Akt2 are required for alphabeta thymocyte survival and differentiation. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104(29): 12105–12110.
5. Duronio V. The life of a cell: Apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. *Biochem J.* 2008; 415(3): 333–44.
6. Webb AE, Brunet A. FOXO transcription factors: key regulators of cellular quality control. *Trends Biochem Sci.* 2014; 39:159–169.
7. Hers I, Vincent EE, Tavaré JM. Akt signalling in health and disease. *Cell Signal.* 2011; 23(10): 1515–1527.
8. Fresno VJA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, González-Barón M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev.* 2004; 30(2):193–204.
9. Costa RLB, Han HS, Gradishar WJ. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in triple-negative breast cancer: a review. *Breast Cancer Res Treat.* 2018; 169(3): 397–406.
10. Kim EK, Yun SG, Ha JM, Kim YW, Jin IH, Yun SG, Shin HK, Song SH, J. H. Kim JH, Park JV. Selective activation of Akt1 by mammalian target

of rapamycin complex 2 regulates cancer cell migration, invasion, and metastasis. *Oncogene.* 2011; 30(26):2954–63.

11. Mitsiades CS, Mitsiades N, Koutsilieris M. The Akt pathway: molecular targets for anti-cancer drug development. *Curr Cancer Drug Targets.* 2004; 4(3):235–56.

12. Parsons VG, Jones RG, Tsao MS, Odermatt B, Ohashi PS, Woodgett JR. Expression of active protein kinase B in T cells perturbs both T and B cells homeostasis and promotes inflammation. *J. immunol.* 2001;167: 42–48.

13. Nixon R.A. The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat. Med.* 2013; 19(8): 983–997.

14. Somanath PR, Razorenova OV, Chen J, Byzova TV. Akt1 in endothelial cell and angiogenesis. *Cell Cycle.* 2006; 5 (5): 512–5168.

15. Nishimura A, Morita M, Nishimura Y, Sugino Y. Rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucl Acids Res.* 1990;18(20):6169.

16. Sambrook J, Fritsch T, Manniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., New York: Cold Spring Harbor. 1989.

17. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259):680–5.

18. Sahdev S, Khattar SK, Saini KS. Production of active eucariotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Mol Cell Biochem.* 2008; 307(2):249–64.

19. Rosano GL, Cessarelli EA Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers Microbiology.* 2014; 5:1–17.

20. Studier FW, Moffatt BA. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high level expression of cloned genes. *J Mol Biol.* 1986; 189 (1):113–130.

Надійшла до редколегії 12.09.2018

Отримано виправлений варіант 15.10.2018

Підписано до друку 15.10.2018

Received in the editorial 12.09.2018

Received a revised version on 15.10.2018

Signed in the press on 15.10.2018

В. Заец, канд. биол. наук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,

М. Османова, інженер,

І. Крупская, канд. биол. наук

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ, Україна

КЛОНИРОВАНИЕ И ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ ФРАГМЕНТА КДНК ГЕНА ПРОТЕИНКИНАЗЫ АКТ1 МЫШИ В *ESCHERICHIA COLI*

Протеинкиназа Akt/PKB является серин/треонин-специфической протеинкиназой B, которая имеет в организме животных три изоформы: Akt1, Akt2 и Akt3. Протеинкиназа Akt/PKB является координационным центром для многих сигнальных путей и играет ключевую роль в регуляции многих клеточных процессов, таких как пролиферация и выживание клеток, метаболизм глюкозы, клеточный цикл, синтез белка, а также ангиогенез. Akt1 более задействована в процессе пролиферации и выживания клеток, Akt2 более специфична в инсулинозависимом сигнальном пути, а Akt3 преимущественно экспрессируется в мозге. Нарушение регуляции сигнальных путей с участием Akt напрямую связано с наиболее распространенными и неизлечимыми заболеваниями человека. Установлено, что гиперактивность Akt1 является частью патологического процесса в нескольких типах наиболее распространенных злокачественных опухолей человека. Дeregуляция протеинкиназой активности ядерных факторов транскрипции NF-κB вызывает развитие аутоиммунных болезней. Выявлены нарушения Akt-киназного фосфорилирования в ряде нейродегенеративных заболеваний головного мозга, таких как болезнь Альцгеймера и Хантингтона. Сердечно-сосудистые заболевания, связанные с Akt, характеризуются нарушением фосфорилирования Akt в сигнальных системах в различных тканях и клетках, в частности в эндотелиальных клетках сосудистой системы и кардиомиоцитах, где Akt регулирует рост сердца, сократительную функцию и коронарный ангиогенез. В проведенной экспериментальной работе нами с помощью ПЦР был получен фрагмент кДНК гена протеинкиназы Akt1 мыши, данный фрагмент клонирован в экспрессирующий вектор pET42a и оптимизирована экспрессия рекомбинантного белка в штамме *E. coli* BL21 (DE3). Иммуноблот-анализ показал, что рекомбинантный белок является делегированной киназой Akt1 и может быть использован для получения поликлональных антител к протеинкиназе Akt/PKB для исследования ее роли в молекулярных механизмах сигнальных путей апоптоза кардиомиоцитов человека.

Ключевые слова: протеинкиназа Akt, клонирование, бактериальная экспрессия.

V. Zayets, PhD

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,

K. Osmanova, engineer,

I. Krupskaya, PhD

Institute of Molecular Biology and Genetics of NASU, Kyiv, Ukraine

CLONING AND HETEROLOGICAL EXPRESSION OF cDNA FRAGMENT OF MOUSE PROTEIN KINASE GENE AKT1 IN *ESCHERICHIA COLI*

Protein kinase Akt / PKB is serine / threonine-specific protein kinase B, which has three isoforms Akt1, Akt2 and Akt3 in the animal's body. Protein kinase Akt / PKB is the focal point for many signaling pathways and plays a key role in regulating many cellular processes, such as proliferation and cell survival, glucose metabolism, cell cycle, protein synthesis, and angiogenesis. Akt1 is more involved in the process of proliferation and cell survival, Akt2 is more specific in the insulin-dependent signaling pathway, and Akt3 is predominantly expressed in the brain. Disturbance of signaling pathways with the participation of Akt is directly related to the most common and incurable human diseases. It has been established that hyperactivity Akt1 is a part of the pathological process in several types of the most common malignant tumors of a person. Deregulation of Akt activity of nuclear transcription factor NF-κB causes the development of autoimmune diseases. Akt-kinase phosphorylation has been detected in a number of neurodegenerative diseases of the brain such as Alzheimer's disease, Huntington's disease. Cardiovascular diseases associated with Akt are characterized by a disturbance of the phosphorylation of Akt in signaling systems in various tissues and cells, in particular in endothelial cells of the vascular system and cardiomyocytes, where Akt regulates cardiac growth, contractile function and coronary angiogenesis. In our experimental work, using PCR, we obtained a cDNA fragment of the murine Akt1 protein kinase gene, cloned this fragment into the expressing vector pET42a, and optimized expression of the recombinant protein in *E. coli* BL21 strain (DE3). Immunoblot analysis has showed that the recombinant protein is a delineated Akt1 kinase and can be used after its development to produce polyclonal antibodies to the protein kinase Akt / PKB to study its role in the molecular mechanisms of signaling pathways for apoptosis of human cardiomyocytes.

Key words: protein kinase Akt, cloning, bacterial expression.

UDC 57.084:615.357

O. Kalmukova, PhD stud.,
A. Yurchenko, PhD stud.,
M. Dzerzhinsky, DSc

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

THE EFFECTS OF DIFFERENT MODE OF MELATONIN ADMINISTRATION ON THE DEVELOPMENT OF HIGH-CALORIE DIET-INDUCED OBESITY IN RATS

Currently, opportunities for the melatonin use in the obesity treatment are being studied because of his action on the normalization of adipocyte secretion, the reduction of the pro-inflammatory state in adipose tissue, the stimulation of the beige adipocytes appearance, modulation of the eating behavior via influence on hypothalamic signals, and thermoregulation through affecting on brown adipocyte function, however, the mode, pathways and dose levels of the administration require detailed research. The aim of our study was to determine the influence of melatonin different time and mode treatment on body weight changes of diet-induced (high-calorie diet, HCD) obesity in rats. Melatonin was administered daily by gavage for 7 weeks in dose 30 mg/kg either 1 h after lights-on (ZT01) or 1 h before lights-off (ZT11) or continuously with drinking water (HCD water). Parameters, including weight gain, weight gain rate, body mass index, Lee index, related visceral fat weight, relative daily food and water consumption, were measured. Melatonin use significantly reduce weight gain rate in HCD ZT11 and HCD water group in 2 and 2,5 times; Lee index – by 6,6 % and 7,3 %; related visceral fat mass – by 38,5 %, respectively in compare with HCD. Animals without HCD which obtain melatonin did not change observed parameters, accept relative visceral fat mass (it was decreased in rely to control). The effects of different modes melatonin administration manifested in decrease weight gain rate, Lee index and relative visceral fat mass in rats with diet-induced obesity only after evening administration, as well as after delivery continuously with drinking water without any effect on food and water consumption.

Key words: melatonin, obesity, high-fat diet, chronobiology, visceral adipose tissue mass.

Introduction. Melatonin is an hormone of pineal gland that regulates circadian rhythm in species who are sensitive to photoperiodic changes. Melatonin is the involvement in the measurement of the light day duration and, accordingly, the timing of seasonal reproduction, changes in metabolism and behavior [1]. However, recent studies have shown that melatonin has a number of other functions that may be useful in the fight against obesity.

Melatonin stimulates the appearance of beige adipocytes (mixed type) in white adipose tissue (WAT) [2]. Beige adipocytes – morphologically and functionally similar to brown (as express UCP1 – protein that increases the permeability of the inner mitochondrial membrane for proton returning to the mitochondrial matrix without the production of ATP, but with heat generating), although they have different origins and there arise in white adipose tissue [3]. The presence of such cells contributes to the loss of excess accumulated triacylglycerides due to heat production and decrease WAT mass, that can ameliorate obesity development [4, 5, 6, 7].

It is shown that during obesity, the circadian rhythm of leptin secretion is disturbed [8, 9]. In attempts to normalize the adipokines secretion by the melatonin administration, ambiguous data were obtained [10, 11]. They were different by the method, duration and time of its application (morning, evening or continuous administration through drinking water). This dependence is explained by different sensitivity (density, affinity) of melatonin receptors during the day [12, 13], but the mechanism of this regulation is still not fully understood [14].

Melatonin receptors are widely represented in immune cells, which makes melatonin a strong immunomodulator [15]. It exhibits anti-inflammatory [16] and antioxidant properties (by induction of antioxidant enzymes expression, inhibition of the prooxidant enzymes activation) [17]. Modern studies have shown improved pro-inflammatory state and oxidative stress in obese rats [18], which is a significant result in the treatment of this disease, since in recent years the most important cause of the obesity pathogenesis is precisely the inflammatory processes [19].

In addition to feedback with the hypothalamus suprachiasmatic nucleus, melatonin affects the arcuate nucleus (involved in the regulation of the neuropeptide Y synthesis in rats [20] and in *Danio rerio* [21], enhances the expression of pro-opiomelanocortin in mice [22] thereby increasing the β -endorphin content [23]). On models of induced obesity, the neuropeptide Y and leptin receptors were reduced to normal levels in the mediastinal basal rat

hypothalamus after melatonin treatment [24]. The obtained data indicate monosemantic involvement of melatonin in the regulation of appetite and intake of food, but they are contradictory in relation to the direction of the signal – orexygenic or anorexygenic.

At present, clinical trials of the melatonin use in the treatment of obesity and pre-diabetic states are ongoing, as it is known that under these disease, the melatonin level is lower than usual [25, 26].

Despite the first success in studying the melatonin effects on the development of obesity, there are still many issues and problems associated with the time and duration of its administration, the effect on adipose tissue and side effects.

An additional interesting issue is the varying sensitivity of the organism to melatonin over the course of the day, as manifested by the differences in the membrane and nuclear receptors expression in cells [27, 28]. One of the topical issues in chronopharmacology is the choice of the effective time of drug administration to increase the useful effects and reduce the side effects [29, 30, 31]. Therefore, the aim of the study was to evaluate the changes of body mass and food consumption after different time and mode of melatonin administration in rats with high fat diet-induced obesity.

Materials and methods. White nonlinear male rats weighing 100-120 g were used in this study. The light cycle was 12-h light and 12-h darkness, with lights-off at 19:00 h. All experiments on animals were carried out in compliance with the international principles of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experimental and other scientific purposes (European Convention, Strasburg, 1986), Article 26 of the Law of Ukraine "On the Protection of Animals from Cruelty" (No. 3447-IV, February 21, 2006) as well as all norms of bioethics and biological safety.

During the first week, all animals received standard rodent chow. On the 8th day, the animals were randomized into 2 groups: control animals received standard chow (3,81 kcal/g) for 10 weeks and experimental rats received high-calorie diet (5,35 kcal/g) consisting of standard chow (60 %), lard (10 %), eggs (10 %), sugar (9 %), peanut (5 %), dry milk (5 %) and vegetable oil (1 %) [32]. Food and water were available *ad libitum*. To confirm the development of obesity the animals were weighed one times a week until the average body gain reached a significant difference of at least 30 % between the two groups. They were then divided into 8 group according to Table 1.

Table 1. Characteristics of animals experimental groups

№	Group name	Diet type	Melatonin treatment
1	Control (C)	Standard	–
2	HCD	High-calorie	–
3	M ZT01	Standard	1 h after lights-on
4	M ZT11	Standard	1 h before lights-off
5	M water	Standard	continuously in drinking water
6	HCD ZT01	High-calorie	1 h after lights-on
7	HCD ZT11	High-calorie	1 h before lights-off
8	HCD water	High-calorie	continuously in drinking water

Melatonin (Alcon Biosciences, USA) was administered daily by gavage for 7 wk (30 mg/kg) either 1 h after lights-on (Zeitgeber time (ZT) 01) or 1 h before lights-off (ZT11) or continuously with drinking water (the required dose was dissolved in 25-30 ml according to the calculation of the daily mean value of the drinking water consumption volume per animal [33]) (Fig. 1). Melatonin was dissolved in a

minimum volume of absolute ethanol and diluted in the drinking water to yield a dose of 30 mg/kg body weight per day, with a final concentration of 0.066 % (w/v) ethanol. Water bottles were covered with aluminum foil to protect from light. Melatonin treatment was began at 6th week of study after obesity is developed.

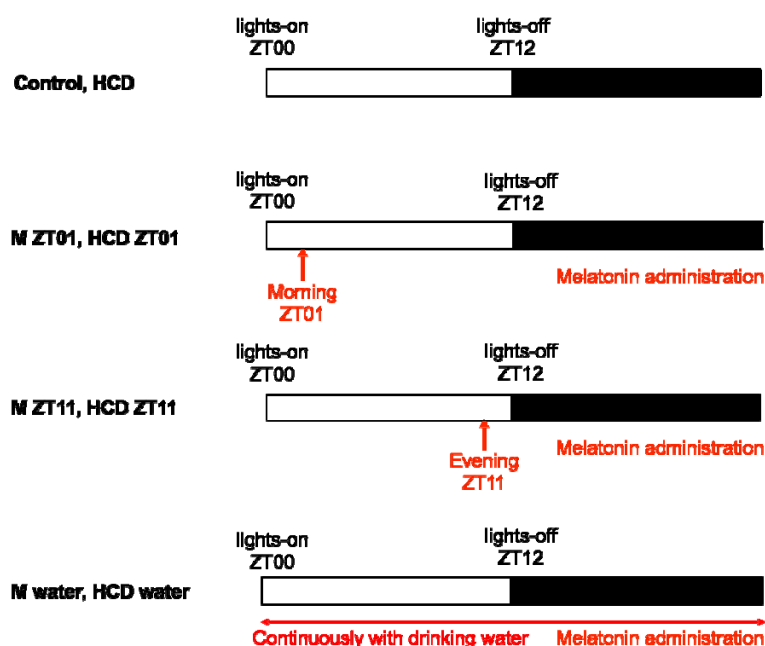


Fig.1. Schematic protocol of melatonin administration

Food and water consumption were measured daily at the same time (09:00 to 10:00 h) and body weights were determined once a week. Body weight gain, relative daily food (kcal/day/g body weight) and relative daily water consumption (ml/day/g body weight) was determined for each rat. Body length was measured; body mass index (BMI) (the ratio of body weight (kg) of rats to the square of the body length (m²)) and Lee obesity index (the ratio of cube root of body weight (g) by nasoanal length (cm) and multiplying the result by 1000 [34]) were also calculated. The epididymal, retroperitoneal, perirenal fat pads were dissected and immediately weighed.

The statistical analysis of the results obtained was conducted using the Statistica 6.0 (StatSoft, USA) and Microsoft Excel 2010 (Microsoft, USA) software. Normality of data distribution was determined by the Shapiro-Wilks criterion. To assess the validity of the revealed changes, parametric (Student t-test for two-samples) and non-

parametric (Mann-Whitney U-test for the independent groups) methods of variation statistics were used, the difference was significant at $p < 0.05$. The obtained results are presented as $M \pm SEM$ (mean $\pm$ standard error of mean).

Results and discussion. To establish the obesity model, animals were fed HCD until there was a minimum difference of 30 % body weight gain between rats fed HCD compared with those who were fed standard diet. As soon as this difference reached significance ($p < 0.05$), parts of HCD and standard diet fed rats were treated with melatonin either 1 h after lights-on (ZT01), 1 h before lights-off (ZT11) or delivery with drinking water. The baseline information of body weight, related visceral fat weight, body mass index (BMI), and Lee index of experimental animals are presented on the Table 2.

Table 2. Body weight gain, body mass index, Lee index and visceral fat weight of experimental animals

Parameter	Control	M ZT01	M ZT11	M water	HCD	HCD ZT01	HCD ZT11	HCD water
Weight gain (%)	195 ± 23	236 ± 16	207 ± 23	205 ± 17	271 ± 17*	254 ± 25*	248 ± 26	223 ± 15 [#]
Body mass index (kg/m ²)	6,12 ± 0,29	6,12 ± 0,19	6,24 ± 0,05	6,18 ± 0,13	6,87 ± 0,23*	6,44 ± 0,09	6,41 ± 0,04	6,32 ± 0,12
Lee index	288 ± 5	292 ± 4	293 ± 2	293 ± 3	316 ± 3*	309 ± 1* [#]	295 ± 3 [#]	293 ± 4 [#]
Relative visceral fat weight (%)	1,78 ± 0,03	0,92 ± 0,09*	0,94 ± 0,23*	1,07 ± 0,07*	2,93 ± 0,31*	2,11 ± 0,14* [#]	1,79 ± 0,18 [#]	1,8 ± 0,2 [#]

Data are presented as the M ± SEM;

* p < 0.05 compared with control value,

p < 0.05 compared HCD with group HCD ZT01, HCD ZT11, HCD water

Weight gain have increased in HCD group by 40 % (compare to control), in HCD ZT01 by 30 % (some amelioration were present). Group HCD ZT11 demonstrate intermediate value – did not differ from C and HCD both. Animals from HCD water group display level similar to control and differ by 20 % from HCD. In human to verify obesity development usually use BMI. Also, in our study BMI show significant difference between Control and HCD groups; in HCD ZT01, HCD ZT11 and HCD water this parameter have prominent value (didn't differ from C and HCD both). The Lee index for assessing obesity in rats is similar to BMI in humans. This parameter shown more pronounce difference after melatonin use. Lee index enlarged in HCD by 10 % (in rely to Control), in HCD ZT01 by 7 % (significantly differ from Control and HCD both). Again in groups HCD ZT11 and HCD water we have difference in compare to HCD by 6,6 % and by 7,3 %, respectively. In groups M ZT01, M ZT11 and M water

already indicated parameters did not vary from control value. In rats fed diets high in fat, a linear increase in body fat with increasing body weight has been shown [35]. But measuring body fat is a more sensitive criterion for assessing obesity in animals, since rats fed a high-fat diet (40 % of energy) for 10 weeks displayed a 10 % increase in total body weight but a 35 – 40 % increase in total body fat compared with the animals fed a low-fat diet [36, 37]. Relative visceral fat weight in HCD increased by 65 % compare to control. HCD ZT01 have usually prominent level: more than control by 18,5 % and less than HCD by 28 %. HCD ZT11 and HCD water have similar results: did not differ from control, but show significance to HCD: by 38,5 %. Surprisingly, we observed significant difference in relative visceral fat weight in M ZT01, M ZT11 and M water by 48 %, 47 % and 40 %, accordantly. It can be connected with activation thermogenesis via brown and beige adipocyte [38, 39].

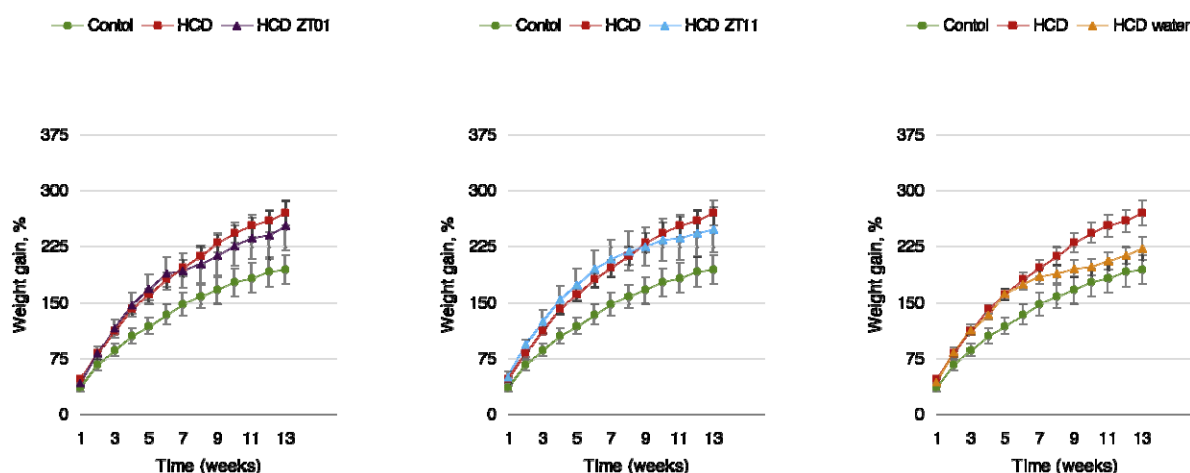


Fig. 2. Dynamics of weight gain during melatonin treatment

The data of weight gain dynamics (Fig. 2) means that melatonin have influence to body mass changes and tendency to decrease weight gain during development of obesity. After 1 weeks of melatonin administration (on the 7th and 8th weeks of experiment) the weight gain of HCD ZT01 and HCD ZT11 groups begin stop growing and this tendency was maintained during following final 5 weeks (decreases in HCD ZT01 by 6 % and in HCD ZT11 by 8 % groups in relation to HCD, but still increased by 30 % and 27 % in HCD ZT01 and HCD ZT11 respectively in relation to control, to note HCD weight gain was higher by 40 % than control). Intriguing that group HCD water beginning

from 9th week strongly demonstrate significant difference in rely to HCD by 15 % and 19 % per following weeks.

Unexpectedly, we observed significant difference in dynamic of weight gain rate (Fig. 3). In all group, which receive melatonin (HCD ZT01, HCD ZT11 and HCD water; accept of M ZT01, M ZT11 and M water) we have sighted reduction of weight gain rate already at the beginning of treatment on 8 experimental week (2 week after melatonin administration starting). The following 9th week (3rd week of all experiment) we found reduce value of this parameter more in group HCD ZT11 and HCD water by 67 % and 59 % respectively than in HCD ZT01 – only by 30 %.

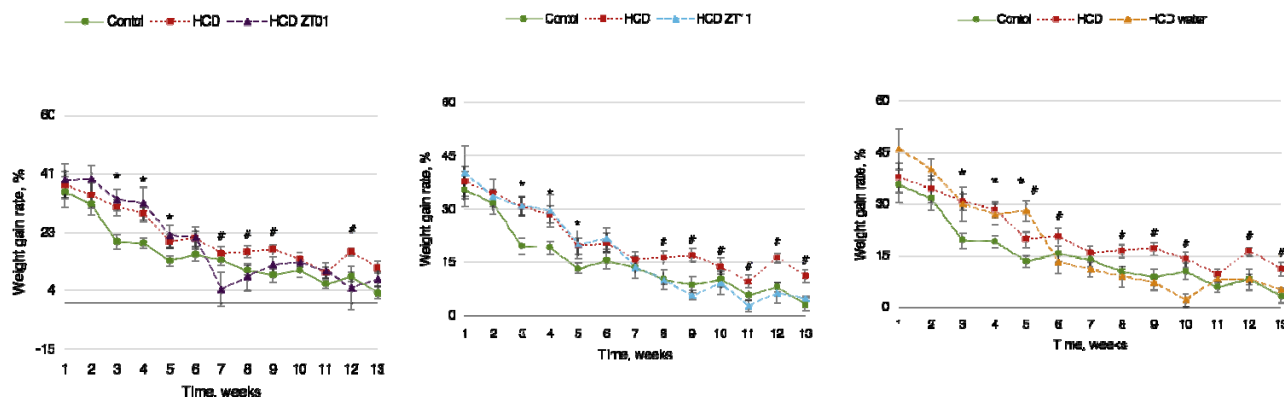


Fig. 3. Dynamics of weight gain rate during melatonin treatment.

Data are presented as the $M \pm SEM$;

$p < 0.05$ compared group HCD ZT01, or HCD ZT11, or HCD water with control value (*) and HCD (#).

Weight gain rate during last 6 weeks of experiment in the amount demonstrate (Fig. 4) significant difference between control and HCD group: in 2 times increased in HCD, while after melatonin used it take up prominent place in HCD ZT01 and did not differ from Control / HCD group both. In spite of this, administration melatonin in the evening HCD ZT11 provoke decrease weight gain rate in 2 times (in compare with HCD) and reach control value, also as HCD water

group (observe falling in 2,5 times in relation to HCD). Animals, which receive standard chow and melatonin (M ZT01, M ZT11, M water) did not change weight gain rate in case of different mode of administration too. Similar results were estimated after intragastric administration melatonin in dose 10 mg/kg high-fat fed mice, but only between 7 pm and 8 pm [40, 41]. Morning administration in rats did not contributes to falling weight gain rate [42].

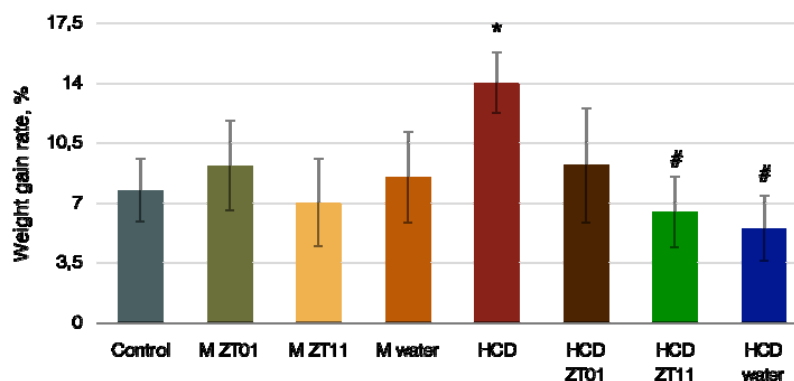


Fig. 4. Effect of melatonin on weight gain rate during last 6 weeks of study

Data are presented as the $M \pm SEM$;

* $p < 0.05$ compared with control value,

$p < 0.05$ compared with HCD group HCD ZT01, HCD ZT11, HCD water

It was noteworthy that these effects of melatonin were possibly time dependent: first way depend on amount expressed receptors on plasma membrane and second – on longer duration high melatonin level in blood flow [43].

The effect on body weight was achieved despite the fact that melatonin treatment apparently did not influence food intake, in agreement with previous observations [44, 45]. All modes of melatonin administration did not affect on food and water consumption in standard and high-calorie fed rats both (Fig. 5). During last 7 weeks HCD group consumed by 35,5 % greater kcal/g per day than Control. In case of melatonin treatment groups HCD ZT01, HCD ZT11 and HCD water ate respectively by 32 %, 40,5 % and 33,5 % more kcal/g per day in compare with Control (while their levels did not differ from HCD values). Groups without high-fed diet which receive melatonin M ZT01, M ZT11 and M water consumed food at the same level as Control. While HCD animals exhibited significantly increased food

intake levels, they tended to have lower water consumption compared with control animals by 17 % ml/g per day, herewith melatonin intake groups HCD ZT01, HCD ZT11 and HCD water also have increased this parameter by 22,8 %, 14,2 % and 20,34 % ml/g per day accordingly (and did not significantly differ from HCD). Groups without high-fed diet which receive melatonin M ZT01, M ZT11 and M water consumed water at the same level as Control. The same results water and food intake were obtained independently from developmental obesity model: after melatonin receptor agonist piromelatin use in chronically stressed rats fed a high-fat diet [46], high-fructose [47] or high-fat diet [48]; as well as from mode administration – by gavage from 8:00 to 9:00 AM 20 mg/kg melatonin [46], subcutaneous injection 500 μ g/kg melatonin at half an hour after lights off (ZT14.5) under a 14:10 h dark-light cycle [47] or with drinking solutions 25 μ g/mL (daily melatonin dosage used provided approximately 2.3 mg/kg [48].

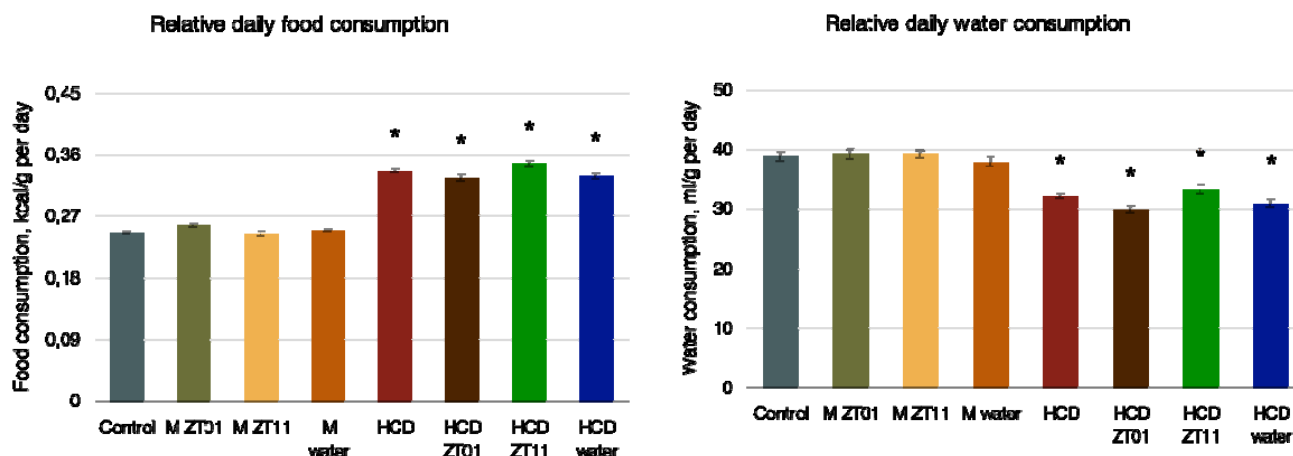


Fig. 5. Effect of melatonin treatment on relative daily food and water consumption

Data are presented as the $M \pm SEM$;

* $p < 0.05$ compared with control value,

$p < 0.05$ compared with HCD group HCD ZT01, HCD ZT11, HCD water

Conclusions. Treatment with melatonin positively modifies the body weight and visceral fat content in young male rats during development of high-calorie diet-induced obesity. The effects of different modes melatonin administration manifested in decrease weight gain rate, Lee index and relative visceral fat mass only after evening administration, as well as after delivery continuously with drinking water without any effect on food and water consumption. Although the underlying mechanisms are unclear, they may include its antioxidant properties and receptor-mediated effects, such as synchronize circadian secretion adipokine rhythmicity, increase amount of brown and beige adipocytes, growing anti-inflammatory cytokine synthesis profile etc.

Reference:

1. Dardente H. Melatonin-dependent timing of seasonal reproduction by the pars tuberalis: pivotal roles for long daylengths and thyroid hormones / H. Dardente // *J. of neuroendocrinology*. – 2012. – Vol. 24, № 2. – P. 249–266.
2. Melatonin induces browning of inguinal white adipose tissue in Zucker diabetic fatty rats / A. Jiménez-Aranda, G. Fernández-Vázquez, D. Campos et al. // *J. of pineal research*. – 2013. – Vol. 55, № 4. – P. 416–423.
3. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis / P. Boström, J. Wu, M. P. Jedrychowski et al. // *Nature*. – 2012. – Vol. 481, № 7382. – P. 463.
4. Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white adipose tissue and limit obesity / J. R. Brestoff, B. S. Kim, S. A. Saenz et al. // *Nature*. – 2015. – Vol. 519, № 7542. – P. 242.
5. A self-sustained loop of inflammation-driven inhibition of beige adipogenesis in obesity / K. J. Chung, A. Chatzigeorgiou, M. Economopoulou et al. // *Nature immunology*. – 2017. – Vol. 18, № 6. – P. 654.
6. A synergistic anti-obesity effect by a combination of capsinoids and cold temperature through promoting beige adipocyte biogenesis / K. Ohyama, Y. Nogusa, K. Shinoda et al. // *Diabetes*. – 2016. – P. db150662.
7. McQueen A. E. Fighting obesity by targeting factors regulating beige adipocytes / A. E. McQueen, S. K. Koliwad, J. C. Wang // *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. – 2018. – Vol. 21, № 6. – P. 437–443.
8. Rhythmic, reciprocal ghrelin and leptin signaling: new insight in the development of obesity / S. P. Kalra, M. Bagnasco, E. E. Otukonyong et al. // *Regulatory peptides*. – 2003. – Vol. 111, № 1–3. – P. 1–11.
9. Engin A. Circadian rhythms in diet-induced obesity / A. Engin // *Obesity and Lipotoxicity*. – Springer, Cham, 2017. – P. 19–52.
10. Melatonin reduces body weight gain in Sprague Dawley rats with diet-induced obesity / B. Prunet-Marcassus, M. Desbazeille, A. Bros et al. // *Endocrinology*. – 2003. – Vol. 144, № 12. – P. 5347–5352.
11. Song Y. Effects of melatonin administration on plasma leptin concentration and adipose tissue leptin secretion in mice / Y. Song, M. Chen // *Acta Biologica Hungarica*. – 2009. – Vol. 60, № 4. – P. 399–407.

12. Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms / P. A. Witt-Enderby, J. Bennett, M. J. Jarzynka et al. // *Life sciences*. – 2003. – Vol. 72, № 20. – P. 2183–2198.

13. Masana M. I. Melatonin differentially modulates the expression and function of the hMT1 and hMT2 melatonin receptors upon prolonged withdrawal / M. I. Masana, P. A. Witt-Enderby, M. L. Dubocovich // *Biochemical pharmacology*. – 2003. – Vol. 65, № 5. – P. 731–739.

14. Microtubules modulate melatonin receptors involved in phase-shifting circadian activity rhythms: in vitro and in vivo evidence / M. J. Jarzynka, D. K. Passey, D. A. Johnson et al. // *J. of pineal research*. – 2009. – Vol. 46, № 2. – P. 161–171.

15. Melatonin signaling in T cells: Functions and applications / W. Ren, G. Liu, S. Chen [et al.] // *Journal of pineal research*. – 2017. – Vol. 62, № 3. – P. e12394.

16. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives / J. L. Mauriz, P. S. Collado, C. Veneroso et al. // *J. of pineal research*. – 2013. – Vol. 54, № 1. – P. 1–14.

17. Melatonin expresses powerful anti-inflammatory and antioxidant activities resulting in complete improvement of acetic-acid-induced colitis in rats / G. Tahan, R. Gramignoli, F. Marongiu et al. // *Digestive diseases and sciences*. – 2011. – Vol. 56, № 3. – P. 715–720.

18. Melatonin improves glucose homeostasis in young Zucker diabetic fatty rats / A. Agil, I. Rosado, R. Ruiz et al. // *J. of pineal research*. – 2012. – Vol. 52, № 2. – P. 203–210.

19. Inflammatory biomarkers: the link between obesity and associated pathologies / M. A. Zulet, B. Puchau, C. Navarro et al. // *Nutrición hospitalaria*. – 2007. – Vol. 22. – № 5. – P. 511–527.

20. Effects of pinealectomy and exogenous melatonin on ghrelin and peptide YY in gastrointestinal system and neuropeptide Y in hypothalamic arcuate nucleus: immunohistochemical studies in male rats / M. Aydin, S. Canpolat, T. Kuloğlu et al. // *Regulatory peptides*. – 2008. – Vol. 146, № 1–3. – P. 197–203.

21. Appetite regulation: the central role of melatonin in Danio rerio / C. C. Piccinetti, B. Migliarini, I. Olivetto et al. // *Hormones and behavior*. – 2010. – Vol. 58, № 5. – P. 780–785.

22. Melatonin Receptor 1 Deficiency Affects Feeding Dynamics and Pro-Opiomelanocortin Expression in the Arcuate Nucleus and Pituitary of Mice / C. Fischer, T. Mueller, M. Pfeffer et al. // *Neuroendocrinology*. – 2017. – Vol. 105, № 1. – P. 35–43.

23. Melatonin enhances the expression of beta-endorphin in hypothalamic arcuate nucleus of morphine-dependent mice / Y. M. Wei, Y. Xu, C. X. Yu et al. // *Sheng Li Xue Bao*. – 2009. – Vol. 61. – P. 255–62.

24. Melatonin counteracts changes in hypothalamic gene expression of signals regulating feeding behavior in high-fat fed rats / M. J. Ríos-Lugo, V. Jiménez-Ortega, P. Cano-Barquilla et al. // *Hormone molecular biology and clinical investigation*. – 2015. – Vol. 21, № 3. – P. 175–183.

25. A double-blind, placebo-controlled trial related to the effects of melatonin on oxidative stress and inflammatory parameters of obese women / N. M. Alamdari, R. Mahdavi, N. Roshanravan et al. // *Hormone and Metabolic Research*. – 2015. – Vol. 47, № 07. – P. 504–508.

26. Melatonin supplementation lowers oxidative stress and regulates adipokines in obese patients on a calorie-restricted diet / K. Szewczyk-Golec, P. Rajewski, M. Gackowski et al. // *Oxidative medicine and cellular longevity*. – 2017. – Vol. 2017.

27. Diurnal rhythm of melatonin binding in the rat suprachiasmatic nucleus / J. T. Laitinen, E. Castren, O. Vakkuri et al. // *Endocrinology*. – 1989. – Vol. 124, № 3. – P. 1585–1587.
28. Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver / D. Acuña-Castroviejo, R. J. Reiter, A. Menendez-Pelaez et al. // *J. of pineal research*. – 1994. – Vol. 16, № 2. – P. 100–112.
29. Dallmann R. Chronopharmacology: new insights and therapeutic implications / R. Dallmann, S. A. Brown, F. Gachon // *Annual review of pharmacology and toxicology*. – 2014. – Vol. 54. – P. 339–361.
30. Clinical chronobiology: a timely consideration in critical care medicine / H. McKenna, G. T. van der Horst, I. Reiss et al. // *Critical Care*. – 2018. – Vol. 22, № 1. – P. 124.
31. Dyar K. A. Circadian metabolomics in time and space / K. A. Dyar, K. L. Eckel-Mahan // *Frontiers in neuroscience*. – 2017. – Vol. 11. – P. 369.
32. Effect of melatonin different time administration on the development of diet-induced obesity in rats / O. Kalmukova, A. Pustovalov, I. Varenjuk et al. // *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv- Problems of Physiological Functions Regulation*. – 2018. – Vol. 23, № 2. – P. 20–27.
33. Vitamin E regulates adipocytokine expression in a rat model of dietary-induced obesity / H. Shen, Q. Tang, J. Huang et al. // *Experimental biology and medicine*. – 2010. – Vol. 235, № 1. – P. 47–51.
34. Bernardis L. L. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions / L. L. Bernardis, B. D. Patterson // *J. of Endocrinology*. – 1968. – Vol. 40, № 4. – P. 527–528.
35. Bourgeois F. Dietary-induced obesity: effect of dietary fats on adipose tissue cellularity in mice / F. Bourgeois, A. Alexiu, D. Lemonnier // *British J. of Nutrition*. – 1983. – Vol. 49, № 1. – P. 17–26.
36. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats / S. C. Woods, R. J. Seeley, P. A. Rushing et al. // *The J. of nutrition*. – 2003. – Vol. 133, № 4. – P. 1081–1087.
37. Hariri N. High-fat diet-induced obesity in animal models / N. Hariri, L. Thibault // *Nutrition research reviews*. – 2010. – Vol. 23, № 2. – P. 270–299.
38. Kalmukova O. The effects of different time of melatonin administration on differentiation and functional status of the brown adipocytes in vivo / O. Kalmukova, M. E. Dzerzhinsky // *Cell and Organ Transplantation*. – 2018. – Vol. 6, № 1. – P. 80–85.
39. Significance and application of melatonin in the regulation of brown adipose tissue metabolism: relation to human obesity / D. X. Tan, L. C. Manchester, L. Fuentes-Broto et al. // *Obesity Reviews*. – 2011. – Vol. 12, № 3. – P. 167–188.
40. Melatonin attenuates high fat diet-induced fatty liver disease in rats / G. Hatzis, P. Ziakas, N. Kavantzias et al. // *World J. of hepatology*. – 2013. – Vol. 5, № 4. – P. 160.
41. Melatonin improves non-alcoholic fatty liver disease via MAPK-JNK/P38 signaling in high-fat-diet-induced obese mice / H. Sun, X. Wang, J. Chen et al. // *Lipids in health and disease*. – 2016. – Vol. 15, № 1. – P. C. 202.
42. Kitagawa A. Melatonin improves metabolic syndrome induced by high fructose intake in rats / A. Kitagawa, Y. Ohta, K. Ohashi // *J. of pineal research*. – 2012. – Vol. 52, № 4. – P. C. 403–413.
43. Melatonin receptor 1B–1193T> C polymorphism is associated with diurnal preference and sleep habits / A. C. P. e Silva, M. J. dos Santos, B. D. V. Koike et al. // *Sleep Medicine*. – 2018.
44. Daily melatonin administration at middle age suppresses male rate visceral fat, plasma leptin, and plasma insulin to youthful levels / D. Rasmussen, B. M. Boldt, C. Wilkinson et al. // *Endocrinology*. – 1999. – Vol. 140, № 2. – P. 1009–1012.
45. Daily melatonin administration to middle-aged male rats suppresses body weight, intraabdominal adiposity, and plasma leptin and insulin independent of food intake and total body fat / T. Wolden-Hanson, D. R. Mitton, R. L. McCants et al. // *Endocrinology*. – 2000. – Vol. 141, № 2. – P. 487–497.
46. Melatonin Receptor Agonist Piromelatin Ameliorates Impaired Glucose Metabolism in Chronically Stressed Rats Fed a High-Fat Diet / J. Zhou, D. Wang, X. Luo et al. // *J. of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2018. – Vol. 364, № 1. – P. 55–69.
47. High-Fructose Consumption Impairs the Redox System and Protein Quality Control in the Brain of Syrian Hamsters: Therapeutic Effects of Melatonin / J. C. Bermejo-Millo, M. R. M. Guimarães, B. de Luxán-Delgado et al. // *Molecular neurobiology*. – 2018. – P. 1–14.
48. Melatonin normalizes clinical and biochemical parameters of mild inflammation in diet-induced metabolic syndrome in rats / P. Cano Barquilla, E. S. Pagano, V. Jiménez-Ortega et al. // *J. of pineal research*. – 2014. – Vol. 57, № 3. – P. 280–290.
49. Brestoff J. R., Kim B. S., Saenz S. A., Stine R. R., Monticelli L. A., Sonnenberg G. F., et al. Group 2 innate lymphoid cells promote beige adipose tissue and limit obesity. *Nature*. 2015;519(7542): 242.
50. Chung K. J., Chatzigeorgiou A., Economopoulou M., Garcia-Martin R., Alexaki V. I., Mitroulis I., et al. A self-sustained loop of inflammation-driven inhibition of beige adipogenesis in obesity. *Nature immunology*. 2017;18(6): 654.
51. Ohyama K., Nogusa Y., Shinoda K., Suzuki K., Bannai M., Kajimura S. A synergistic anti-obesity effect by a combination of capsinoids and cold temperature through promoting beige adipocyte biogenesis. *Diabetes*. 2016; db150662.
52. McQueen A. E., Koliwad S. K., Wang J. C. Fighting obesity by targeting factors regulating beige adipocytes. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 2018; 21(6): 437–443.
53. Kalra S. P., Bagnasco M., Otukonyong E. E., Dube M. G., Kalra P. S. Rhythmic, reciprocal ghrelin and leptin signaling: new insight in the development of obesity. *Regulatory peptides*. 2003; 111(1-3): 1–11.
54. Engin A. Circadian Rhythms in Diet-Induced Obesity. In: Engin A., Engin A. (eds) *Obesity and Lipotoxicity. Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2017; vol 960. Springer, Cham
55. Prunet-Marcassus B., Desbazeille M., Bros A., Louche K., Delagrè P., Renard P. et al. Melatonin reduces body weight gain in Sprague Dawley rats with diet-induced obesity. *Endocrinology*. 2003; 144(12): 5347–5352.
56. Song Y., Chen M. Effects of melatonin administration on plasma leptin concentration and adipose tissue leptin secretion in mice. *Acta Biologica Hungarica*. 2009; 60(4): 399–407.
57. Witt-Enderby P. A., Bennett J., Jarzynka M. J., Firestone S., Melan M. A. Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life sciences*. 2003; 72(20): 2183–2198.
58. Masana M. I., Witt-Enderby P. A., Dubocovich M. L. Melatonin differentially modulates the expression and function of the hMT1 and hMT2 melatonin receptors upon prolonged withdrawal. *Biochemical pharmacology*. 2003; 65(5): 731–739.
59. Jarzynka M. J., Passey D. K., Johnson D. A., Konduru, N. V., Fitz N. F., Radio N. M., et al. Microtubules modulate melatonin receptors involved in phase-shifting circadian activity rhythms: in vitro and in vivo evidence. *Journal of pineal research*. 2009; 46(2): 161–171.
60. Ren W., Liu G., Chen S., Yin J., Wang J., Tan B., et al. Melatonin signaling in T cells: Functions and applications. *Journal of pineal research*. 2017; 62(3): e12394.
61. Mauriz J. L., Collado P. S., Veneroso C., Reiter R. J., González-Gallego J. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. *Journal of pineal research*. 2013; 54(1): 1–14.
62. Tahan G., Gramignoli R., Marongiu F., Aktolga S., Cetinkaya A., Tahan V., et al. Melatonin expresses powerful anti-inflammatory and antioxidant activities resulting in complete improvement of acetic-acid-induced colitis in rats. *Digestive diseases and sciences*. 2011; 56(3): 715–720.
63. Agil, A., Rosado, I., Ruiz, R., Figueroa, A., Zen, N., & Fernández-Vázquez, G. Melatonin improves glucose homeostasis in young Zucker diabetic fatty rats. *Journal of pineal research*. 2012; 52(2): 203–210.
64. Zulet M. A., Puchau B., Navarro C., Martí A., Martínez J. A. Inflammatory biomarkers: the link between obesity and associated pathologies. *Nutrición hospitalaria*. 2007; 22(5): 511–527.
65. Aydin M., Canpolat S., Kuloğlu T., Yasar A., Colakoglu N., Kelestimur H. Effects of pinealectomy and exogenous melatonin on ghrelin and peptide YY in gastrointestinal system and neuropeptide Y in hypothalamic arcuate nucleus: immunohistochemical studies in male rats. *Regulatory peptides*. 2008; 146(1-3): 197–203.
66. Piccinetti C. C., Migliarini B., Olivetto I., Coletti G., Amici A., Carnevali O. Appetite regulation: the central role of melatonin in Danio rerio. *Hormones and behavior*. 2010; 58(5): 780–785.
67. Fischer C., Mueller T., Pfeffer M., Wicht H., von Gall C., Korf H. W. Melatonin Receptor 1 Deficiency Affects Feeding Dynamics and Pro-Opiomelanocortin Expression in the Arcuate Nucleus and Pituitary of Mice. *Neuroendocrinology*. 2017;105(1): 35–43.
68. Wei Y. M., Xu Y., Yu C. X., Han J. Melatonin enhances the expression of beta-endorphin in hypothalamic arcuate nucleus of morphine-dependent mice. *Sheng Li Xue Bao*. 2009; 61: 255–62.
69. Ríos-Lugo M. J., Jiménez-Ortega V., Cano-Barquilla P., Mateos P. F., Spinedi E. J., Cardinali D. P. et al. Melatonin counteracts changes in hypothalamic gene expression of signals regulating feeding behavior in high-fat fed rats. *Hormone molecular biology and clinical investigation*. 2015; 21(3): 175–183.
70. Alamdari N. M., Mahdavi R., Roshanravan N., Yaghini N. L., Ostadrahimi A. R., Faramarzi E. A double-blind, placebo-controlled trial related to the effects of melatonin on oxidative stress and inflammatory parameters of obese women. *Hormone and Metabolic Research*. 2015; 47(07): 504–508.
71. Szweczyk-Golec K., Rajewski P., Gackowski M., Mila-Kierzenkowska C., Wesolowski R., Sutkowy P., et al. Melatonin supplementation lowers oxidative stress and regulates adipokines in obese patients on a calorie-restricted diet. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2017.
72. Laitinen J. T., Castren E., Vakkuri O., Saavedra J. M. Diurnal rhythm of melatonin binding in the rat suprachiasmatic nucleus. *Endocrinology*. 1989; 124(3): 1585–1587.

Reference

1. Dardente, H. Melatonin-dependent timing of seasonal reproduction by the pars tuberalis: pivotal roles for long daylengths and thyroid hormones. *Journal of neuroendocrinology*. 2012; 24(2): 249–266.
2. Jiménez-Aranda A., Fernández-Vázquez G., Campos D., Tassi M., VelascoPerez L., Tan D. X. et al. Melatonin induces browning of inguinal white adipose tissue in Zucker diabetic fatty rats. *Journal of pineal research*. 2013; 55(4): 416–423.
3. Boström P., Wu J., Jedrychowski M. P., Korde A., Ye L., Lo J. C., et al. A PGC1-α-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*. 2012; 481(7382): 463.

28. Acuña-Castroviejo D., Reiter R. J., Menendez-Pelaez A., Pablos M. I., Burgos A. Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver. *Journal of pineal research*. 1994; 16(2): 100-112.
29. Dallmann R., Brown S. A., Gachon F. Chronopharmacology: new insights and therapeutic implications. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2014; 54: 339-361.
30. McKenna H., van der Horst G. T., Reiss I., Martin D. Clinical chronobiology: a timely consideration in critical care medicine. *Critical Care*. 2018; 22(1):124.
31. Dyar K. A., Eckel-Mahan K. L. Circadian metabolomics in time and space. *Frontiers in neuroscience*. 2017;11: 369.
32. Kalmukova O., Pustovalov A., Varenjuk I., Dzerzhynsky M. Effect of melatonin different time administration on the development of diet-induced obesity in rats. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv-Problems of Physiological Functions Regulation*. 2018; 23(2): 20-27.
33. Shen X. H., Tang Q. Y., Huang J., Cai W. Vitamin E regulates adipocytokine expression in a rat model of dietary-induced obesity. *Experimental biology and medicine*. 2010; 235(1): 47-51.
34. Bernardis L. L., Patterson B. D. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *Journal of Endocrinology*. 1968;40(4): 527-528.
35. Bourgeois F., Alexiu A., Lemonnier D. Dietary-induced obesity: effect of dietary fats on adipose tissue cellularity in mice. *British Journal of Nutrition*. 1983; 9(1): 17-26.
36. Woods S. C., Seeley R. J., Rushing P. A., D'Alessio D., Tso P. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *The Journal of nutrition*. 2003; 133(4): 1081-1087.
37. Hariri N., Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutrition research reviews*. 2010; 23(2): 270-299.
38. Kalmukova O., Dzerzhynsky M. E. The effects of different time of melatonin administration on differentiation and functional status of the brown adipocytes in vivo, Cell and Organ Transplantation. 2018, 6 (1): 80-85.
39. Tan D. X., Manchester L. C., Fuentes-Broto L., Paredes S. D., Reiter R. J. Significance and application of melatonin in the regulation of brown adipose tissue metabolism: relation to human obesity. *Obesity Reviews*. 2011; 12(3): 167-188.
40. Hatzis G., Ziakas P., Kavantzis N., Triantafyllou A., Sigalas P., Andreadou I., et al. Melatonin attenuates high fat diet-induced fatty liver disease in rats. *World journal of hepatology*. 2013; 5(4): 160.
41. Sun H., Wang X., Chen J., Song K., Gusdo, A. M., Li L., et al. Melatonin improves non-alcoholic fatty liver disease via MAPK-JNK/P38 signaling in high-fat-diet-induced obese mice. *Lipids in health and disease*. 2016; 15(1): 202.
42. Kitagawa A., Ohta Y., Ohashi K. Melatonin improves metabolic syndrome induced by high fructose intake in rats. *Journal of pineal research*. 2012; 52(4): 403-413.
43. e Silva A. C. P., dos Santos M. J., Koike B. D. V., Moreira M. S. A., Gitai, D. L. G., de Miranda Coelho J. A. P., et al. Melatonin receptor 1B- 1193T> C polymorphism is associated with diurnal preference and sleep habits. *Sleep Medicine*. 2018;
44. Rasmussen D. D., Boldt B. M., Wilkinson C., Yellon S. M., Matsumoto A. M. Daily melatonin administration at middle age suppresses male rat visceral fat, plasma leptin, and plasma insulin to youthful levels. *Endocrinology*. 1999; 140(2): 1009-1012.
45. Wolden-Hanson T., Mitton D. R., McCants R. L., Yellon S. M., Wilkinson C. W., Matsumoto A. M., et al. Daily melatonin administration to middle-aged male rats suppresses body weight, intraabdominal adiposity, and plasma leptin and insulin independent of food intake and total body fat. *Endocrinology*. 2000;141(2): 487-497.
46. Zhou J., Wang D., Luo X., Jia X., Li M., Laudon M., et al. Melatonin Receptor Agonist Piromelatin Ameliorates Impaired Glucose Metabolism in Chronically Stressed Rats Fed a High-Fat Diet. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2018; 364(1): 55-69.
47. Bermejo-Millo J. C., Guimarães M. R. M., de Luxán-Delgado B., Potes Y., Pérez-Martínez Z., Díaz-Luis A., et al. High-Fructose Consumption Impairs the Redox System and Protein Quality Control in the Brain of Syrian Hamsters: Therapeutic Effects of Melatonin. *Molecular neurobiology*. 2018; 1-14.
48. Cano Barquilla P., Pagano E. S., Jiménez-Ortega V., Fernández-Mateos P., Esquivino A. I., Cardinali, D. P. Melatonin normalizes clinical and biochemical parameters of mild inflammation in diet-induced metabolic syndrome in rats. *Journal of pineal research*. 2014; 57(3): 280-290.
- Надійшла до редколегії 24.09.2018
Отримано виправлений варіант 25.10.2018
Підписано до друку 25.10.2018
- Received in the editorial 24.09.2018
Received a revised version on 25.10.2018
Signed in the press on 25.10.2018

О. Калмикова, асп.,
А. Юрченко, асп.,
М. Дзержинський, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ВПЛИВ РІЗНИХ РЕЖИМІВ ВВЕДЕННЯ МЕЛАТОНІНУ НА РОЗВИТОК ВИСОКОКАЛОРИЙНОГО ОЖИРІННЯ У ЩУРІВ

Зараз активно вивчаються можливості застосування мелатоніну при терапії ожиріння для нормалізації секреції адипокінів, зниження прозапального стану в жировій тканині, стимуляції появи бежевих адипоцитів, модуляції гіпоталамічних сигналів харчової поведінки й терморегуляції через активацію функціонування бурих адипоцитів; проте підбір ефективних режимів, шляхів і доз введення потребує детального вивчення. Метою нашого дослідження було визначення впливу різного часу введення мелатоніну та способу на зміну ваги тіла щурів при розвитку ожиріння, викликаного висококалорійною дієтою (ВКД). Мелатонін вводили щодня протягом 7 тижнів дозою 30 мг/кг за 1 год після включення світла (ZT01) або за 1 год до вимкнення (ZT11), або постійно з питною водою (ВКД вода). Були виміряні такі параметри, як приріст маси, швидкість приросту маси тіла, індекс маси тіла, індекс Лі, відносна маса вісцерального жиру, щоденна кількість споживання їжі та води. Мелатонін значно зменшує приріст маси тіла в групі ВКД ZT11 та ВКД вода у 2 і 2,5 рази; показники індексу Лі – на 6,6 та 7,3 %; відносну масу вісцерального жиру – на 38,5 %, відповідно, порівняно з ВКД. Тварини без ВКД, які отримували мелатонін, не змінювали вищезазначених параметрів, окрім відносної маси вісцерального жиру (вона знижувалася порівняно з контролем). Вплив різних режимів введення мелатоніну виявляється у зниженні швидкості приросту маси, індексу Лі та відносної маси вісцеральної жирової тканини у щурів з індукованим ожирінням лише після вечірнього введення, а також при постійному прийомі з питною водою без будь-якої дії на споживання їжі та води.

Ключові слова: мелатонін, ожиріння, висококалорійна дієта, хронобіологія, маса вісцерального жиру.

О. Калмыкова, асп.,
А. Юрченко, асп.,
Н. Дзержинский, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ВЛИЯНИЕ РАЗНЫХ РЕЖИМОВ ВВЕДЕНИЯ МЕЛАТОНИНА НА РАЗВИТИЕ ВИСОКОКАЛОРИЙНОГО ОЖИРЕНИЯ У КРЫС

Сейчас активно изучают возможности применения мелатонина при терапии ожирения для нормализации секреции адипокинов, снижения провоспалительного состояния в жировой ткани, стимуляции появления бежевых адипоцитов, модуляции гипоталамических сигналов пищевого поведения и терморегуляции через активацию функционирования бурых адипоцитов; однако подбор эффективных режимов, способов и дозы введения требует детальное изучение. Целью нашего исследования было определение влияния разного времени введения мелатонина и способа на изменение веса тела крыс при развитии ожирения, вызванного высококалорийной диетой (ВКД). Мелатонин вводили ежедневно в течение 7 недель дозой 30 мг/кг за 1 час после включения света (ZT01) или за 1 час до отключения (ZT11), или постоянно с питьевой водой (ВКД вода). Были измерены такие параметры, как прирост массы, скорость прироста массы тела, индекс массы тела, индекс Ли, относительная масса висцерального жира, ежедневное количество потребления пищи и воды. Мелатонин значительно уменьшает прирост массы тела в группе ВКД ZT11 и ВКД вода в 2 и 2,5 раза; показатели индекса Ли – на 6,6 и 7,3 %; относительную массу висцерального жира – на 38,5 %, соответственно, по сравнению с ВКД. Животные без ВКД, которые получали мелатонин, не меняли вышеупомянутых параметров, кроме относительной массы висцерального жира (она снижалась по сравнению с контролем). Влияние различных режимов введения мелатонина проявляется в снижении скорости прироста массы, индекса Ли и относительной массы висцеральной жировой ткани у крыс с индуцированным ожирением только после вечернего ввода, а также при постоянном приеме с питьевой водой без какого-либо действия на потребление пищи и воды.

Ключевые слова: мелатонин, ожирение, высококалорийная диета, хронобиология, масса висцерального жира.

УДК 612.82/83

В. Вознюк, студ.,
Н. Філімонова, канд. фіз.-мат. наук,
М. Макарчук, д-р біол. наук,
І. Зима, д-р біол. наук,
О. Горбунов, канд. біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
В. Кальниш, д-р біол. наук
Інститут медицини праці імені Ю. І. Кундієва НАМН України, Київ, Україна

РЕГУЛЯЦІЯ СЕРЦЕВОГО РИТМУ ТА АКТИВНІСТЬ ГОЛОВНОГО МОЗКУ БІЙЦІВ ІЗ ЧЕРЕПНО-МОЗКОВИМИ ТРАВМАМИ ТА ПОСТТРАВМАТИЧНИМ СТРЕСОВИМ РОЗЛАДОМ ПРИ ЗДІЙСНЕННІ РЕАКЦІЇ ВИБОРУ

У дослідженні взяли участь 61 чоловік-добровольць: 23 з них – студенти Київського національного університету імені Тараса Шевченка (контрольна група), 14 – бійці з черепно-мозковою травмою – пацієнти Інституту медицини праці ім. Ю. І. Кундієва НАМН України та 24 добровольці, серед яких 14 – бійці з черепно-мозковою травмою та 10 – із посттравматичним стресовим розладом – пацієнти Центру медичної реабілітації та санаторного лікування МО України "Пуща-Водиця". Результати ЕЕГ- та ЕКГ-досліджень під час тестування реакції вибору виявили в бійців із черепно-мозковою травмою порівняно з контрольною групою значуще зниження швидкості реакції вибору, тоді як у бійців із посттравматичним стресовим розладом швидкість реакції вибору не відрізнялась від контрольної групи. В обстежуваних бійців із черепно-мозковою травмою реакції вибору здійснювалися на тлі зниження активності симпатичного відділу вегетативної нервової системи порівняно зі здійсненням простої сенсомоторної реакції. При реалізації реакції вибору обстежуваними контрольною групи найбільший рівень активності виявлявся в передній поясній звивині, тоді як у обстежуваних із черепно-мозковою травмою – у парієтальній корі, а в обстежуваних із посттравматичним стресовим розладом – у середній лобній звивині.

Ключові слова: реакція вибору, бійці з черепно-мозковою травмою, посттравматичний стресовий розлад, LORETA, передня поясна звивина, активність симпатичного відділу вегетативної нервової системи.

Вступ. Соціальне прийняття рішень передбачає збалансування конфліктів між різними позиціями, егоїзмом і просоціальною поведінкою тощо. Пізнавальні процеси, що лежать в основі таких рішень, у першу чергу базуються на реакції вибору (РВ) [1]. Порушення інформаційних процесів при реалізації РВ може призвести до неадекватного компромісу між швидкістю і точністю, неадекватних рейтингів довіри та неадекватних висновків, які пов'язані з різними ілюзіями при сприйнятті й упередженнями. На відміну від простої сенсомоторної реакції (ПСМР), яка є сумою часу сприйняття стимулу та моторної відповіді, у час реакції вибору входять додаткові складові – час ідентифікації стимулу та час прийняття рішення як саме реагувати. У [2] було показано, що тренування або життєва практика сприяють тому, що час реакції при багатоальтернативному виборі поступово зменшується і стає майже постійним, перестає залежати від кількості альтернативних ситуацій і приблизно дорівнює часу реакції при застосуванні лише двох альтернативних стимулів (часу диз'юнктивної реакції). На основі цього можна стверджувати, що саме диз'юнктивна реакція є базовою характеристикою РВ. Тому швидкість РВ є критичним параметром у процесах прийняття рішення. Черепно-мозкова травма (ЧМТ) – одна з найбільш розповсюджених форм ураження головного мозку серед військовослужбовців під час бойових дій [3]. ЕЕГ-дослідження під час виконання тесту на РВ дає можливість виявити структури головного мозку, які беруть участь у реалізації процесу вибору, а ЕКГ-дослідження дозволяє оцінити ціну, яку при цьому платить організм. Тому **метою роботи** було дослідити особливості активності головного мозку та стану регуляторних систем серцево-судинної системи при тестуванні РВ у військовослужбовців ЗСУ, які отримали ЧМТ під час бойових дій на сході України, далі – бійців із ЧМТ.

Об'єкт та методи досліджень. В обстеженні взяли участь 23 добровольці-чоловіки, правші віком 18-21 рік, без скарг на здоров'я – студенти Київського університету імені Тараса Шевченка (контрольна група), 14 добровольців-чоловіків, правші віком 27-43 роки, бійці з ЧМТ – пацієнти Інституту медицини праці ім. Ю. І. Кундієва НАМН України та 24 добровольці-чоловіки, правші віком 20-51 рік: 14 бійців із ЧМТ та 10

із посттравматичним стресовим розладом (ПТСР) – пацієнти Центру медичної реабілітації та санаторного лікування МО України "Пуща-Водиця". Усі обстежувані були поінформовані стосовно схеми проведення обстежень і надали письмову згоду відповідно до Гельсинської етичної декларації. В усіх обстежуваних реєстрували електрокардіограму (ЕКГ) та електроенцефалограму (ЕЕГ) до початку обстеження (по 3 хв фоновий запис із закритими та відкритими очима) і під час проходження комп'ютерних тестів визначали просту сенсомоторну реакцію (ПСМР) та РВ. Тест ПСМР описано в [4]. У тесті РВ обстежуваному у випадковому порядку на моніторі комп'ютера пред'являлись 100 стимулів – квадрат або трикутник, на появу яких треба було реагувати відповідно правою або лівою рукою. На помилкову реакцію комп'ютер не реагував, а чекав на правильну реакцію, тобто в тесті реєструвався час моторної відповіді на правильно ідентифіковане зображення (час реакції правою рукою РВП, лівою – РВЛ) і розраховувався час РВ = (РВП + РВЛ)/2. Треба зазначити, що в загальній швидкості здійснення реакції вибору найбільша затримка часу відбувається саме в центральній ланці, де, власне, і відбуваються самі процеси вибору.

Для реєстрації та аналізу ЕЕГ використовували комплекс "Нейрон-Спектр-4/ВП" (НейроСофт, Росія, 2006). Запис ЕЕГ здійснювався монополярно, референтний електрод було розташовано на мочці вуха з кожного боку, частота квантування ЕЕГ дорівнювала 500 Гц. Було використано мостикові посріблені електроди, які накладались за міжнародною системою 10–20 % у 19 стандартних відведеннях. Реєстрація ЕКГ проводилась протягом усього тестування за допомогою програмно-апаратного комплексу "Поли-Спектр+" (ООО Нейрософт, Росія, 2006). Електроди для реєстрації ЕКГ накладались за такою схемою: чорний і зелений – на нижню третину правої та лівої гомілки, відповідно, червоний і жовтий – на рівні п'ятого міжребер'я на правій та лівій край грудної клітини, відповідно, з метою усунення можливих артефактів унаслідок роботи м'язів рук при проходженні комп'ютерного тестування. Статистичний аналіз отриманих даних проводився за допомогою пакету прикладних програм STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc, USA, 2004). Нормальність розподілу пере-

вирялась тестом Шапіро – Уїлка. Оскільки розподіл більшості параметрів був відмінний від нормального ($p < 0,05$), то для порівняння двох незалежних вибірок використовувався критерій Манна – Уїтні, а для порівняння двох залежних вибірок – критерій Вілкоксона. Критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез приймався рівним $p = 0,05$. Для опису вибіркового розподілу вказували медіану (Me) і нижній (25 %) та верхній (75 %) квартилі: Me [25 %; 75 %]. Крім того, у програмі нейровізуалізації LORETA було визначено координати диполів активності головного мозку та відповідні мозкові структури під час виконання тестових завдань.

Результати та їх обговорення. Між пацієнтами з ЧМТ Інституту медицини праці й пацієнтами Центру медичної реабілітації та санаторного лікування не було виявлено відмінностей у швидкості РВ ($p = 0,22$) і показниках стану регуляторних систем серцево-судинної системи ($p > 0,05$). Зважаючи на це, у подальшому аналізі результатів дослідження вони розглядалися як одна вибірка, а саме бійці з ЧМТ. Проведений аналіз результатів показав, що в бійців із ЧМТ час РВЛ був значуще більшим: 498 [451; 566] мс, ніж у обстежуваних контрольної групи: 436 [411; 493] мс ($p = 0,01$). Порівняння швидкості РВП у обстежуваних цих двох груп значущих відмінностей не виявило ($p > 0,05$). У групі бійців із ПТСР не було виявлено значущих відмінностей у РВ порівняно з контрольною групою: 477 [417; 608] мс vs. 436 [411; 493] мс ($p = 0,53$). Спектральний аналіз варіабельності серцевого ритму та варіаційна пульсометрія показали, що в контрольній групі при тестуванні РВ порівняно із ПСМР усі показники як симпатичного, так і парасимпатичного відділів автономної нервової системи залишалися незмінними ($p > 0,05$). У групі бійців із ПТСР також не було виявлено змін у симпато-парасимпатичному балансі та індексі напруги регуляторних систем при тестуванні РВ vs. ПСМР ($p > 0,05$). У той же час у групі бійців із ЧМТ було виявлено значуще зниження амплітуди моди (АМО) під

час РВ порівняно з ПСМР: 49,95 [47,20;73,20] % vs. 63,95 [52,25;87,35] % ($p = 0,04$) при незмінному рівні моди (Мо): 0,80 [0,66;0,96]с vs. 0,76 [0,67;0,92]с ($p = 0,18$). АМО – кількість у відсотках R-R інтервалів, що відповідає діапазону моди; відображає ступінь впливу симпатичного відділу ВНС і, відповідно, ступінь централізації контролю серцевого ритму, тоді як Мо – значення величини R-R інтервалів, що зустрічається найчастіше та відображає домінуючий рівень функціонування синоатріального вузла і характеризує ступінь парасимпатичної активності. Як у контрольній групі, так і в групі бійців із ПТСР симпатичний і парасимпатичний тонус ВНС під час виконання тестів ПСМР та РВ свідчив про сталий характер адаптаційних процесів до виконання завдань, тобто ціна виконання тестів ПСМР та РВ була однаковою. У той же час у групі бійців з ЧМТ виявлено парадоксальне зменшення впливу симпатичного відділу та відсутність змін в активності парасимпатичного відділу, при цьому швидкість РВЛ була значуще нижчою, ніж у контрольній групі. Адаптаційно-трофічна функція симпатичного відділу спрямована на регуляцію інтенсивності обмінних процесів, що забезпечує пристосування організму до поточного навантаження. Тест РВ є складнішим порівняно з ПСМР, тому було б природно припустити, що в цьому випадку повинен був би активізуватись саме симпатичний відділ ВНС або принаймні його активність мала б залишитись на попередньому рівні.

Для виявлення причин, які викликали парадоксальне зниження активності симпатичного відділу в бійців із ЧМТ при виконанні більш складного завдання РВ порівняно з ПСМР, було проведено аналіз активності головного мозку обстежуваних та визначення координат структур, які були задіяні при виконанні вказаних тестових завдань. За результатами LORETA в контрольній групі найбільш активними були зони ACC та BA 17, 18 (рис. 1, табл. 1).

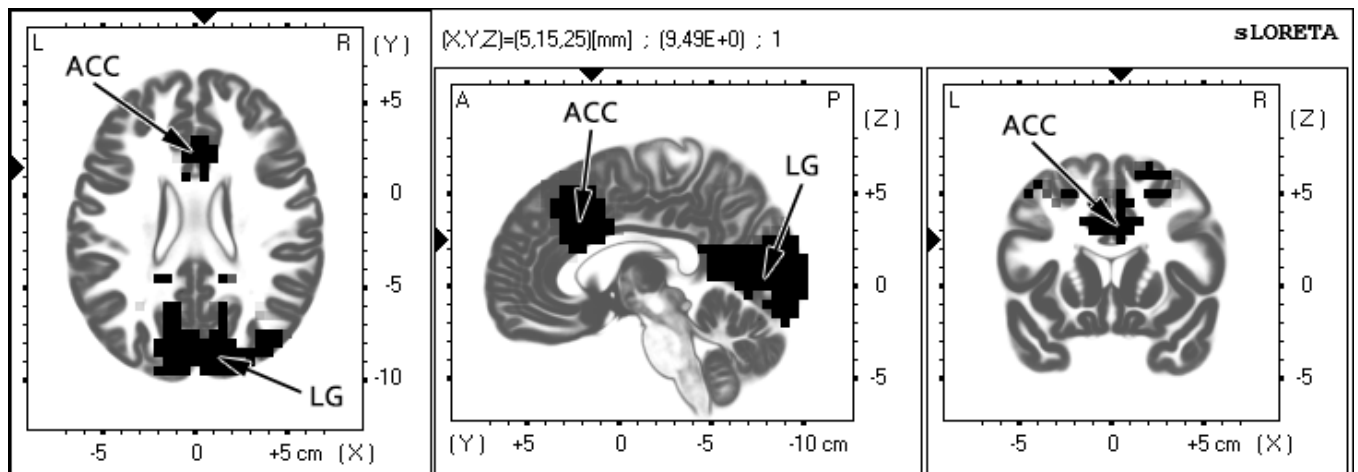


Рис. 1. Зони активності головного мозку в контрольній групі (n=23) відносно нуля під час виконання тесту РВ

У [5] розкрито високоспецифічний внесок зони ACC у виявлення інформаційних конфліктів як на стадії ідентифікації стимулів, так і на стадії формування релевантної відповіді. ACC сприяє когнітивним процесам, здійснюючи контроль за наявністю помилок в інформаційних процесах та їх компенсаційне корегування [6]. Зона BA 17 первинної зорової кори була ідентифікована як така, де відбувається представлення контурів пред'явлених фігур [7]. В рамках ієрархічної мережі візуальної обробки в зоні BA 18 екстрастріарної кори увага переключається на визначення форми

та кольору стимулу [8]. Можливість здійснювати контроль над автоматичною поведінкою дозволяє переривати цю поведінку, коли вона стає невідповідною або небезпечною. У [9] показано, що зона BA 40 – ліва IPL – залучена до петлі виконавчого управління нашою поведінкою. Cuneus модулює увагу, бере участь у процесах оперативної пам'яті й оцінювання нагороди [10]. Таким чином, у контрольній групі до процесу вибору були залучені фронтопарієтальноокципітальні зони ідентифікації стимулу й адекватного процесу прийняття рішення щодо вибору релевантної відповіді

за умови узгодження конфліктної інформації, оцінювання помилкових рішень і стратегічних можливостей. Отже, за результатами тесту РВ можна очікувати, що обстежувані контрольної групи здатні приймати зважені, обґрунтовані, оптимальні й узгоджені рішення.

У групі бійців із ЧМТ при тестуванні РВ найвищою була активність у Subgenual gyrus та Paraterminal gyrus (рис. 2, табл. 1).

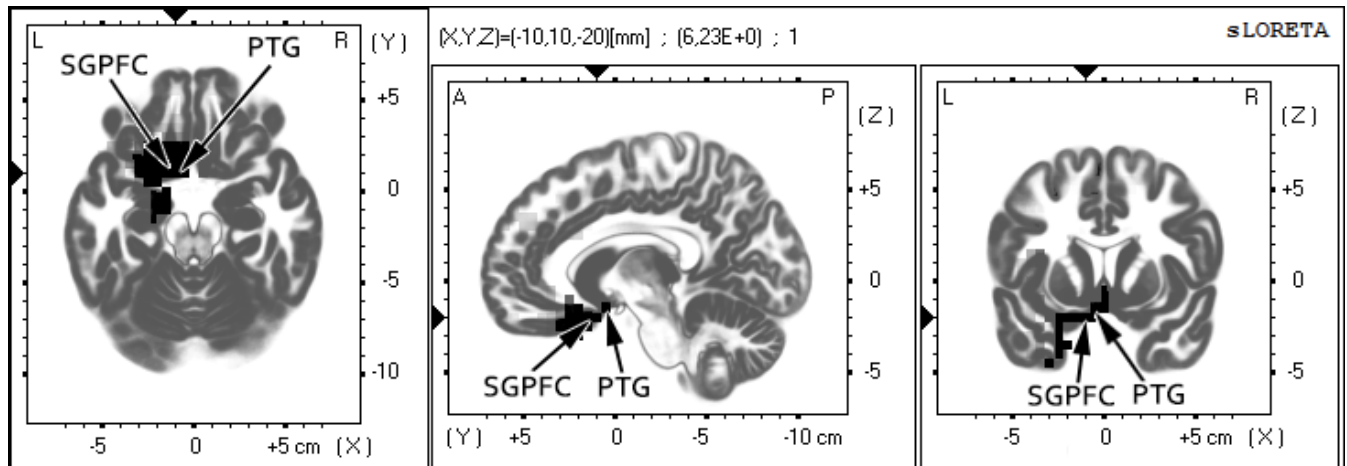


Рис. 2. Зони активності головного мозку в групі з ЧМТ (n=24) відносно нуля під час виконання тесту РВ

Таблиця 1. Структури головного мозку обстежуваних із максимальною активністю за програмою LORETA під час тестування РВ

X (MMI)	Y (MMI)	Z (MMI)	Voxel Value	Brodmann area	Lobe, Side	Structure
контрольна група (n=23), активність головного мозку відносно нуля						
5	15	25	9,49	24	Limbic Lobe, R	Anterior Cingulate Cortex (ACC)
5	10	25	9,47	33	Limbic Lobe, R	Anterior Cingulate Cortex (ACC)
5	-90	-20	9,47	18	Occipital Lobe, R	Lingual Gyrus (LG)
5	-90	-10	9,37	17	Occipital Lobe, R	Lingual Gyrus (LG)
10	20	30	9,21	32	Limbic Lobe, R	Anterior Cingulate Cortex (ACC)
5	-75	5	9,04	30	Occipital Lobe, R	Cuneus
-40	-50	40	8,91	40	Parietal Lobe, L	Inferior Parietal Lobule (IPL)
-5	-75	10	8,88	23	Occipital Lobe, L	Cuneus
5	-55	10	8,82	29	Limbic Lobe, R	Posterior Cingulate cortex (PCC)
група бійців із ЧМТ (n=24), активність головного мозку відносно нуля						
-10	10	-20	6,23	25	Frontal Lobe, L	Subgenual gyrus (sgpfc)
-10	5	-15	6,22	34	Frontal Lobe, L	Paraterminal gyrus (ptg)
-10	15	-20	5,92	11	Frontal Lobe, L	Rectus Gyrus (GR)
-15	15	-15	5,9	13	Frontal Lobe, L	Paraterminal gyrus (ptg)
-15	15	-25	5,9	47	Frontal Lobe, L	Inferior Frontal Gyrus (IFG)
-20	10	-35	5,38	38	Temporal Lobe, L	Superior Temporal Gyrus (STG)
-20	5	-30	5,16	28	Limbic Lobe, L	Uncus
-5	20	-10	4,81	32	Limbic Lobe, L	Anterior Cingulate Cortex(ACC)
-20	0	-40	4,6	36	Limbic Lobe, L	Uncus
група бійців із ПТСР (n=10), активність головного мозку відносно нуля						
35	25	40	10,1	9	Frontal Lobe, R	Middle Frontal Gyrus (MFG)
35	25	45	10,08	8	Frontal Lobe, R	Middle Frontal Gyrus (MFG)
35	25	35	10,06	9	Frontal Lobe, R	Middle Frontal Gyrus(MFG)
-40	-50	60	9,85	40	Parietal Lobe, L	Inferior Parietal Lobule (IFL)
40	25	40	9,53	9	Frontal Lobe, R	Precentral Gyrus (PG)
-40	-50	55	9,31	40	Parietal Lobe, L	Inferior Parietal Lobule (IPL)
35	20	55	8,94	8	Frontal Lobe, R	Superior Frontal Gyrus (SFG)
40	-55	25	8,34	39	Temporal Lobe, R	Superior Temporal Gyrus (STG)
-5	25	-5	8,09	24	Limbic Lobe, L	Anterior Cingulate Cortex(ACC)

На процес прийняття рішення в певних ситуаціях великий вплив здійснює мотиваційний аспект, що може зумовити різні форми неадаптивної поведінки. Зазначимо, що ліва Subgenual gyrus залучена до моральних міркувань при прийнятті рішення [11], а активність Paraterminal gyrus виявлена в емоційній складовій процесу вибору, особливо у випадку високого ризику/нагороди й меншою мірою – при очікуванні [12]. Зона BA 11 (Rectus Gyrus) також бере участь у процесах прийняття рішення, у яких залучена нагорода [13]. Ліва

IFG активується в мовних задачах [14], тобто можна припустити, що обстежувані визначали стимули – трикутник і квадрат – не як візуальні образи, а як їхню вербалізовану ідентифікацію. Зона STG задіяна при згадуванні структури знайомих об'єктів [15]. Зазначимо, що Uncus (BA 28) належить до гіпокампальної зони та задіяний у процесах визначення невідповідних стимулів [16]. У групі бійців із ЧМТ була виявлена латералізована активність у лівій півкулі під час пред'явлення геометричних фігур, які мають бути адекватно ідентифіковані

в правій півкулі, причому відповіді необхідно давати поперемінно правою та лівою рукою. Таким чином, можна припустити, що в бійців із ЧМТ була сформована неадекватна вербалізована система прийняття рішень, яка спиралась більшою мірою на емоційну складову.

Вони більше схильні приймати ризиковані рішення, приділяючи більшу увагу винагороди.

Порівняно з контрольною групою в групі бійців із ЧМТ більше були активовані парієтальна зона та Precuneus і Cuneus (рис. 3, табл. 2).

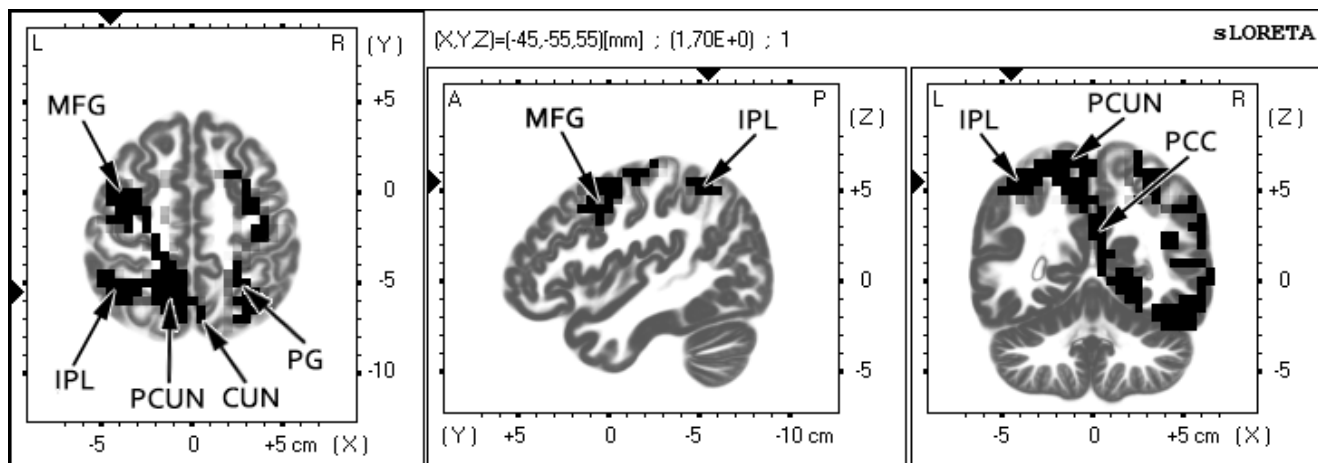


Рис. 3. Зони підвищеної активності головного мозку в групі з ЧМТ (n=24) порівняно з контрольною групою (n=23) під час виконання тесту РВ

Таблиця 2. Структури головного мозку з максимальною активністю за програмою LORETA під час тестування РВ у групі з ЧМТ (n=24) порівняно з контрольною групою (n=23)

X (MMI)	Y (MMI)	Z (MMI)	Voxel Value	Brodman area	Lobe, Side	Structure
-45	-55	55	1,7	40	Parietal Lobe, L	Inferior Parietal Lobule
-15	-65	65	1,67	7	Parietal Lobe, L	Precuneus
-50	10	40	1,66	9	Frontal Lobe, L	Middle Frontal Gyrus (MFG)
-50	10	45	1,66	8	Frontal Lobe, L	Middle Frontal Gyrus (MFG)
-5	-50	40	1,65	31	Limbic Lobe, L	Cingulate Gyrus (CG)
-50	5	50	1,64	6	Frontal Lobe, L	Middle Frontal Gyrus (MFG)
-20	-50	70	1,63	5	Parietal Lobe, L	Postcentral Gyrus (PG)
10	-80	35	1,62	19	Occipital Lobe, R	Cuneus
5	-50	25	1,6	23	Limbic Lobe, R	Posterior Cingulate cortex (PCC)

Нагадаємо, що IPL залучена до виконавчого контролю за поведінкою [9], а Precuneus і Cuneus узгоджують зорову інформацію із сомато-сенсорним відгуком [10], тобто порівняно з контрольною групою, обстежувані якої приймали рішення із залученням АСС, у бійців із ЧМТ до процесів прийняття рішення більшою мірою була залучена парієтальна кора.

Зона АСС залучена до процесу регуляції симпатичної активності відповідно до поточного навантаження, часто-та серцебиття прискорюється під час цільової обробки інформації [17]. Оскільки в бійців із ЧМТ активність АСС була знижена (рис. 1, табл. 1), то відповідно й активність симпатичного відділу ВНС виявилась зниженою. Крім того, у [18] було показано, що права півкуля головного мозку переважно контролює активність симпатичного відділу ВНС, а ліва – парасимпатичного. Оскільки нами була виявлена депресія активності правої півкулі під час виконання тесту РВ у бійців із ЧМТ, то відповідно й тонус симпатичного відділу був нижчим при збереженому рівні активності парасимпатичного відділу.

Постає питання: чому в бійців із ПТСР не виявлено аналогічного зниження активності симпатичного відділу та швидкості РВ? Аналіз диполів активності головного мозку показав, що в них процеси прийняття рішення відбувались із залученням правої МFG при достатньо активній АСС (табл. 1). У роботі [19] показано, що права МFG активується при прийнятті рішення з оцінюванням конфліктних інформаційних процесів і винагороди. Отже, саме при ЧМТ була виявлена знижена активність

АСС, яка і призвела як до погіршення швидкості РВ, так і до зниження симпатичної активації.

Висновки. Було виявлено значуще зниження швидкості реакції вибору в бійців із ЧМТ порівняно з контрольною групою, при цьому в бійців із ПТСР швидкість реакції вибору не відрізнялась від контрольної групи. Порівняно з тестом простої сенсомоторної реакції тільки в бійців із ЧМТ при тестуванні реакції вибору було виявлено зниження активності симпатичного відділу ВНС. У контрольній групі реакція вибору здійснювалась переважно із залученням Anterior Cingulate Cortex, у той час як у групі з ЧМТ – парієтальної кори, а в групі з ПТСР – Middle Frontal Gyrus.

Список використаних джерел:

1. Chen F. Biased sequential sampling underlies the effects of time pressure and delay in social decision making / F. Chen, I. Krajbich // Nature Communications. – 2018. – Vol. 9, № 2.
2. Леонтьева А. Н. Переработка информации человеком в ситуации выбора / А. Н. Леонтьева, Е. П. Кричак // Инженерная психология (МГУ) / А. Н. Леонтьева, В. П. Зинченко, Д. Ю. Панова. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1964. – С. 295–325.
3. Faul M. Epidemiology of traumatic brain injury / M. Faul, V. Coronado // Handbook of Clinical Neurology. – 2015. – Vol. 127. – P. 3–13.
4. Особливості міжрегіональної взаємодії у головному мозку бійців з черепно-мозковими травмами при здійсненні простої сенсомоторної реакції / О. Книр, Н. Філімонова, М. Макачук та ін. // Вісн. Київ. нац. ун-ту імені Тараса Шевченка: Біологія. – 2018. – № 75. – С. 50–54.
5. Anterior cingulate cortex, conflict monitoring, and levels of processing / V. Van Veen, J. D. Cohen, M. M. Botvinick et al. // Neuroimage. – 2001. – Vol. 14, № 6. – P. 1302–1308.

6. Botvinick M. M. Conflict monitoring and anterior cingulate cortex: an update / M. M. Botvinick, J. D. Cohen, C. S. Carter // Trends in cognitive sciences. – 2004. – Vol. 8, № 12. – P. 539–546.
7. Maertens M. fMRI reveals a common neural substrate of illusory and real contours in V1 after perceptual learning / M. Maertens, S. Pollman // J. of cognitive neuroscience. – 2005. – Vol. 17, № 10. – P. 1553–1564.
8. Le T. H. 4 T-fMRI study of nonspatial shifting of selective attention: cerebellar and parietal contributions / T. H. Le, J. V. Pardo, X. Hu // J. of Neurophysiology. – 1998. – Vol. 79, № 3. – P. 1535–1548.
9. Kübler A, Dixon V, Garavan H. Automaticity and reestablishment of executive control—An fMRI study. Journal of cognitive neuroscience. 2006 Aug 1;18(8):1331–42.
10. Ebrahimi F. Changes in effective connectivity between motor and sensory regions in finger movement task / F. Ebrahimi, G. A. Hossein-Zadeh // 23rd Iranian Conference on Biomedical Engineering and 2016 1st International Iranian Conference on Biomedical Engineering (ICBME). – New Jersey: Institute of Electrical and Electronics Engineers, 2017.
11. The neural basis of implicit moral attitude—An IAT study using event-related fMRI / Q. Luo, M. Nakic, T. Wheatley et al. // Neuroimage. – 2006. – Vol. 30, № 4. – P. 1449–1457.
12. Decision-making in a Risk-taking Task: A PET Study / M. Ernst, K. Bolla, M. Mouratidis et al. // Neuropsychopharmacology. – 2002. – Vol. 26. – P. 682–691.
13. Choice selection and reward anticipation: an fMRI study / M. Ernst, E. E. Nelson, E. B. McClure et al. // Neuropsychologia. – 2004. – Vol. 42, № 12. – P. 1585–1597.
14. De Carli D. Identification of activated regions during a language task / D. De Carli, G. Garreffa, C. Colonnese // Magnetic Resonance Imaging. – 2007. – Vol. 25, № 6. – P. 933–938.
15. Kellenbach M. A PET study of visual and semantic knowledge about objects / M. Kellenbach, M. Hovius, K. Patterson // Cortex. – 2005. – Vol. 41, № 2. – P. 121–132.
16. Crottaz-Herbette S. Hippocampal involvement in detection of deviant auditory and visual stimuli / S. Crottaz-Herbette, G. H. Glover, V. Menon // Hippocampus. – 2005. – Vol. 15, № 1. – P. 132–139.
17. Luu P. Anterior cingulate cortex regulation of sympathetic activity / P. Luu, M. I. Posner // Brain. – 2003. – Vol. 126, № 10. – P. 2119–2120.
18. Chen Z. Brain-heart interaction cardiac complications after stroke / Z. Chen, P. Venkat, D. Seyfried // Circulation Research. – 2017. – Vol. 121, № 4. – P. 451–468.
19. Rogers R. D. Choosing between small, likely rewards and large, unlikely rewards activates inferior and orbital prefrontal cortex / R. D. Rogers, A. M. Owen, H. C. Middleton // J. of Neuroscience. – 1999. – Vol. 19, № 20. – P. 9029–9038.

References

1. Chen F, Krajchich I. Biased sequential sampling underlies the effects of time pressure and delay in social decision making. Nat Commun. 2018;9(1):3557. doi: 10.1038/s41467-018-05994-9
2. Leontjeva AN, Krynychuk EP. Pererabotka informacii chelovecom v situacii vybora. In: Leontjeva AN, Zynchenko VP, Panova DU, editors. Inzhenernaja psihologija (MGU). Moscow: Izd-vo mosc. un-ta. 1964. p. 295–325. Russian.
3. Faul M, Coronado V. Epidemiology of traumatic brain injury. Handb Clin Neurol. 2015;127(1):3–13. doi: 10.1016/B978-0-444-52892-6.00001-5.
4. Knyr O, Filimonova N, Makarchuk M, Cheburkova A, Zyma I, Kalnysh V. Osoblyvosti mizhregionalnoi vzayemodii u golovnomu mozku biyciv z cherepno-mozkovymy travmamy pry zdzijsnenni prostoi sensomotornoi reakcii. Vysnik Kyivskogo nacionalnoho universytetu imeni Tarasa Shevchenka: Biologia. 2018;75:50–54. Ukrainian.

В. Вознюк, студ.,
Н. Филимонова, канд. физ.-мат. наук,
Н. Макачук, д-р биол. наук,
И. Зима, д-р биол. наук,
О. Горбунов, канд. биол. наук
 Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина,
В. Кальниш, д-р биол. наук
 ГУ Институт медицины труда имени Ю. И. Кундиева НАМН Украины, Киев, Украина

РЕГУЛЯЦИЯ СЕРДЕЧНОГО РИТМА И АКТИВНОСТЬ ГОЛОВНОГО МОЗГА БОЙЦОВ С ЧЕРЕПНО-МОЗГОВЫМИ ТРАВМАМИ И ПОСТТРАВМАТИЧЕСКИМ СТРЕССОВЫМ РАСТРОЙСТВОМ ПРИ ОСУЩЕСТВЛЕНИИ РЕАКЦИИ ВЫБОРА

В исследовании принял участие 61 человек-доброволец: 23 из них – студенты Киевского национального университета имени Тараса Шевченко (контрольная группа), 14 – бойцы с черепно-мозговой травмой – пациенты Института медицины труда им. Ю. И. Кундиева НАМН Украины и 24 добровольца, среди которых 14 – бойцы с черепно-мозговой травмой и 10 – с посттравматическим стрессовым расстройством – пациенты Центра медицинской реабилитации и санаторного лечения МО Украины "Пуща-Водица". Результаты ЭЭГ – и ЭКГ-исследований во время тестирования реакции выбора обнаружили у бойцов с черепно-мозговой травмой по сравнению с контрольной группой значимое снижение скорости реакции выбора, тогда как у бойцов с посттравматическим стрессовым расстройством скорость реакции выбора не отличалась от контрольной группы. В обследовании бойцов с черепно-мозговой травмой реакция выбора по сравнению с простой сенсомоторной реакцией осуществлялась на фоне снижения активности симпатического отдела вегетативной нервной системы. При реализации реакции выбора обследуемыми контрольной группы наибольший уровень активности оказывался в передней поясной извилине, тогда как у обследуемых с черепно-мозговой травмой – в париетальной коре, а у обследуемых с посттравматическим стрессовым расстройством – в средней лобной извилине.

Ключевые слова: реакция выбора, бойцы с черепно-мозговой травмой, посттравматическое стрессовое расстройство, LORETA, передняя поясная извилина, активность симпатического отдела вегетативной нервной системы.

5. Van Veen V, Cohen JD, Botvinick MM, Stenger VA, Carter CS. Anterior cingulate cortex, conflict monitoring, and levels of processing. Neuroimage. 2001 Dec 31;14(6):1302–8. doi: 10.1006/nimg.2001.0923
6. Botvinick MM, Cohen JD, Carter CS. Conflict monitoring and anterior cingulate cortex: an update. Trends Cogn Sci. 2004 Dec 31;8(12):539–46. doi: 10.1016/j.tics.2004.10.003
7. Maertens M, Pollmann S. fMRI reveals a common neural substrate of illusory and real contours in V1 after perceptual learning. J Cogn Neurosci. 2005 Oct;17(10):1553–64. doi: 10.1162/08992905774597209
8. Le TH, Pardo JV, Hu X. 4 T-fMRI study of nonspatial shifting of selective attention: cerebellar and parietal contributions. J Neurophysiol. 1998 Mar 1;79(3):1535–48. doi: 10.1152/jn.1998.79.3.1535
9. Kübler A, Dixon V, Garavan H. Automaticity and reestablishment of executive control – an fMRI study. J Cogn Neurosci. 2006;18:1331–42.
10. Ebrahimi F, Hossein-Zadeh GA. Changes in effective connectivity between motor and sensory regions in finger movement task. 23rd Iranian Conference on Biomedical Engineering and 2016 1st International Iranian Conference on Biomedical Engineering (ICBME); 2016 Nov 24–25; Tehran, Iran. New Jersey: IEEE; 2017. doi:10.1109/icbme.2016.7890965
11. Luo Q, Nakic M, Wheatley T, Richell R, Martin A, Blair RJR. The neural basis of implicit moral attitude – an IAT study using event-related fMRI. Neuroimage. 2006 May 1;30(4):1449–57. doi: 10.1016/j.neuroimage.2005.11.005
12. Ernst M, Bolla K, Mouratidis M, Contoreggi C, Matochik JA, Kurian V, et al. Decision-making in a risk-taking task: a PET study. Neuropsychopharmacol. 2002;26(5):682–91. doi: 10.1016/S0893-133X(01)00414-6
13. Ernst M, Nelson EE, McClure EB, Monk CS, Munson S, Eshel N, et al. Choice selection and reward anticipation: an fMRI study. Neuropsychologia. 2004 Jan 1;42(12):1585–97. doi: 10.1016/j.neuropsychologia.2004.05.011
14. De Carli D, Garreffa G, Colonnese C, Giulietti G, Labruna L, Briselli E, et al. Identification of activated regions during a language task. Magn Reson Imaging. 2007;25(6):933–38. doi: 10.1016/j.mri.2007.03.031
15. Kellenbach M, Hovius M, Patterson K. A PET study of visual and semantic knowledge about objects. Cortex. 2005; 41(2):121–32. doi:10.1016/s0010-9452(08)70887-6
16. Crottaz-Herbette S, Lau KM, Glover GH, Menon V. Hippocampal involvement in detection of deviant auditory and visual stimuli. Hippocampus. 2005;15(1):132–9. doi: 10.1002/hipo.20039
17. Luu P, Posner MI. Anterior cingulate cortex regulation of sympathetic activity. Brain. 2003 Oct;126(10):2119–20. doi: 10.1093/brain/awg257
18. Chen Z, Venkat P, Seyfried D, Chopp M, Yan T, Chen J. Brain-heart interaction cardiac complications after stroke. Circ Res. 2017 Aug 4;121(4):451–68. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311170
19. Rogers RD, Owen AM, Middleton HC, Williams EJ, Pickard JD, Sahakian BJ, Robbins TW. Choosing between small, likely rewards and large, unlikely rewards activates inferior and orbital prefrontal cortex. J Neurosci. 1999 Oct 15;19(20):9029–38.

Надійшла до редколегії 24.09.2018
Отримано виправлений варіант 25.10.2018
Підписано до друку 25.10.2018

Received in the editorial 24.09.2018
Received a revised version on 25.10.2018
Signed in the press on 25.10.2018

V. Vozniuk, student,
N. Filimonova, PhD,
M. Makarchuk, Dr. Sci,
I. Zyma, Dr. Sci,
O. Horbunov, PhD
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
V. Kalnyh, Dr. Sci
Yu. I. Kundiyeva Institute for occupation health NAMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

FEATURES OF HEART RATE REGULATION AND ACTIVITY OF THE BRAIN DURING TESTING THE REACTION OF CHOICE IN THE MILITARY MAN WITH TRAUMATIC BRAIN INJURY

This study involved 23 male volunteers, right-handers, ages 18-21, without complaints of health – students of Taras Shevchenko National University of Kyiv (control group), 14 male volunteers, right-handers, aged 27-43, military men who took part in the operations in the east of Ukraine with traumatic brain injuries (TBI), later – military men with TBI – the patients of the Yu.I.Kundiyeva Institute for occupation health NAMS of Ukraine, Kyiv and 24 volunteers, right-handed, age 20-51: 14 military men with TBI and 10 with military men with post-traumatic stress disorder (PTSD) – patients of the Center for Medical Rehabilitation and Health Centre of the Ministry of Defence of Ukraine "Pushcha Voditsa". EEG- and ECG-study and analysis of brain dipoles using the LORETA and Heart Rate Variability Technique during the reaction of choice test revealed a significant decrease in the response speed of choice for military men with TBI as compared to the control group, while in the for military men with PTSD the response speed of choice was not differed from the control group. In comparison with the simple sensorimotor reaction test, only for for military men with TBI, when testing the reaction of choice, a decrease in the activity of the sympathetic department of the ANS was revealed. In the control group, the reaction of choice was essentially involving Anterior Cingulate Cortex, while in the group with TBI – the Parietal Cortex, and in the group with PTSD – Middle Frontal Gyrus.

Key words: reaction of choice, military men with TBI, military men with PTSD, LORETA, ACC, sympathetic activity of ANS.

УДК: 616.127-005.4:543.632.52:577.171.6

А. Шевцова, д-р біол. наук, проф.,
В. Ткаченко, викладач
ДЗ "Дніпропетровська медична академія МОЗ України", Дніпро, Україна,
Ю. Кот, канд. біол. наук, доц.
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Харків, Україна

НЕФЕРМЕНТАТИВНА МОДИФІКАЦІЯ БІЛКІВ ТА РІВЕНЬ ГАЛЕКТИНУ-3 У ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЮ ІШЕМІЄЮ МІОКАРДА

Наведено результати визначення продуктів окисної модифікації, неферментативної глікації білків і вмісту галектину-3 при експериментальній ішемії міокарда у щурів, що індукована шляхом комбінованого введення пітуїтрину та ізадрину (ПІІМ). Розвиток гострої ішемії міокарда у щурів, що за клінічними виявами має схожість із гострим інфарктом міокарда в людини, відбувається за рахунок звуження судин і підвищення артеріального тиску під дією пітуїтрину з підсиленням ефекту ізадрином – агоністом β-адренорецепторів. У процесі досліджень було показано, що при ПІІМ у плазмі крові експериментальних тварин вірогідно збільшується вміст ранніх (альдегідфенілгідрозонів, АФГ) і пізніх (кетонфенілгідрозонів, КФГ) продуктів окисної модифікації білків (ОМБ), а також флюоресціюючих кінцевих продуктів глікації (КПГ), причому ці зміни спостерігаються на тлі нормальної концентрації глюкози в крові. Одночасно встановлено наявність у плазмі крові експериментальних тварин моно-, ді-, три- та тетрамерних форм галектину-3, який є скавенджер-рецептором КПГ. Під дією антиоксидантів кверцетину та 2-оксоглутарату, інгібітору КПГ аміногуанідину, тетрациклінового антибіотика доксицикліну і селективного антагоніста рецепторів альдостерону еплеренону рівень АФГ, КФГ і КПГ достовірно знижувався, хоча концентрація глюкози до підвищення. Ці зміни супроводжувалися перерозподілом моно- й олігомерних форм галектину-3. На підставі отриманих результатів висунуто гіпотезу, що гальмування карбонільно-окисного стресу і швидкість видалення ОМБ та КПГ значною мірою визначають кардіопротекторний ефект зазначених вище препаратів.

Ключові слова: окисна модифікація білків, кінцеві продукти глікації, галектин-3, ішемія міокарда, кардіопротекторні препарати.

Вступ. Неферментативні посттрансляційні модифікації білків (НФМБ) утворюються внаслідок спонтанних хімічних реакцій бічних радикалів амінокислот за різними механізмами, такими як окиснення або глікація, тобто за умов карбонільно-окисного стресу. Окиснення білків – процес їх ковалентної модифікації, викликаний безпосереднім впливом активних форм кисню (АФК), а також взаємодією зі вторинними побічними продуктами окисного стресу. Як індуктори утворення окисно-модифікованих білків (ОМБ) можуть виступати не тільки АФК, але й активні форми азоту, метали змінної валентності, продукти перекисного окиснення ліпідів. На сьогодні найбільш вивченим варіантом ОМБ є формування карбонільних похідних унаслідок окиснення амінокислотних залишків поліпептидного ланцюга [1, 10]. При цьому окиснення залишків лізину, аргініну, гістидину, проліну спричинює формування альдо- або кетопохідних, а за окиснення залишків глутамінової та аспарагінової кислот відбувається розщеплення пептидного зв'язку з утворенням пірувільної групи на N-кінці поліпептидного ланцюга [20]. Глікація білків зумовлена реакцією між редукуючими цукрами й

аміногрупами білків з утворенням продуктів Амадорі, які потім можуть перетворюватись на кінцеві продукти глікації (КПГ). Ці продукти можуть також утворюватись при взаємодії бічних радикалів амінокислот з активними карбонільними сполуками, такими як гліоксаль, метилгліоксаль, 3-дезоксиглюкозон, або продуктами перекисного окиснення ліпідів, такими як малоновий діальдегід, 4-гідрокси-2-ноненаль і акролеїн [13].

Підвищення ОМБ та КПГ спостерігається при діабеті [25], хронічних захворюваннях печінки [11] та нирок [6]. Останнім часом з'явилися роботи стосовно змін цих показників при серцево-судинних захворюваннях, які пов'язані з цукровим діабетом [7], але досліджень, присвячених визначенню й оцінюванню ролі зазначених показників при ішемічній хворобі серця недіабетогенного походження, практично немає. Проте визначення рівня ОМБ та КПГ дає інформацію не тільки про механізми розвитку патологічного стану, але й може бути корисним при визначенні ефективності терапевтичних заходів. Аналіз літературних джерел свідчить, що кардіопротекторні ефекти антиоксидантів і гіпоглікемічних препаратів мають окремі обмеження. Дослідження

впливу корвітину, що є водорозчинним аналогом біофлавоноїду кверцетину, показало, що його відновлююча дія після ішемії обумовлена регулюванням активності антиоксидантної системи і зниженням карбонілювання протеїнів [18], але цей препарат відновлює активність антиоксидантних ензимів не в повному обсязі [24]. Класичний гіпоглікемізуючий препарат аміногуанідин знижує кількість кінцевих продуктів глікації при тривалому застосуванні, але має побічну токсичну дію [15]. Попередні дослідження стосовно кардіопротекторної дії антибіотика тетрациклінового ряду доксицикліну показали, що цей препарат знижує постінфарктне ремоделювання лівого шлуночка [8] і виявляє захисний ефект при моделюванні серцевої недостатності [21, 26], проте його точний молекулярний механізм досі не відомий. Найчастіше обговорюється здатність цього антибіотика інгібувати матриксні металопротеїнази, що відповідають за процеси ремоделювання серцевого м'язу. Крім цього, спостерігається різноспрямованість його дії залежно від дози і тривалості застосування [5]. Поряд з уже відомими антиоксидантними препаратами викликає інтерес пошук інших, перспективніших засобів. Наприклад, для попередження фокальної ішемії мозку за умов оклюзії сонної артерії використовують метаболіт циклу Кребса 2-оксоглутарат (2-ОГ) [15]. З'ясовано, що цей препарат виявляє поліпотентні ефекти, проте його вплив на процеси окисної модифікації білків не визначений [16]. У кардіології широко використовуються антагоністи альдостерону, серед яких особливу увагу привертає калій-зберігаючий діуретик еплеренон, що застосовується як доповнення до стандартної терапії для зменшення ризику кардіоваскулярної захворюваності та летальності у стабільних пацієнтів з дисфункцією лівого шлуночка і клінічними виявами серцевої недостатності після перенесеного інфаркту міокарда (ІМ), але його вплив на ступінь посттрансляційних змін білків не досліджувався.

Окисна модифікація та глікація протеїнів призводять не тільки до порушення структури та функцій протеїнів, але й до їх взаємодії з рецепторами, наслідком чого може бути активація або інгібування окремих сигнальних механізмів, процесів деградації та елімінації білків. Відомо, що КПГ-модифіковані протеїни є лігандами для цілої групи рецепторів, серед яких на особливу увагу заслуговує галектин-3, або AGE-R3. Цей галактозоспецифічний лектин тваринного походження широко використовується в кардіології як маркер хронічної серцевої недостатності, фіброзу міокарда і прогнозу несприятливого перебігу ІМ із високим ризиком несприятливих кардіоваскулярних подій і смерті [22, 23]. Однак відомостей стосовно взаємозв'язку AGE-R3 із рівнем КПГ при серцево-судинній патології не знайдено, хоча такі дані можуть мати велике значення в діагностиці та моніторингу ефективності терапевтичних заходів у хворих після гострого ІМ. Отже, **метою дослідження** було визначити зв'язок між процесами неферментативної модифікації білків і рівнем галектину-3 при експериментальній ішемії міокарда й оцінити вплив кардіопротекторних препаратів на ці показники.

Матеріали та методи дослідження. Ішемію міокарда у щурів лінії Вістар моделювали шляхом комбінованого введення ізадрину та пітуїтрину за схемою, що описана нами в попередніх дослідженнях [3]. Щурів

було розділено на 7 груп по 10 тварин у кожній групі. Перша група щурів (контрольна) отримувала ін'єкції фізіологічного розчину впродовж двох діб; друга група – щури з пітуїтринізадриніндукованою ішемією міокарда (ПІІМ); тварини третьої групи (ПІІМ+ОГ) отримували після індукції ПІІМ 1 %-й розчин 2-оксоглутарату із сахарозою, люб'язно наданий доктором Pierzynowski S. (Department of Biology, Lund University, Sweden), кожна тварина споживала в середньому 5–6 мл розчину на добу з питною водою *ad libitum* протягом 6 днів; у четвертій групі після ПІІМ застосовували аміногуанідин (ПІІМ+АГ) *per os* протягом 6 днів дозою 200 мг/кг (Sigma-AldrichInc, StLouis, MO, USA); п'ята група отримувала корвітин (Борщагівський ХФЗ) протягом 5 днів після ПІІМ за схемою виробника (ПІІМ+К); шоста (ПІІМ+Е) – щури отримували еплеренон (дозою 5 мг/кг); шурам сьомої групи (ПІІМ+Д) після моделювання ПІІМ вводили перорально доксициклін упродовж 6 днів дозою 4,2 мг/кг (РУП "Белмедпрепарати", Республіка Білорусь). Усі експерименти виконувались відповідно до етичних норм, установлених Законом України № 3447-IV від 21.02.06 р. "Про захист тварин від жорстокого поводження", і вимог Міжнародної конвенції за правилами гуманного поводження з лабораторними тваринами. Щурів утримували у стандартних умовах віварію, з вільним доступом до їжі та води, контролюючи фізіологічний стан. Виведення тварин з експерименту проводили, використовуючи як знеболюючий препарат тіопентал натрію (40 мкг/кг). Усі препарати використовувались у дозах, адаптованих до фізіологічних особливостей щурів.

Показники посттрансляційної неферментативної модифікації білків (НФМБ) і ступеня карбонільно-окисного стресу визначались за рівнем кінцевих продуктів глікації (КПГ), які оцінювали методом флуоресцентної спектроскопії [4], за визначенням ТБК-активних речовин (ТБКАР) [2], альдегід- і кетонфенілгідразонів (АФГ і КФГ) відповідно до методики Дубініної [1]. Галектин-3 визначали методом імуноблотингу з використанням специфічних поліклональних антитіл до цього лектину і вторинних антитіл, мічених ФІТЦ. Мембрани візуалізували з використанням Red™ Imaging System (Alpha Innotech).

Статистичний аналіз проводили за допомогою програмного продукту Statistica 6.0, денситометрію блотограм – за допомогою програми Sorbfil TLC. Для малих груп при порівнянні результатів використовували U-критерій Манна – Уїтні, рівень відмінностей розглядався як статистично значущий за ймовірності помилки $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Результати визначення НФМБ у плазмі крові експериментальних тварин представлені в табл. 1, з якої видно, що при ПІІМ вірогідно підвищуються всі досліджувані показники. Під дією антиоксидантів (АГ, 2-ОГ, К), антагоніста альдостерону еплеренону і тетрациклінового антибіотика доксицикліну вміст АФГ, КФГ і КПГ повертався практично до норми, а в деяких випадках їх рівень був навіть нижче норми. Слід зазначити, що рівень глюкози в усіх групах тварин був у межах норми, лише при застосуванні 2-ОГ спостерігалось підвищення цього показника, що зумовлено наявністю сахарози у складі цього препарату.

Таблиця 1. Вміст продуктів неферментативної модифікації в плазмі крові експериментальних тварин (M±m, n=10)

Групи тварин	Альдегідфеніл-гідразони, мкмоль/мл	Кетонфеніл-гідразони, мкмоль/мл	Кінцеві продукти глікації (мг/мл)	ТБК-активні речовини, нмоль/мл	Рівень глюкози (ммоль/мл)
1 Контроль	1,57±0,08	1,46±0,11	0,07±0,003	0,74±0,09	4,71±0,57
2 ПІІМ	2,19±0,11***	1,71±0,07***	0,09±0,004***	2,09±0,11***	6,03±0,63
3 ПІІМ+ОГ	1,75±0,04	1,50±0,05	0,07±0,01§§§	0,77±0,08§§§	7,63±0,62**
4 ПІІМ+АГ	1,72±0,24	1,33±0,21§§	0,07±0,01§§§	0,64±0,09§§§	5,02±0,28§
5 ПІІМ+К	1,88±0,06*§§	1,54±0,08***	0,08±0,002**§	1,06±0,09**§§§	4,91±0,29§
6 ПІІМ+Е	1,69±0,15§	1,47±0,05§	0,06±0,04§§§	1,26±0,12**§	4,72±0,41§§
7 ПІІМ+Д	1,45±0,13§§§	1,41±0,05§	0,07±0,01§§§	1,06±0,14**§§§	6,98±0,36*

Тут і далі: ПІІМ – пітуїтринізадриніндукована ішемія міокарда, ОГ – оксоголутарат, АГ – аміногуанідин, К – корвітин, Е – еплеренон, Д – доксициклін.

* p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001 – відносно групи контролю; § p ≤ 0,05, §§ p ≤ 0,01, §§§ p ≤ 0,001 – відносно групи з ПІІМ

Представлені дані свідчать про те, що одним із механізмів кардіопротекторної дії досліджуваних препаратів є зниження кількості циркулюючих продуктів карбонільної модифікації та неферментативної глікації у тварин із ПІІМ. Цей результат може бути наслідком знешкодження АФК та АКС за участю ферментів антиоксидантної системи та гліоксалаз або посиленої елімінації КПП після їх взаємодії з рецепторами. У попередніх дослідженнях ми показали, що під дією досліджуваних препаратів підвищується активність пероксидрозщеплюючих ферментів – глутатіонпероксидази та каталази. Особливо значні зміни спостерігались при застосуванні водорозчинної форми кверцетину, аміногуанідину та доксицикліну, що викликало зниження індексу окисного стресу [24]. Ці результати узгоджуються з даними інших дослідників, згідно з якими застосування кверцетину підвищує рівень антиоксидантних ензимів [12, 14], у той час як аміногуанідин знижує рівень АФК [17]. Що стосується активності гліоксалаз, то літературні дані досить суперечливі. Наприклад, за даними Wortmann та ін. зміни експресії гліоксалази 1 не впливають на розвиток атеросклеротичної бляшки [27], у той час як інші дослідники стверджують, що рівень експресії цього ензиму зменшується при формуванні нестабільної атеросклеротичної бляшки [19].

Ураховуючи, що в якості скавенджер-рецепторів може виступати галектин-3 або AGE-R3, ми провели дослідження вмісту цього лектину за допомогою імуноблотинга й установили, що в плазмі крові циркулюють моно-, ди-, три- і тетрамерні форми AGE-R3 з молекулярними масами 35, 70, 95 і 120 кДа, відповідно. Денситометричний аналіз блотограм показав, що при ПІІМ змінюється співвідношення цих форм: кількість мономерних форм зменшується, а тетрамерних, навпаки, збільшується (рис. 1). Оскільки олігомеризація AGE-R3 відбувається після його взаємодії з лігандами [9], то є всі підстави припускати, що збільшення концентрації КПП при експериментальній ішемії міокарда викликає збільшення експресії рецепторів типу AGE-R3, активацію процесів елімінації КПП, олігомеризацію рецепторів та їх надходження в циркуляторне русло.

Таке припущення узгоджується з результатами наших досліджень щодо впливу різних кардіопротектор-

них препаратів на розподіл моно- й олігомерних форм AGE-R3. Як видно з рис. 1, під дією корвітину достовірно збільшується кількість тетрамерних форм, у той час як під дією еплеренону різко збільшується вміст мономерів AGE-R3. Очевидно, корвітин, відомий як потужний антиоксидант, не тільки нейтралізує активні форми кисню, але й сприяє елімінації КПП після їх взаємодії з рецепторами, у той час як еплеренон не викликає олігомеризації AGE-R3, а скоріше підсилює їх експресію. Така гіпотеза вимагає подальшого підтвердження, однак наведені в роботі результати пілотних досліджень дозволяють по-новому розглядати роль AGE-R3 у патогенезі серцево-судинних захворювань і оцінювати рівень цього лектиноподібного рецептора при серцево-судинних захворюваннях.

Висновки

1. За умов ПІІМ розвивається карбонільно-окисний стрес, що зумовлює підвищення продуктів ОМБ та КПП на тлі нормального рівня глюкози в плазмі крові.

2. Установлено наявність моно- та олігомерних форм галектину-3, що є скавенджер-рецептором КПП та ОМБ. У щурів із ПІІМ вірогідно збільшується рівень ді- та тетрамерних форм, що свідчить про активацію процесів знешкодження КПП.

3. Зниження вмісту ОМБ та КПП і перерозподіл моно- та олігомерних форм галектину-3 під впливом різних за механізмом дії кардіопротекторних препаратів свідчать, що їх терапевтична дія значною мірою зумовлена гальмуванням карбонільно-окисного стресу та швидкістю видалення продуктів неферментативної модифікації протеїнів.

Автори висловлюють щире подяку зав. кафедри біохімії Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, д-ру біол. наук Е. Є. Перському за надану можливість користуватись сучасним обладнанням і консультативну допомогу.

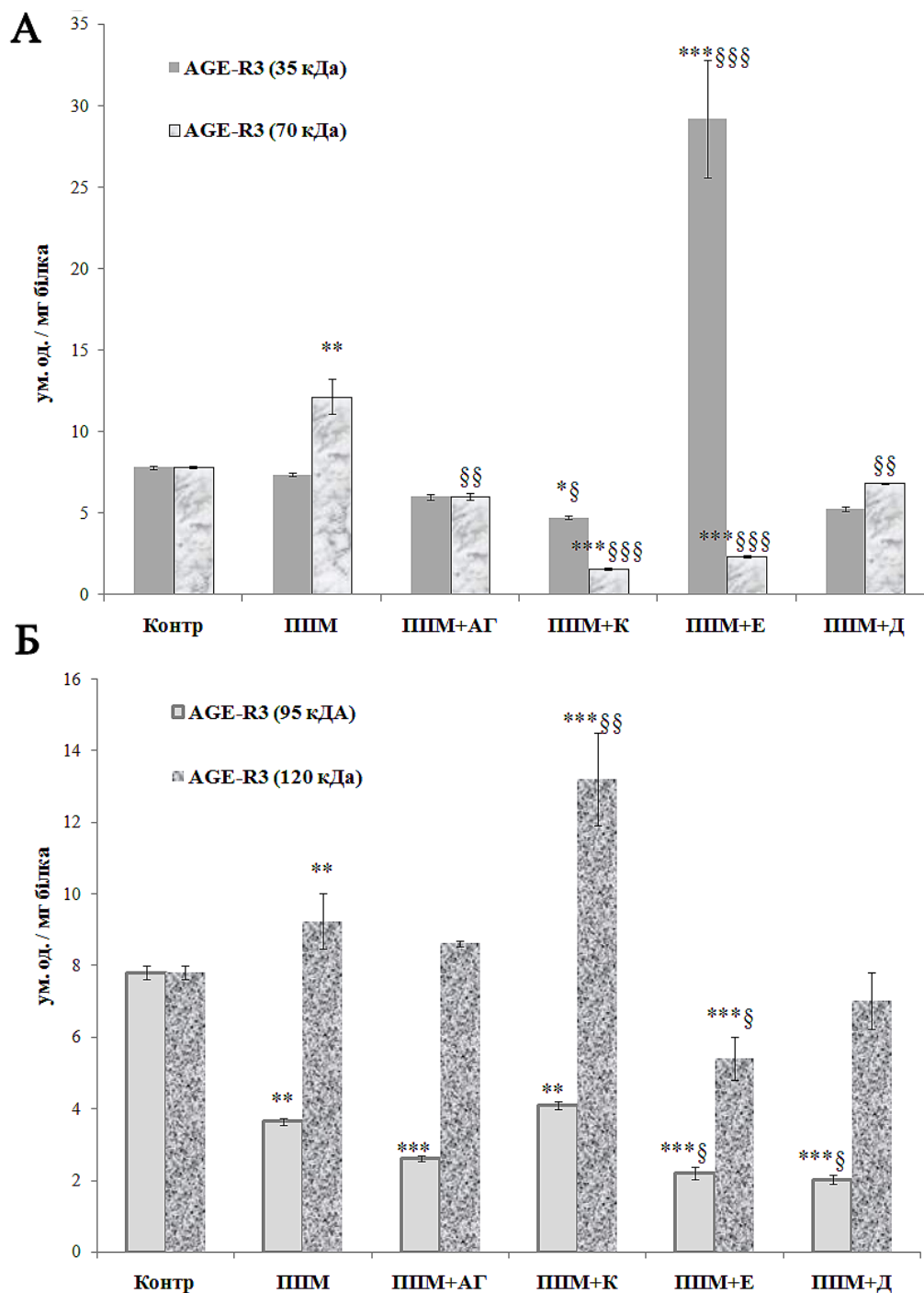


Рис. 1. Вміст різних форм AGE-R3 у плазмі крові експериментальних тварин (А; Б) ($M \pm m$, $n=10$).

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ – відносно групи контролю; § $p \leq 0,05$, §§ $p \leq 0,01$, §§§ $p \leq 0,001$ – відносно групи з PИМ

Список використаної літератури:

- Дубинина Е. Е. Окислительная модификация протеинов, ее роль при патологических состояниях / Е. Е. Дубинина, А. В. Пустыгина // Укр. біохім. журн. – 2008. – Т. 80, № 6. – С. 5–18.
- Біохімічні та біофізичні методи оцінки порушень окислювального гемостазу в осіб, що зазнали радіаційного впливу внаслідок аварії на ЧАЕС / Л. М. Овсяннікова, С. М. Альохіна, О. В. Дробінська та ін. // Методичні рекомендації. – К.: Вид-во "Чорнобильінтерінформ", 1999.
- Ткаченко В. Вплив еплеренону на фізіологічні параметри та ступінь карбонільно-окислювального стресу у щурів з експериментальним ушкодженням міокарда / В. А. Ткаченко // Укр. біофармацевтичний журн. – 2018. – № 2. – С. 4–12.
- Спосіб визначення флюоресціюючих кінцевих продуктів глікації у плазмі крові. Пат. 116929 UA, МПК G 01 N 1/00, 21/39, 21/64, 33/49 / А. І. Шевцова, В. А. Ткаченко, О. А. Коваль та ін.; – заявл. 21.12.2016; опубл. 12.06.2017, Бюл. № 11.

- Combined subthreshold dose inhibition of myosin light chain phosphorylation and MMP-2 activity provides cardioprotection from ischaemic/reperfusion injury in isolated rat heart / V. Cadete, J. Sawicka, L. Bekar, G. Sawicki // Br. J. Pharmacol. – 2013. – Vol. 170, № 2. – P. 380–90. doi: 10.1111/bph.12289.
- Protein oxidation in chronic kidney disease / G. Caimi, C. Carollo, E. Hopps et al. // Clinical Hemorheology and Microcirculation. – 2013. – Vol. 54, № 4. – P. 409–13. doi:10.3233/CH-131739.
- Diabetes mellitus: a cardiovascular disease / R. Candido, P. Srivastava, M. E. Cooper, L. M. Burrell // Curr Opin Investig Drugs. – 2003. – Vol. 4, № 9. – P. 1088–94.
- Early short-term doxycycline therapy in patients with acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction to prevent the ominous progression to adverse remodelling: the TIPTOP trial / G. Cerisano, P. Buonamici, R. Valenti et al. // Eur Heart J. – 2014. – Vol. 35(3). – P. 184–91. doi: 10.1093/eurheartj/ehd420.

9. Galectins as Molecular Targets for Therapeutic Intervention / R. P. M. Dings, M. C. Miller, R. J. Griffin, K. H. Mayo // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – Vol. 19, № 3. – P. pii: E905. doi: 10.3390/ijms19030905.
10. Hauck A. K. Oxidative stress and lipotoxicity / A. K. Hauck, D. A. Bernlohr // *J. Lipid Res.* – 2016. – Vol. 57, № 11. – P. 1976-1986. doi:10.1194/jlr.R066597.
11. Hollenbach M. Implication of advanced glycation endproducts (AGEs) related to their receptor RAGE and glyoxalase-I (Glo-I) in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma (HCC) / M. Hollenbach // *Internal Medicine Review.* – 2017. – Vol. 3, № 5. – P. 1–25.
12. Molecular and biochemical evidence on the protective effects of quercetin in isoproterenol-induced acute myocardial injury in rats / M. Kumar, E. R. Kasala, L. N. Bodduluru et al. // *J. Biochem. Mol. Toxicol.* – 2017. – Vol. 31(1). – P. 1–8. doi: 10.1002/jbt.21832.
13. Kumphune S. Oxidative Stress and Diseases: Oxidatively Modified Biomolecules: An Early Biomarker for Acute Coronary Artery Disease / S. Kumphune // *InTech.* – 2012. – Vol. 9. – H. 190-214. doi: 10.5772/32503.
14. Li C. Quercetin inhibits LPS-induced adhesion molecule expression and oxidant production in human aortic endothelial cells by p38-mediated Nrf2 activation and antioxidant enzyme induction / C. Li, W. J. Zhang, B. Frei // *Redox Biol.* – 2016. – Vol. 9. – P. 104–113. doi: 10.1016/j.redox.2016.06.006. 2016.
15. Nandagopal M. Behavioral assessment studies in cerebral ischemia induced by bilateral carotid artery occlusion in rats / M. Nandagopal, P. Muralidharan, G. Thirumurugan // *Annals of Biological Research.* – 2001. – Vol. 1, № 1. – P. 208–223.
16. Alpha-Ketoglutarate: physiological functions and applications / Nan Wu et al. // *Biomol. Ther (Seoul).* – 2016. – Vol. 24, № 1. – P. 1–8.
17. Aminoguanidine inhibits ventricular fibrosis and remodeling process in isoproterenol-induced hypertrophied rat hearts by suppressing ROS and MMPs / A. Parthasarathy, V. Gopi, K. Devi et al. // *Life Sci.* – 2014. – Vol. 118, № 1. – P. 15–26. doi.org/10.1016/j.lfs.2014.09.030.
18. Therapeutic potential of quercetin as a cardiovascular agent / R. Patel, B. Mistry, S. Shinde et al. // *Eur. J. Med. Chem.* – 2018. – Vol. 155. – P. 889–904. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.06.053.
19. Paneni F. Advanced glycation end products and plaque instability: a link beyond diabetes / F. Paneni, F. Cosentino // *Eur. Heart J.* – 2014. – Vol. 35, № 17. – P. 1095–1097. doi.org/10.1093/eurheartj/eh454.
20. Protein oxidation: Identification and utilisation of molecular markers to differentiate singlet oxygen and hydroxyl radical-mediated oxidative pathways / J. E. Plowman et al. // *Photochemical and Photobiological Sciences.* – 2013. – Vol. 12, № 11. – P. 1960–1967. doi:10.1039/c3pp50182e.
21. Smith J. Protective effects of doxycycline in mesenteric ischemia and reperfusion / J. Smith, W. Gabler // *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* – 1995. – Vol. 88, № 3. – P. 303-15. PMID:8564386.
22. Suarez G. Heart failure and galectin 3 / G. Suarez, G. Meyerrose // *Ann. Transl. Med.* – 2014. – Vol. 2, № 9. – P. 86–92. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2014.09.10.
23. The Predictive Value of Plasma Brain Natriuretic Peptide and Galectin-3 in Elderly Patients / M. Testa, G. L. Rosso, C. Ferreri, M. Feola // *Heart Failure Diseases.* – 2018. – Vol. 6, № 4. – P. pii: E88. doi: 10.3390/diseases6040088.
24. The cardio- and neuroprotective effects of Corvutin and 2-oxoglutarate in rats with pituitrin-isoproterenol-induced myocardial damage / V. Tkachenko, Y. Kovalchuk, N. Bondarenko et al. // *Biochem. Research International.* – 2018. – № 9302414. doi.org/10.1155/2018/9302414.
25. Ullah A. Diabetes mellitus and oxidative stress – A concise review / A. Ullah, A. Khan, I. Khan // *Saudi Pharmaceutical J.* – 2016. – Vol. 24. – P. 547–553. doi.org/10.1016/j.jsps.2015.03.013.
26. Chronic doxycycline exposure accelerates left ventricular hypertrophy and progression to heart failure in mice after thoracic aorta constriction / L. Vinet, P. Rouet-Benzineb, X. Marniquet et al. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2008. – Vol. 295(1). – P. H352-60. doi:10.1152/ajpheart.01101.2007.
27. Glyoxalase-1 knockdown does not have major short term effects on energy expenditure and atherosclerosis in mice / M. Wortmann, M. Hakimi, T. Fleming et al. // *J. Diabetes Res.* – 2016. – Vol. 2016. – P. 2981639. http://dx.doi.org/10.1155/2016/2981639.
5. Cadete V., Sawicka J., Bekar L., Sawicki G. Combined subthreshold dose inhibition of myosin light chain phosphorylation and MMP-2 activity provides cardioprotection from ischemic/reperfusion injury in isolated rat heart. *Br J Pharmacol.* 2013;170(2):380-90. doi: 10.1111/bph.12289.
6. Caimi G., Carollo C., Hopps E., et al. Protein oxidation in chronic kidney disease. *Clinical Hemorheology and Microcirculation.* 2013; 54(4):409-13. doi:10.3233/CH-131739
7. Candido R. Srivastava P., Cooper M.E., Burrell L.M. Diabetes mellitus: a cardiovascular disease. *Curr Opin Investig Drugs.* 2003; 4(9):1088-94.
8. Cerisano G., Buonomici P., Valenti R., Sciagrà R., et al. Early short-term doxycycline therapy in patients with acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction to prevent the ominous progression to adverse remodelling: the TIPTOP trial. *Eur Heart J.* 2014;35(3):184-91. doi: 10.1093/eurheartj/eh420.
9. Dings R.P.M., Miller M.C., Griffin R.J., Mayo K.H. Galectins as Molecular Targets for Therapeutic Intervention. *Int J Mol Sci.* 2018;19(3):pii: E905. doi: 10.3390/ijms19030905.
10. Hauck A.K., Bernlohr D.A. Oxidative stress and lipotoxicity. *J Lipid Res.* 2016;57(11):1976-1986. doi:10.1194/jlr.R066597
11. Hollenbach M. Implication of advanced glycation endproducts (AGEs) related to their receptor RAGE and glyoxalase-I (Glo-I) in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma (HCC). *Internal Medicine Review.* 2017;3(5): 1-25.
12. Kumar M., Kasala E.R., Bodduluru L.N., Kumar V., Lahkar M. Molecular and biochemical evidence on the protective effects of quercetin in isoproterenol-induced acute myocardial injury in rats. *J Biochem Mol Toxicol.* 2017;31(1):1-8. doi: 10.1002/jbt.21832.
13. Kumphune S. Oxidative Stress and Diseases: Oxidatively Modified Biomolecules: An Early Biomarker for Acute Coronary Artery Disease. *InTech.* 2012;9:190-214. doi: 10.5772/32503
14. Li C., Zhang W.J., Frei B. Quercetin inhibits LPS-induced adhesion molecule expression and oxidant production in human aortic endothelial cells by p38-mediated Nrf2 activation and antioxidant enzyme induction. *Redox Biol.* 2016;9:104-113. doi: 10.1016/j.redox.2016.06.006. 2016
15. Nandagopal M., Muralidharan P., Thirumurugan G. Behavioral assessment studies in cerebral ischemia induced by bilateral carotid artery occlusion in rats. *Annals of Biological Research.* 2001;1(1):208-223.
16. Nan Wu., Mingyao Y. et al. Alpha-Ketoglutarate: physiological functions and applications. *Biomol Ther (Seoul).* – 2016;24(1):1-8.
17. Parthasarathy A., Gopi V., Devi K., Balaji N., et al. Aminoguanidine inhibits ventricular fibrosis and remodeling process in isoproterenol-induced hypertrophied rat hearts by suppressing ROS and MMPs. *Life sci.* 2014;118(1):15-26. doi.org/10.1016/j.lfs.2014.09.030.
18. Patel R., Mistry B., Shinde S., Syed R., et al. Therapeutic potential of quercetin as a cardiovascular agent. *Eur J Med Chem.* 2018;155:889-904. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.06.053.
19. Paneni F., Cosentino F. Advanced glycation endproducts and plaque instability: a link beyond diabetes. *European Heart Journal.* 2014; 35(17):1095–1097. doi.org/10.1093/eurheartj/eh454
20. Plowman J.E., et al. Protein oxidation: Identification and utilisation of molecular markers to differentiate singlet oxygen and hydroxyl radical-mediated oxidative pathways. *Photochemical and Photobiological Sciences.* 2013;12(11):1960-1967. doi:10.1039/c3pp50182e
21. Smith J., Gabler W. Protective effects of doxycycline in mesenteric ischemia and reperfusion. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 1995;88(3):303-15. PMID:8564386.
22. Suarez G., Meyerrose G. Heart failure and galectin 3. *Ann Transl Med.* 2014;2(9): 86-92. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2014.09.10
23. Testa M., Rosso G.L., Ferreri C., Feola M. The Predictive Value of Plasma Brain Natriuretic Peptide and Galectin-3 in Elderly Patients. *Heart Failure Diseases.* 2018;6(4): pii: E88. doi: 10.3390/diseases6040088.
24. Tkachenko V., Kovalchuk Y., Bondarenko N., et al. The cardio- and neuroprotective effects of Corvutin and 2-oxoglutarate in rats with pituitrin-isoproterenol-induced myocardial damage. *Biochemistry Research International.* 2018;9302414. doi.org/10.1155/2018/9302414
25. Ullah A., Khan A., Khan I. Diabetes mellitus and oxidative stress – A concise review. *Saudi Pharmaceutical Journal.* 2016; 24: 547–553. doi.org/10.1016/j.jsps.2015.03.013.
26. Vinet L., Rouet-Benzineb P., Marniquet X., Pellegrin N., et al. Chronic doxycycline exposure accelerates left ventricular hypertrophy and progression to heart failure in mice after thoracic aorta constriction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;295(1):H352-60. doi:10.1152/ajpheart.01101.2007.
27. Wortmann M. Hakimi M., Fleming T., Peters A.S., et al. Glyoxalase-1 knockdown does not have major short term effects on energy expenditure and atherosclerosis in mice. *Diabetes Res.* 2016;2016:2981639. http://dx.doi.org/10.1155/2016/2981639

References

1. Dubinina E. Pustigina A.V. Oxidative modification of proteins, its role in pathological conditions. *Ukrainian Biochemical Journal* 2008;80(6):5-18.
2. Ovsyannikova L., Alohinia S., Drobinska O., et al. Biochemical and biophysical methods for evaluating the disturbances of oxidative hemostasis in people who have been exposed to radiation due to the Chernobyl accident. *Metodichni rekomendatsiyi. ChornobilInterInform*, 1999:18.
3. Tkachenko V. Effects of eplerenone on behavioral responses and indicators of carbonyl/oxidative stress in rats with experimental myocardial damage. *Ukrainian biopharmaceutical journal.* 2018;2: 4-12.
4. Shevtsova A.I., Tkachenko V.A., Koval' O.A. et al. The method for the determination of fluorescing glycated end-products in blood plasma. *Pat. 116929 UA, MPK G 01 N 1/00, 21/39, 21/64, 33/49 / Dnipropetrovsk'ska medychna akademija MOZ Ukraïny – zjavl. 21.12.2016; opubl. 12.06.2017, Bjul. № 11.*

Надійшла до редколегії 26.09.2018
Отримано виправлений варіант 29.10.2018
Підписано до друку 29.10.2018

Received in the editorial 26.09.2018
Received a revised version on 29.10.2018
Signed in the press on 29.10.2018

А. Шевцова, д-р биол. наук, проф.,
В. Ткаченко, преподаватель
ГУ "Днепропетровская медицинская академия МОЗ Украины", Днепро, Украина,
Ю. Кот, канд. биол. наук, доц.
Харьковский национальный университет имени Н. В. Каразина, Харьков, Украина

НЕФЕРМЕНТАТИВНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ И УРОВЕНЬ ГАЛЕКТИНА-3 У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИЕЙ МИОКАРДА

Приведены результаты определения продуктов окислительной модификации, неферментативного гликирования белков и уровня галектина-3 при экспериментальной ишемии миокарда у крыс, индуцированной последовательным введением питуитрина и изадрина (ПИИМ). Сужение сосудов и повышение артериального давления под действием питуитрина совместно с действием синтетического катехоламина изадрина, являющегося прямым агонистом β 1-2-рецепторов, вызывает состояние, подобное острому инфаркту миокарда у людей. В ходе исследований было показано, что при ПИИМ в плазме крови экспериментальных животных достоверно увеличивается содержание ранних (альдегидфенилгидразоны, АФГ) и поздних (кетонфенилгидразоны, КФГ) продуктов окислительной модификации белков, а также флуоресцирующих конечных продуктов гликирования (КПГ), причем эти изменения наблюдаются на фоне нормальной концентрации глюкозы в крови. В плазме крови экспериментальных животных установлено наличие моно-, ди-, три- и тетрамерных форм галектина-3, который является сквенджер-рецептором КПГ. Под действием антиоксидантов кверцетина и 2-оксоглутарата, ингибитора КПГ амингуанидина, тетрациклинового антибиотика доксициклина и селективного антагониста рецепторов альдостерона эплеренона уровень АФГ, КФГ и КПГ достоверно снижался, хотя концентрация глюкозы имела тенденцию к повышению. Эти изменения сопровождалось перераспределением моно- и олигомерных форм галектина-3. На основании полученных результатов сделан вывод о том, что ингибирование карбонильно-окислительного стресса и скорость удаления ОМБ и КПГ в значительной мере определяют кардиопротекторный эффект исследованных в работе препаратов.

Ключевые слова: окислительная модификация белков, конечные продукты гликирования, галектин-3, ишемия миокарда, кардиопротекторные препараты.

A. Shevtsova, Dr. Sc. Prof.,
V. Tkachenko, assis.
SI "Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine", Dnipro, Ukraine,
Yu. Kot, Ass. Prof.
V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

NON-ENZYMATIC MODIFICATION OF PROTEINS AND THE LEVEL OF GALECTIN-3 IN THE RATS WITH EXPERIMENTAL MYOCARDIAL ISCHEMIA

The results of the determination of the products of oxidative modification, non-enzymatic protein glycation and galectin-3 under experimental myocardial ischemia in rats with pituitrin-isoproterenol induced myocardial ischemia (PIIM), were presented in this work. Vasoconstriction and increase of blood pressure under the action of pituitrin, together with the isoproterenol, which is a β -adrenoreceptor agonist, caused the condition similar to acute myocardial infarction. The increase of the early (aldehyde phenylhydrazones, APH) and the late (ketone phenylhydrazones, KPH) products of oxidative modification of proteins, as well as fluorescent advanced glycation end-products (AGE) were shown in blood of the rats with PIIM. These changes were observed under normal content of glucose in the blood. At the same time, the presence of mono-, di-, tri-, and tetrameric forms of galectin-3, which is a scavenger of AGE, has been established in the blood of experimental animals. The levels of APH, KPH and AGE significantly reduced under the impact of the antioxidants quercetin and 2-oxoglutarate, after the treatment with the AGE-inhibitor aminoguanidine, tetracycline antibiotic doxycycline and eplerenone (selective antagonist of aldosterone receptors), although glucose concentration had a weak tendency to increase. These changes were accompanied by the redistribution of mono- and oligomeric forms of galectin-3. Based on our results, it was hypothesized that the removal of the products of oxidative modification of proteins and the inhibition of carbonyl-oxidative stress contribute to the cardioprotective effect of the studied drugs.

Key words: oxidative modification of proteins, glycation end-products, galectin 3, myocardial ischemia, cardioprotective drugs.

УДК: 612.359:612.273+612.018

Р. Янко, канд. биол. наук
Институт физиологии имени А. А. Богомольца НАН Украины, Киев, Украина

СОЧЕТАННОЕ ВЛИЯНИЕ ПЕРЫВИСТОЙ НОРМОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ И МЕЛАТОНИНА НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ПАРЕНХИМЫ ПЕЧЕНИ КРЫС

Исследованы морфологические изменения паренхимы печени крыс после сочетанного воздействия перывистой нормобарической гипоксии (ПНГ) и мелатонина. Исследование проведено в весенний период на 24 крысах-самцах линии Вистар. Подопытным животным ежедневно подавали гипоксическую газовую смесь (12 % кислорода в азоте) в перывистом режиме: 15 мин деоксигенация / 15 мин реоксигенация в течение 2 ч. Этим же крысам ежедневно перорально вводили экзогенный мелатонин в 10.00 в дозе 5 мг/кг. Продолжительность эксперимента составляла 28 суток. Из ткани печени изготавливали гистологические препараты по стандартной методике. Морфометрию осуществляли с помощью компьютерной программы "Image J". У крыс, подвергавшихся воздействию ПНГ и мелатонина, обнаружили достоверно большую площадь гепатоцитов, их ядер и цитоплазмы на 19, 54 и 31 %, соответственно, чем в контроле. Это привело к достоверному повышению ядерно-цитоплазматического соотношения на 35 %. У подопытных животных отмечено достоверно большее количество ядершек в ядрах гепатоцитов на 14 % и количество двуядерных гепатоцитов на 23 %. Эти данные могут свидетельствовать о возрастании функциональной активности гепатоцитов и активации физиологической регенерации клеток на внутриклеточном уровне. Также у подопытных животных выявлено снижение расстояния между ядрами смежных гепатоцитов, что указывает на более плотное расположение клеток между собой и уменьшение количества межклеточной соединительной ткани. Сочетанное воздействие перывистой нормобарической гипоксии и мелатонина имеет морфологические признаки повышения функциональной активности и физиологической регенерации паренхимы печени.

Ключевые слова: печень, перывистая гипоксия, мелатонин.

Введение. В последние годы среди населения наблюдается тенденция к росту заболеваний печени. За статистическими данными ВООЗ в мире насчитывается около 700 млн людей с разными нарушениями

физиологических функций этого органа. В этой связи возрастает актуальность разработки новых эффективных методов профилактики и лечения заболеваний печени. Полагают, что одним из таких методов может

быть использование прерывистой нормобарической гипоксии и мелатонина.

В клинической практике широко применяют метод прерывистой нормобарической гипоксии (ПНГ) саногенного уровня, что соответствует высоте 1,5–3 тыс. м над уровнем моря (17–12 % кислорода), оказывая лечебное и оздоравливающее действие на организм человека. ПНГ используют для лечения и профилактики ряда заболеваний, а также интервальной тренировки здоровых лиц с целью повышения неспецифической резистентности организма [1, 2].

В последние годы большое внимание исследователей привлекает гормон эпифиза мелатонин. Он является регулятором метаболических, иммунных и регенераторных процессов, участвует в механизмах терморегуляции и старения. Мелатонин принимает участие в пролиферации и дифференциации клеток, имеет седативные, противоопухолевые, антистрессовые свойства, улучшает работоспособность. Во многих исследованиях показано, что введение мелатонина предупреждает развитие деструктивных процессов и стимулирует репаративные функции в печени после воздействия различных токсинов [3–6].

Работы, в которых бы исследовалось влияние комбинированного воздействия ПНГ саногенного уровня и мелатонина на морфофункциональное состояние печени, отсутствуют. Большинство авторов изучали раздельное влияние гипоксических газовых смесей и мелатонина на функциональную активность паренхимы печени, а полученные ими данные весьма неоднозначны и часто противоречивы [7–9]. Это может быть связано с использованием в экспериментах животных разных видов и возраста, различиями в режимах подачи гипоксических смесей, влиянием гипоксии в условиях гипо- или нормобарии, разной дозировкой введения мелатонина, сезонностью и продолжительностью проведения опытов и т. д. Какой же будет эффект после сочетанного воздействия этих двух факторов, нам предстояло выяснить.

Цель работы – исследовать морфологические изменения в паренхиме печени крыс после сочетанного воздействия ПНГ и мелатонина.

Материалы и методы. Исследование проведено в весенний период на 24 крысах-самцах линии Вистар в возрасте 3 месяца. Крысы находились в унифицированных условиях на стандартном рационе питания. Животные были разделены на 2 группы: I – контроль, II – подопытные крысы, подвергавшиеся сочетанному воздействию ПНГ и мелатонина. Для проведения ежедневных сеансов ПНГ крыс помещали в герметичную камеру, в которую подавали гипоксическую газовую смесь (12 % кислорода в азоте) в прерывистом режиме (15 мин деоксигенация / 15 мин реоксигенация в течение 2 ч) с помощью мембранного газораспределительного элемента. Остальное время суток (22 ч) крысы дышали атмосферным воздухом. Подопытным живот-

ным также ежедневно перорально вводили экзогенный мелатонин (Unipharm Inc., США) в 10.00 в дозе 5 мг/кг. Длительность эксперимента составляла 28 суток. Крыс декапитировали дислокацией шейных позвонков в соответствии с требованиями международных принципов Европейской конвенции.

Для морфологических и морфометрических исследований методом слепой рандомизации отбирали образцы ткани печени, из которых изготавливали гистологические препараты по стандартной методике: фиксировали в жидкости Буэна, обезжировали в спиртах возрастающей концентрации, заливали в парафин. Срезы окрашивали гематоксилином Бемера и эозином, а для выявления элементов соединительной ткани – методом Ван Гизона и Массона [10]. При использовании цифровой камеры микропрепараты фотографировали на микроскопе "Nicon" (Япония). На цифровых изображениях препаратов осуществляли морфометрию с помощью компьютерной программы "Image J".

На гистологических срезах печени измеряли средний диаметр, площадь поперечного сечения гепатоцитов, их ядер и цитоплазмы; определяли ядерно-цитоплазматическое соотношение; подсчитывали количество одно- и двуждерных клеток и количество ядрышек на 100 ядер гепатоцитов; измеряли расстояние между смежными ядрами гепатоцитов. Подсчет количества гепатоцитов проводили в 10 полях зрения микроскопа, а измерения площади осуществляли для каждой клетки с подсчетом среднего значения относительно 100 клеток.

Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики с помощью программного обеспечения Statistica 6.0 for Windows и программы Microsoft Excel 2010. Достоверность различий между контрольной и подопытной группами, после предварительной проверки на нормальность распределения, оценивали по t-критерию Стьюдента. Различия считали достоверными при значении $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Крысы, подвергавшиеся сочетанному воздействию ПНГ и мелатонина, сохраняли физиологическую структуру паренхимы печени. Структурные границы долек нечетко выражены (что соответствует данному виду животных), некрозов не выявлено. Печеночные пластинки размещены радиально. Центральные вены, ветви воротной вены, синусоиды умеренного кровенаполнения. Междольковая соединительная ткань слабо выражена. Гепатоциты среднего и большого размера. Ядра округлой формы, расположены в центре клетки. Ядерная мембрана сохранена и имеет четкие очертания. В цитоплазме встречаются вакуоли или включения. Ядрышки округлой формы, среднего размера. В синусоидах встречаются макрофаги (рис. 1).

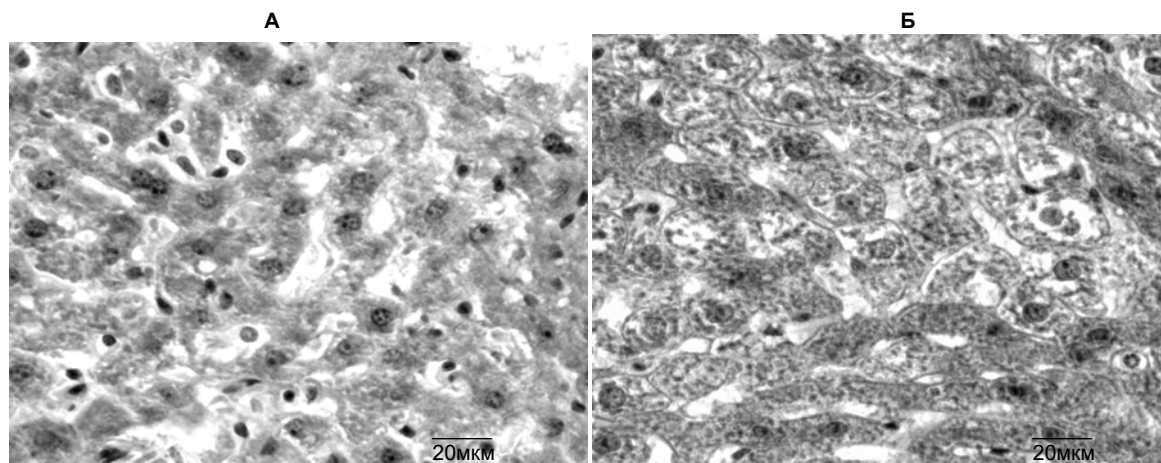


Рис. 1. Микрофотография печени крысы контрольной (А) и подопытной (Б) группы. Окраска по методу Ван Гизона. Увеличение 800

При проведении морфометрических измерений у крыс, подвергавшихся сочетанному воздействию ПНГ и мелатонина, обнаружили достоверно большую площадь поперечного сечения гепатоцитов, их ядер и цитоплазмы на 19, 54 и 13 %, соответственно, чем в контроле. Это привело к достоверному повышению ядерно-цитоплазматического соотношения на 35 % (табл. 1). Изменение этих показателей свидетельствует о возрастании функциональной активности гепатоцитов, а также может указывать на подготовку клетки к митозу и связанную с ним интенсификацию синтеза нуклеиновых кислот, белков и т. д. [11].

У крыс всех групп ядрышки хорошо визуализируются, среднего размера, имеют округлую форму и четкие границы. У подопытных животных отмечено достоверно большее количество ядрышек в ядрах гепатоцитов на 14 % (табл. 1). Увеличение количества ядрышек также является одним из признаков активации физиологической регенерации гепатоцитов на внутриклеточном уровне [12]. Поскольку к основным функциям яд-

рышек относят синтез рРНК, с которой образуются субъединицы рибосом, то полагают, что рост количества ядрышек указывает на повышение белоксинтетической активности гепатоцитов [13].

Общее количество и количество одноядерных гепатоцитов у подопытных крыс было большим по сравнению с контрольными значениями на 13 % ($p < 0,05$). При этом количество двуядерных гепатоцитов достоверно увеличилось на 23 % (см. табл. 1). Для печени всех млекопитающих характерно наличие дву- и многоядерных гепатоцитов. Биологический смысл двуядерных гепатоцитов до сих пор остается спорным. В литературе имеются сведения об увеличении числа двуядерных гепатоцитов в результате старения клетки, незаконченного митоза или амитоза. Однако большинство авторов все же считают, что увеличение количества двуядерных клеток свидетельствует об усилении интенсивности регенерации паренхимы печени на внутриклеточном уровне [14].

Таблица 1. Морфометрические показатели паренхимы печени ($n = 12$, $M \pm m$)

Показатели	Контроль	Прерывистая нормобарическая гипоксия + Мелатонин
Диаметр гепатоцита, мкм	$20,0 \pm 0,26$	$21,5 \pm 0,62$
Площадь, мкм ²		
гепатоцита	$340,7 \pm 15,2$	$405,1 \pm 17,4^*$
ядра	$49,1 \pm 1,64$	$75,8 \pm 3,14^*$
цитоплазмы	$291,6 \pm 12,9$	$329,3 \pm 10,6^*$
Ядерно-цитоплазматическое соотношение	$0,17 \pm 0,006$	$0,23 \pm 0,006^*$
Количество ядрышек в ядре, ед	$1,69 \pm 0,04$	$1,92 \pm 0,03^*$
Количество гепатоцитов, ед		
общее	$125,6 \pm 2,9$	$141,7 \pm 5,13^*$
однойдерных	$122,5 \pm 3,11$	$137,9 \pm 5,84^*$
двухдерных	$3,1 \pm 0,16$	$3,8 \pm 0,21^*$
Соотношение двухдерные/однодерные гепатоциты	$0,025 \pm 0,001$	$0,028 \pm 0,001$
Расстояние между ядрами смежных гепатоцитов	$11,4 \pm 0,38$	$9,8 \pm 0,37^*$

Примечание. * $p < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с контролем

После сочетанного влияния ПНГ и мелатонина выявили снижение расстояния между ядрами смежных гепатоцитов на 14 % (табл. 1). Это может свидетельствовать о плотном размещении клеток между собой, а также об уменьшении количества межклеточной со-

единительной ткани, что является характерным признаком регенерации паренхимы печени.

Ранее нами были проведены эксперименты по раздельному воздействию прерывистой гипоксии и экзогенного мелатонина на состояние паренхимы пе-

чени. Было показано, что воздействие ПНГ в большей степени усиливает активность печени, чем введение мелатонина [15, 16].

Положительное влияние ПНГ саногенного уровня на функциональную активность печени выявили и другие исследователи. Показано, что после влияния гипоксии (в режиме 5 мин деоксигенация / 5 мин реоксигенация в течении 2 ч продолжительностью 10 дней) с 10 %-м содержанием кислорода в азоте активизировались пластические процессы в печени крыс: возросло количество митохондрий, пероксисом, мембран эндоплазматического ретикулума, лизосомных и липофуционных образований. Выявлено также гипертрофию ядер гепатоцитов, гиперплазию агранулярного эндоплазматического ретикулума, полнокровие синусоидов [17]. При исследовании действия гипоксической газовой смеси S. M. Michael и соавт. [18] наблюдали усиление экспрессии гипоксия-индуцибельных транскрипционных факторов HIF-1 α и HIF-2 α в печени. Показано, что при краткосрочном периодическом воздействии гипоксии происходит рост системы защиты клеточных мембран гепатоцитов, свидетельствуя о повышении активности антиоксидантной системы [8].

Между разными исследователями существует дискуссия по поводу способности мелатонина стимулировать регенерацию печени. Одни авторы отмечают свойство мелатонина активировать пролиферацию гепатоцитов. Так, после введения экзогенного мелатонина выявлен рост митотического индекса [7]. Одним из возможных механизмов может быть ингибирование мелатонином IKK α , JNK1 и cJUN, которые являются Ser/Thr-киназами. Основные биологические эффекты действия этих киназ – подавление митотической активности и активация апоптоза [19]. В то же время другие исследователи отмечают угнетение мелатонином экспрессии ядерного антигена пролиферации клеток и белка Ki-67, которые усиливают скорость клеточной пролиферации [20]. Эти результаты свидетельствуют о неоднозначной роли мелатонина в процессе регенерации печени, что требует дальнейших исследований.

Выводы

1. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что 28-суточное комбинированное воздействие прерывистой нормобарической гипоксии саногенного уровня и мелатонина оказывает положительное влияние на морфофункциональное состояние печени. Сочетанное воздействие этих факторов активизирует функциональную активность гепатоцитов, а также процессы физиологической регенерации печени.

2. Эти данные могут иметь не только теоретическое значение, но и представлять определенный практический интерес при использовании гипоксических газовых смесей с сочетанным введением мелатонина в санаторно-курортных или оздоровительных учреждениях для повышения функции паренхимы печени.

Список использованной литературы:

- Березовский В. А. Природная и инструментальная оротерапия / В. А. Березовский. – Донецк: "Заславский А. Ю.", 2012.
- Powell F. L. Physiological effects of intermittent hypoxia / F. L. Powell, N. Garcia // High. It. Med. Biol. – 2002. – № 1. – P. 125–136.
- Сериков В. С. Влияние мелатонина на стрессиндуцированные изменения в печени крыс с различной устойчивостью к стрессу / В. С. Сериков, Ю. Д. Ляшев // Бюлл. эксперимент. биологии и медицины. – 2015. – № 3. – С. 290–294.
- Protective role of melatonin in liver damage / C. Chojnacki, E. Walecka-Kapica, M. Romanowski et al. // Curr. Pharm. Des. – 2014. – Vol. 20, № 30. – P. 4828–4833.

- Pevet P. Melatonin and biological rhythms / P. Pevet // Therapie. – 1998. – Vol. 30, № 1. – P. 109–124.

- Protective effects of melatonin against carbon tetrachloride hepatotoxicity in rats / L. B. Zavadnik, I. B. Zavadnik, E. A. Lapshina et al. // Cell. Biochem. Funct. – 2005. – Vol. 23. – P. 353–359.

- The effect of the pineal gland on liver regeneration in rats / O. Abbasoglu, M. Berker, A. Ayhan et al. // J. Hepatol. – 1995. – Vol. 23, № 5. – P. 578–581.

- Arhipenko Y. Periodic hypoxia and hyperoxia improves resistance of membrane structures in heart, liver and brain / Y. Arhipenko, T. Sazontova, A. Zhukova // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2005. – Vol. 140, № 3. – P. 278–281.

- Melatonin improves mitochondrial respiratory chain activity and liver morphology in ob/ob mice / P. Solís-Muñoz, J. A. Solís-Herruzo, D. Fernández-Moreira et al. // J. Pineal Res. – 2011. – Vol. 51, № 1. – P. 113–123. doi: 10.1111/j.1600-079X.2011.00868.x.

- Журавлева С. А. Гистология: практикум / С. А. Журавлева. – Минск: "Вышэйшая школа", 2013.

- Лебедева Е. И. Морфометрические показатели гепатоцитов белых крыс и человека при токсическом циррозе печени [Электронный ресурс] / Е. И. Лебедева // Universum: Медицина и фармакология: электрон. научн. журн. – 2015. № 7–8. – URL: <http://7universum.com/ru/med/archive/item/2547>.

- Саркисов Д. С. Электронная микроскопия деструктивных и регенераторных внутриклеточных процессов / Д. С. Саркисов. – М.: Медицина, 1967.

- The multifunctional nucleolus. Nature Reviews / F. Boisvert, S. Konningsbruggen, J. Navascues et al. // Molecular. Cell. Biology. – 2007. – Vol. 8, № 7. – P. 574–85. doi:10.1038/nrm2184.

- Романова Л. П. Роль двуядерных гепатоцитов в регенерации печени после механической травмы в раннем онтогенезе у крыс / Л. П. Романова, И. И. Малышев // Вестн. Чувашского ун-та. – 2011. – № 3. – С. 398–402.

- Янко Р. В. Порівняння стану паренхіми печінки щурів різних ліній після введення мелатоніну / Р. В. Янко, О. Г. Чака, Л. М. Плотнікова // Укр. журн. медицини, біології та спорту. – 2015. – № 1. – Т. 1. – С. 201–206.

- Янко Р. В. Влияние прерывистой гипоксии на морфофункциональное состояние щитовидной железы и печени / Р. В. Янко, В. А. Березовский, М. И. Левашов // Рос. физиол. журн. им. М. И. Сеченова. – 2017. – Т. 103, № 5. – С. 553–561.

- Лебкова Н. П. Адаптационные внутриклеточные механизмы регуляции энергетического гомеостаза при прерывистой нормобарической гипоксии / Н. П. Лебкова, А. Я. Чижов, Ю. И. Бобков // Рос. физиол. журн. им. М. И. Сеченова. – 1999. – Т. 85, № 3. – С. 403–411.

- Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 α in distinct cell populations of different organs / S. W. Michael, S. J. Jan, R. Christian et al. // Faseb J. – 2003. – Vol. 17. – P. 271–273.

- Melatonin protects from hepatic reperfusion injury through inhibition of IKK and JNK pathways and modification of cell proliferation / R. Liang, A. Nikholgh, K. Hoffmann et al. // J. Pineal Res. – 2009. – Vol. 46, № 1. – P. 8–14.

- Antiproliferative activity of melatonin by transcriptional inhibition of cyclin D1 expression: a molecular basis for melatonin-induced oncostatic effects / G. Cini, B. Neri, A. Pacini et al. // J. Pineal Res. – 2005. – Vol. 39 – P. 12–20.

References

- Berezovsky VA. Natural and instrumental orotherapy. Donetsk: "Zaslavsky A. Yu.", 2012. (Russian).
- Powell F, Garcia N. Physiological effects of intermittent hypoxia. High. It. Med. Biol. 2002; 1:125–36.
- Serikov VS, Lyashev YuD. Effect of melatonin on stress-induced changes in liver of rats with different resistance to stress. Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny. 2015; 3: 290–94. (Russian).
- Chojnacki C, Walecka-Kapica E, Romanowski M, Chojnacki J, Klupinska G. Protective role of melatonin in liver damage. Curr Pharm Des. 2014; 20(30): 4828–33.
- Pevet P. Melatonin and biological rhythms. Therapie. 1998; 30(1):109–124.
- Zavadnik LB, Zavadnik IB, Lapshina EA, Belonovskaya EB, Martinchik DI, Kravchuk RI, Bryszewska M, Reiter RJ. Protective effects of melatonin against carbon tetrachloride hepatotoxicity in rats. Cell Biochem. Funct. 2005; 23:353–59.
- Abbasoglu O, Berker M, Ayhan A, Palaoglu S, Sayek I. The effect of the pineal gland on liver regeneration in rats. J. Hepatol. 1995; 23(5):578–81.
- Arhipenko Y, Sazontova T, Zhukova A. Periodic hypoxia and hyperoxia improves resistance of membrane structures in heart, liver and brain. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2005; 140(3):278–81.
- Solís-Muñoz P, Solís-Herruzo JA, Fernández-Moreira D, Gómez-Izquierdo E, García-Consuegra I, Muñoz-Yagüe T, García Ruiz I. Melatonin improves mitochondrial respiratory chain activity and liver morphology in ob/ob mice. J. Pineal Res. 2011; 51(1):113–23. doi: 10.1111/j.1600-079X.2011.00868.x.

10. Zhuravleva SA. Histology. Workshop. – Minsk: "The High School", 2013. (Russian).

11. Lebedeva EI. Morphometric parameters of hepatocytes of white rats and humans in toxic liver cirrhosis. *Universum: Medicina i farmakologija: electron. scientific. journal.* 2015; 7-8: URL: <http://7universum.com/en/med/archive/item/2547>. (Russian).

12. Sarkisov DS. Electron microscopy of destructive and regenerative intracellular processes. – Moscow: "Medicine", 1967. (Russian).

13. Boisvert F, Konningsbruggen S, Navascues J, Lamond AI. The multifunctional nucleolus. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology.* 2007; 8(7):574–85. doi:10.1038/nrm2184.

14. Romanova LP, Malyshev AI. The role of binuclear hepatocytes in liver regeneration after mechanical trauma in early ontogenesis in rats. *Vestnik Chuvashskogo universiteta.* 2011; 3: 398-402. (Russian).

15. Yanko RV, Chaka OG, Plotnikova LM. Comparison of the state of liver parenchyma of rats cut off lines after the administration of melatonin. *Ukrains'kij zhurnal medicini, biologii ta sportu.* 2015; 1(1): 201-6. (Ukraine).

16. Yanko RV, Berezovsky VA, Levashov MI. Influence of intermittent hypoxia on the morphofunctional state of the thyroid and liver. *Rossiiskij fiziologicheskij zhurnal imeni I.M. Sechenova.* 2017; 103 (5):553-61. (Russian).

17. Lebkova NP, Chizhov AY, Bobkov Yu.I. Adaptive intracellular mechanisms of regulation of energy homeostasis with intermittent

normobaric hypoxia. *Rossiiskij fiziologicheskij zhurnal imeni Sechenova.* 1999; 85 (3): 403-11. (Russian).

18. Michael SW, Jan SJ, Christian R, Charlotte KS, Jan HH. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2α in distinct cell populations of different organs. *Faseb J.* 2003; 17:271–73.

19. Liang R, Nikholgh A, Hoffmann K, Kern M, Schneider H, Sobirey M, Zorn M, Büchler MW, Schemmer P. Melatonin protects from hepatic reperfusion injury through inhibition of IKK and JNK pathways and modification of cell proliferation. *J. Pineal Res.* 2009; 46(1):8–14.

20. Cini G, Neri B, Pacini A, Cesati V, Sassoli C, Quattrone S, D'Apolito M, Fazio A, Scapagnini G, Provenzano A, Quattrone A. Antiproliferative activity of melatonin by transcriptional inhibition of cyclin D1 expression: a molecular basis for melatonin-induced oncogenic effects. *J. Pineal Res.* 2005; 39:12–20.

Надійшла до редакції 26.09.2018

Отримано виправлений варіант 29.10.2018

Підписано до друку 29.10.2018

Received in the editorial 26.09.2018

Received a revised version on 29.10.2018

Signed in the press on 29.10.2018

Р. Янко, канд. біол. наук

Інститут фізіології імені О. О. Богомольця НАН України, Київ, Україна

ПОЄДНАНИЙ ВПЛИВ ПЕРЕРИВЧАСТОЇ НОРМОБАРИЧНОЇ ГІПОКСІЇ ТА МЕЛАТОНІНУ НА МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНУ АКТИВНІСТЬ ПАРЕНХИМИ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ

Досліджено морфологічні зміни паренхіми печінки щурів після поєданого впливу переривчастої нормобаричної гіпоксії (ПНГ) і мелатоніну. Дослідження проведено у весняний період на 24 щурах-самцях. Дослідним тваринам щодня давали гіпоксичну газову суміш (12 % кисню в азоті) у переривчастому режимі: 15 хв деоксигенація / 15 хв реоксигенація протягом 2 год. Цим самим щурам щодня перорально вводили екзогенний мелатонін о 10.00 дозою 5 мг/кг. Тривалість експерименту становила 28 днів. Із тканини печінки виготовляли гістологічні препарати за стандартною методикою. Морфометрію здійснювали за допомогою комп'ютерної програми "Image J". У щурів, які зазнавали впливу ПНГ і мелатоніну, виявили достовірно більшу площу гепатоцитів, їхніх ядер і цитоплазми на 19, 54 і 31 %, відповідно, ніж у контролі. Це зумовило достовірне підвищення ядерно-цитоплазматичного співвідношення на 35 %. У піддослідних тварин зазначено більшу кількість ядерців у ядрах гепатоцитів (на 14 %) і кількість двоядерних гепатоцитів (на 23 %). Ці дані можуть свідчити про зростання функціональної активності гепатоцитів і активацію фізіологічної регенерації клітин на внутрішньоклітинному рівні. Також у піддослідних тварин виявлено зменшення відстані між ядрами суміжних гепатоцитів, що вказує на щільніше розташування клітин між собою і зменшення кількості міжклітинної сполучної тканини. Сумісний вплив переривчастої нормобаричної гіпоксії та мелатоніну має морфологічні ознаки підвищення функціональної активності та фізіологічної регенерації паренхіми печінки.

Ключові слова: печінка, переривчаста гіпоксія, мелатонін.

R. Yanko, PhD

O. O. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Science of Ukraine, Kyiv, Ukraine

THE COMBINED INFLUENCE OF THE INTERMITTENT NORMOBARIC HYPOXIA AND MELATONIN ON MORPHOFUNCTIONAL ACTIVITY OF THE RAT'S LIVER PARENCHYMA

The aim of the study was to investigate the morphological changes in the liver parenchyma of rats after the combined effect of intermittent normobaric hypoxia (INH) and melatonin.

The study was carried out in the spring on 24 male rats of the Wistar line. The experimental animals were daily given a hypoxic gas mixture (12 % oxygen in nitrogen) in the intermittent mode: 15 minutes deoxygenation / 15 minutes reoxygenation for 2 hours. The same rats were daily administered orally with exogenous melatonin at 10.00 at a dose of 5 mg / kg. The duration of the experiment was 28 days. Histological preparations from the liver tissue were prepared according to a standard procedure. Morphometry was performed using the computer program "Image J". In rats exposed to INH and melatonin, a significantly larger area of hepatocytes, their nucleus and cytoplasm were detected by 19, 54 and 31 %, respectively, than in the control. This led to a significant increase in the nuclear-cytoplasmic ratio by 35 %. The experimental animals showed a higher number of nucleolus in the nucleus of hepatocytes (by 14 %) and the number of binuclear hepatocytes (by 23 %). These data may indicate an increase in the functional activity of hepatocytes, the activation of physiological cell regeneration at the intracellular level. Also, experimental animals showed a decrease in the distance between the nucleus of adjacent hepatocytes, which indicates a more dense arrangement of cells among themselves and a decrease in the amount of intercellular connective tissue. The combined effect of intermittent normobaric hypoxia and melatonin has morphological signs of increased functional activity and physiological regeneration of the liver parenchyma.

Keywords: liver, intermittent hypoxia, melatonin.

УДК 577.112.7

Ю. Вілецька, асп.
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
Д. Мінченко, канд. мед. наук, доц.
Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця, Київ, Україна,
Інститут біохімії імені О. В. Палладіна, Київ, Україна,
В. Давидов, д-р біол. наук, проф.
ДЗ "Інститут охорони здоров'я дітей та підлітків НАМН України", Харків, Україна,
О. Мінченко, д-р біол. наук, проф.
Інститут біохімії імені О. В. Палладіна, Київ, Україна

РІВЕНЬ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ *ADM*, *SLC1A3*, *HSPA5* ТА *PDGFC* У ПІДЛІТКІВ І ДОРОСЛИХ ЧОЛОВІКІВ З ОЖИРІННЯМ

Проаналізовано відносний рівень експресії генів *ADM* (адреномедуліну), *SLC1A3* (високоафінного переносника глутамату глії), *HSPA5* (протеїну теплового шоку A5) та *PDGFC* (тромбоцитарного фактора росту C), що кодують поліфункціональні протеїни, у крові підлітків і жировій тканині дорослих чоловіків з ожирінням за умов відсутності резистентності до інсуліну для визначення їх можливої ролі в розвитку ожиріння і його ускладнень. Установлено, що відносний рівень експресії генів *SLC1A3*, *HSPA5* та *PDGFC* у крові підлітків значно більший за умов ожиріння та відсутності резистентності до інсуліну порівняно з контрольною групою відносно здорових індивідуумів такого самого віку без ознак ожиріння. Проте у крові підлітків з ожирінням істотно не змінювався рівень експресії гена *ADM*. Показано також, що в підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням без ознак резистентності до інсуліну відносний рівень експресії генів *SLC1A3* та *PDGFC* був нижчим, а генів *ADM* та *HSPA5* – більшим порівняно з контрольною групою. Збільшення в підшкірній жировій тканині рівня експресії гена *ADM*, який має гіпотензивну активність, контролює секрецію кортикотропіну, лептину, ендотеліну-1 і адипонектину та є причетним до розвитку резистентності до інсуліну й метаболічного синдрому, а також посилено експресується в злоякісних пухлинах, значною мірою це стосується і підвищеної експресії гена *HSPA5*, який задіяний у контролі різних метаболічних шляхів, причому як у клітинах, так і поза ними, виявляється в ендоплазматичному ретикулумі, ядрі, мітохондріях і цитозолі, відіграє важливу роль у стресі ендоплазматичного ретикулума, ожирінні, резистентності до інсуліну та канцерогенезі. Отже, рівень експресії генів, які причетні до розвитку ожиріння та стресу ендоплазматичного ретикулума, а також до регуляції процесів проліферації, змінювався в крові та жировій тканині за умов ожиріння гено-специфічно.

Ключові слова: експресія генів, *ADM*, *SLC1A3*, *HSPA5*, *PDGFC*, кров, жирова тканина, ожиріння.

Вступ. Ожиріння з його метаболічними ускладненнями, зокрема резистентністю до інсуліну, є одною з найважливіших проблем сьогодення в усьому світі. Розвиток ожиріння супроводжується численними порушеннями метаболічних процесів у всьому організмі, у тому числі й у жировій тканині, причому ці порушення значною мірою виявляються й у крові [1–3]. На молекулярному та клітинному рівнях були проведені дослідження, які чітко продемонстрували наявність взаємозв'язків між метаболічними порушеннями при ожирінні і його ускладненнями та дисрегуляцією ключових регуляторних механізмів шляхом змін в експресії великої кількості генів [2, 4, 5]. Ожиріння та його метаболічні ускладнення, як і багато інших захворювань, є результатом тісної взаємодії певних генетичних факторів і різноманітних зовнішніх чинників, хоча дисрегуляція метаболізму, у свою чергу, може призводити до певних змін у функціонуванні регуляторних механізмів клітин на різних рівнях [6, 7]. Відомо, що адіпогенез, як і процеси транспорту та метаболізму глюкози і ліпідів, а також багато інших, включаючи процеси проліферації, контролюються сіткою регуляторних факторів, що тісно пов'язані між собою [6, 7]. Раніше було показано, що за умов ожиріння без порушення толерантності до інсуліну в клітинах крові підлітків посилюється експресія генів *IRS1*, *CCN2*, *IGSEC*, *RSP01*, *IL13RA2* та *RIPK2*, знижується рівень експресії генів *IRS2* і *DNAJC15*, а з резистентністю до інсуліну за умов ожиріння асоціюються лише зміни рівня експресії генів *IRS1*, *IRS2*, *DNAJC15*, *RSP01* та *RIPK2* [8].

Відомо, що ріст жирової тканини викликає локальне хронічне запалення та порушує функцію адипоцитокінів, які причетні до розвитку метаболічного синдрому, а це може призводити до порушення експресії генів у клітинах крові [3, 7]. У зв'язку з цим пізнання детальних молекулярних механізмів порушення процесів метаболізму на клітинному та системному рівнях буде сприяти виявленню як природи ожиріння, так і його метаболіч-

них ускладнень, а також розробці нових стратегій профілактики та лікування цих захворювань.

Численні дані вказують на те, що ключові регуляторні ензими, рецептори та фактори, у тому числі й такі, як *ADM* (adrenomedullin), *SLC1A3* (solute carrier family 1, member 3: glial high affinity glutamate transporter), *PDGFC* (platelet derived growth factor C) та *HSPA5* (Heat Shock Protein Family A Member 5), є поліфункціональними, залежними від стресу ендоплазматичного ретикулума протеїнами і контролюють різні метаболічні шляхи, причому цілу низку функцій виконують як у клітинах, так і поза ними, є причетними до канцерогенезу [2, 6, 7, 9, 10, 14–16]. Наприклад, *ADM* має гіпотензивну активність, контролює секрецію кортикотропіну, лептину, ендотеліну-1 та адипонектину, причетний до розвитку резистентності до інсуліну та метаболічного синдрому, посилено експресується в злоякісних пухлинах і активує метастазування [9–13]. Більше того, лептин, ендотелін-1 і адипонектин також впливають на рівень *ADM* [13]. Відомо, що лептин є важливим регулятором не лише росту жирової тканини, він контролює різні аспекти метаболізму, задіяний у різноманітних сигнальних шляхах, у тому числі в регуляції процесів проліферації. Високоафінний переносник глутамату глії (*SLC1A3*), відомий ще як *EAAT1* (excitatory amino acid transporters 1), контролює перенесення не лише глутамату, а й аспартату, причетний до перенесення глюкози та інших цукрів, органічних кислот, іонів металів і деяких аміних сполук, залежить від стресу ендоплазматичного ретикулума і задіяний у регуляції пухлинних клітин [14]. *PDGFC*, відомий ще як *VEGFE* (vascular endothelial growth factor E), бере участь у регуляції процесів проліферації, ангіогенезу та міграції клітин, виживання клітин і апоптозу, зокрема шляхом посилення фосфорилування протеїнів Akt та Bad, а також має деякі інші функції [15].

Протеїн теплового шоку A5 (*HSPA5*) є шапероном, який відомий ще як 78 kDa протеїн, що регулюється глюкозою (*GRP78*), а також як протеїн *grp78*, який зв'я-

зується з іонами кальцію в ендоплазматичному ретикулумі та BiP (протеїн, що зв'язується з тяжким ланцюжком імуноглобуліну). Він є поліфункціональним протеїном, задіяний у контролі різних метаболічних шляхів, причому як у клітинах, так і поза ними, виявляється в ендоплазматичному ретикулумі, ядрі, мітохондріях і цитозолі, відіграє важливу роль у стресі ендоплазматичного ретикулума, ожирінні, резистентності до інсуліну та канцерогенезі, а його пригнічення блокує ріст злоякісних пухлин [16–18]. Відомо, що активність сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума IRE1 селективно пригнічується шапероном HSPA5/BiP у комплексі з ко-шапероном ERdj4/DNAJB9 у люмені ендоплазматичного ретикулума і що за умов стресу протеїн HSPA5 посилює проліферацію клітин і антиапоптоз [16–18]. Таким чином, усі ці гени мають певне значення в розвитку ожиріння, резистентності до інсуліну, а також у канцерогенезі. Дослідження, проведені на нокаутних за геном SNARK мишах, показали, що розвиток ожиріння і метаболічного синдрому в таких тварин асоціюється зі схильністю до утворення злоякісних пухлин [19].

Важливо зазначити, що характерною особливістю як ожиріння, так і асоційованої з ним резистентності до інсуліну, а також деяких інших патологічних станів, є стрес ендоплазматичного ретикулума [6, 7]. Цей стрес є вагомим чинником індукції метаболічного синдрому при ожирінні, оскільки при цьому істотно порушуються сигнальні шляхи від рецептора інсуліну за рахунок змін в експресії великої кількості генів [7, 8]. Разом з тим, детальні молекулярні механізми участі різних генів у розвитку ожиріння і його ускладнень ще не зовсім з'ясовані та заслуговують на подальше детальне вивчення.

Метою роботи було проаналізувати відносний рівень експресії генів *ADM*, *SLC1A3*, *HSPA5* та *PDGFC* у крові підлітків і жировій тканині дорослих чоловіків з ожирінням за умов відсутності резистентності до інсуліну для визначення можливої їх ролі в розвитку ожиріння.

Матеріали та методи. Дослідження проводили на підлітках чоловічої статі віком біля 14 років, які були розділені на дві групи (по сім у кожній групі). Перша, контрольна, група включала практично здорових дітей без ознак ожиріння з індексом маси тіла (ІМТ) $18,7 \pm 0,12 \text{ кг/м}^2$ (табл. 1).

Таблиця 1. Клінічна характеристика досліджених груп підлітків з ожирінням без резистентності до інсуліну порівняно з контрольною групою

	Контроль	Ожиріння – PI
Вік на час обстеження (роки)	$14,2 \pm 0,584$	$13,8 \pm 0,265$
Індекс маси тіла (ІМТ), кг/м^2	$18,8 \pm 0,17$	$31,1 \pm 0,36^*$
Індекс резистентності до інсуліну (НОМА)	$2,38 \pm 0,128$	$2,63 \pm 0,219$
Інсулін натщесерце (МО/мл)	$12,8 \pm 0,69$	$14,3 \pm 0,95$
Глюкоза натщесерце (ммоль/л)	$4,07 \pm 0,177$	$4,3 \pm 0,183$
2 год пероральний глюкозотолерантний тест (ммоль/л)	$4,19 \pm 0,124$	$4,74 \pm 0,215$

Примітка: наведено середні дані $\pm m$; МО – міжнародні одиниці; $n = 7$;

* – $p \leq 0,05$ порівняно з контрольною групою (контроль)

До другої групи були відібрані підлітки, що мали ожиріння без резистентності до інсуліну, а ІМТ дорівнював $31,0 \pm 0,40 \text{ кг/м}^2$. Обстеження пацієнтів і отримання біологічного матеріалу було проведено в ДЗ "Інститут охорони здоров'я дітей та підлітків НАМН України" з дотриманням усіх біотичних вимог. Установлено, що індекс маси тіла був значно більшим у групі дітей з ожирінням ($+66\%$; $p \leq 0,05$) порівняно з контрольною групою (табл. 1). Подібні результати були отримані й при дослідженні рівня інсуліну в крові натщесерце: відсутність істотних змін у дітей з ожирінням без ознак резистентності до інсуліну порівняно з контрольною групою (табл. 1). Були проведені також дослідження на жировій тканині, яку брали шляхом біопсії в дорослих чоловіків віком біля 45 років, розділених також на дві групи (по шість у кожній): контрольні (без ознак ожиріння та ІМТ $23 \pm 1,4 \text{ кг/м}^2$) і з ожирінням (ІМТ $32 \pm 1,4 \text{ кг/м}^2$). Обстеження пацієнтів і отримання біологічного матеріалу було проведено в Інституті експериментальної ендокринології Словацької академії наук з дотриманням усіх біотичних вимог під керівництвом директора інституту, проф. І. Klimes. Клінічна характеристика пацієнтів, отримання й аналіз РНК були описані раніше [1].

Із крові підлітків виділяли РНК за допомогою реагенту Trisol (Invitrogen, США), як було описано раніше [20]. Осади РНК промивали 75 %-м етанолом, розчиняли у воді, вільній від рибонуклеаз, переосажували етано-

лом для додаткового очищення від можливих залишків фенолу, знову розчиняли у воді й використовували для синтезу комплементарної ДНК. Концентрацію та спектральні характеристики отриманих препаратів РНК визначали на безжовтньому спектрофотометрі "NanoDrop Spectrophotometer ND1000" ("PEQLAB", Німеччина). Для синтезу комплементарної ДНК (кДНК) використовували тотальну РНК із крові як матрицю та набір "QuantiTect Reverse Transcription Kit" (QIAGEN, Німеччина) згідно з протоколом виробника, у якому передбачено етап, що забезпечує елімінацію можливих залишків геномної ДНК. Рівень експресії генів *ADM*, *SLC1A3*, *PDGFC* та *HSPA5* у крові та жировій тканині визначали методом кількісної полімеразної реакції в реальному часі, використовуючи "QuantStudio 5 Real-Time PCR System" (Applied Biosystems, США) та "SYBRGreen Mix" ("AB gene", "Thermo Fisher Scientific", Epsom, Surrey, UK). Ампліфікацію проводили протягом 40 циклів для всіх досліджених генів за таких температурних умов циклу: $95^\circ\text{C} - 20 \text{ с}$, $55^\circ\text{C} - 20 \text{ с}$ та $72^\circ\text{C} - 20 \text{ с}$. Нуклеотидні послідовності праймерів, що використовували для ампліфікації фрагментів кДНК мРНК *ADM*, *SLC1A3*, *PDGFC* та *HSPA5*, а також положення в мРНК і довжина продуктів ампліфікації кількісної полімеразної ланцюгової реакції наведені в табл. 2.

Таблиця 2. Олігонуклеотидні праймери, що використовувались для визначення рівня експресії мРНК досліджених генів методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції комплементарних ДНК

Символ гена	Назва гена	Послідовності праймерів	Положення праймера в мРНК	Номер мРНК у базі GenBank
<i>ADM</i>	adrenomedullin	П: 5'- agtgggacgtctgagacttt З: 5'- cagcactcagagcccactta	80–99 280–271	NM_001124
<i>SLC1A3</i>	solute carrier family 1 member 3 (Glial High Affinity Glutamate Transporter)	П: 5'- ccattcccactcctcttt З: 5'- ccacagaaagccaaacctcc	175–194 423–404	NM_004172
<i>PDGFC</i>	platelet derived growth factor C	П: 5'- ctcttggttaaacgctgtgg З: 5'- tatcctcctgtgtccctct	1314–1333 1528–1509	NM_016205
<i>HSPA5 (GRP78; BiP)</i>	Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 5 (78 kDa glucose-regulated protein; immunoglobulin heavy chain-binding protein)	П: 5'- gctggcaagatgaagctctc З: 5'- atcagacgtccccctcagg	253–272 488–469	NM_005347
<i>ACTB</i>	beta-actin	П: 5'- ggactctgagcaagagatgg З: 5'- agcactgtgttgccgtacag	747–766 980–961	NM_001101

Примітка: П – прямий, З – зворотний праймер

Дизайн і селекцію праймерів проводили в програмі "Primer3 web", версія 4.0.0 (<http://primer3.ut.ee/>). За рівнем експресії гена бета-актину оцінювали рівень експресії мРНК досліджуваних генів. Олігонуклеотидні праймери були отримані з компанії "Sigma-Aldrich" (США). Аналіз результатів дослідження експресії генів *ADM*, *SLC1A3*, *PDGFC* та *HSPA5* виконували за допомогою спеціалізованого програмного забезпечення – програми "Differential expression calculator", статистичний аналіз проводили з використанням *t*-критерію однієї проби (one sample *t* test) або *t*-критерію для двох незалежних вибірок. Отримані дані мали нормальне розподілення. Значення експресії генів *ADM*, *SLC1A3*, *PDGFC* та *HSPA5* нормалізували за рівнем експресії гена бета-актину і представляли у відсотках від контролю (100 %). Представлені середні значення $\pm m$ семи експериментів для крові та шести – для жирової тканини для кожного з досліджених генів у трьох повторях.

Результати дослідження та їх обговорення. Як видно з даних, наведених у табл. 3, відносний рівень експресії гена *ADM* у крові підлітків з ожирінням, але без ознак резистентності до інсуліну, істотно не змінюється порівняно з контрольною групою. Деякі інші зміни були виявлені при дослідженні рівня експресії генів *SLC1A3* та *PDGFC* (табл. 3). Так, рівень експресії генів *SLC1A3* та *PDGFC* у крові підлітків з ожирінням, що не мали ознак резистентності до інсуліну, збільшується на 21 % та 12 %, відповідно ($p \leq 0,05$ в обох випадках), порівняно з контрольною групою. Крім того, результати дослідження відносного рівня експресії гена *HSPA5/BiP* у крові підлітків продемонстрували, що рівень експресії цього гена значно більший за умов ожиріння без ознак резистентності до інсуліну (+71 %; $p \leq 0,01$) порівняно з контрольною групою (табл. 3).

Таблиця 3. Відносний рівень експресії генів *ADM*, *SLC1A3*, *HSPA5* та *PDGFC* у крові підлітків з ожирінням без резистентності до інсуліну

№ п/п	Ген	Контрольна група підлітків	Ожиріння без ознак резистентності до інсуліну
1	<i>ADM</i>	100	$98 \pm 5,21$ $p > 0,5$
2	<i>SLC1A3</i>	100	$121 \pm 4,50$ $p \leq 0,05$
3	<i>PDGFC</i>	100	$112 \pm 3,85$ $p \leq 0,05$
4	<i>HSPA5</i>	100	$171 \pm 5,09$ $p \leq 0,001$

Примітка. Відносний рівень експресії мРНК *ADM*, *SLC1A3*, *HSPA5* та *PDGFC* за умов ожиріння без ознак резистентності до інсуліну нормалізували за рівнем експресії гена бета-актину і представляли у відсотках від контролю (контрольна група підлітків без ознак ожиріння), прийнятого за 100 %; $n = 7$; p – значення "р" при порівнянні з контролем

Результати цих досліджень свідчать про те, що за умов ожиріння без ознак резистентності до інсуліну змінюється відносний рівень експресії генів *SLC1A3*, *PDGFC* та *HSPA5* у крові підлітків порівняно з контрольною групою і що ці гени причетні до певних метаболічних порушень при ожирінні. Значне підвищення рівня експресії гена *HSPA5* у крові підлітків з ожирінням без ознак резистентності до інсуліну вказує на наявність стресу ендоплазматичного ретикулума, оскільки *HSPA5* є стрес-залежним шапероном BiP. Цей шаперон причетний до формування третинної структури протеїнів, рівень його експресії підвищується за умов індукції стресу ендоплазматичного ретикулума. Відомо, що BiP значною мірою контролює активність сенсорно-

сигнальних шляхів цього стресу і причетний до розвитку метаболічного синдрому [16].

Були також проведені дослідження відносного рівня експресії генів *ADM*, *SLC1A3*, *HSPA5* та *PDGFC* у підшкірній жировій тканині дорослих чоловіків з ожирінням без ознак резистентності до інсуліну, результати яких представлені в табл. 4. Установлено, що в підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням рівень експресії генів *SLC1A3* та *PDGFC* знижується на 14 та 18 %, відповідно ($p \leq 0,05$ для обох генів), порівняно з контрольною групою. Проте відносний рівень експресії генів *ADM* та *HSPA5*, навпаки, різко збільшується: на 72 та +55 %, відповідно ($p \leq 0,01$ в обох випадках), у групі чоловіків з ожирінням порівняно з контрольною групою (табл. 4).

Таблиця 4. Відносний рівень експресії генів *ADM*, *SLC1A3*, *HSPA5* та *PDGFC* у підшкірній жировій тканині дорослих чоловіків з ожирінням без ознак резистентності до інсуліну за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції

№ п/п	Ген	Контрольна група чоловіків	Ожиріння без ознак резистентності до інсуліну
1	<i>ADM</i>	100	172 ± 8,13 p ≤ 0,01
2	<i>SLC1A3</i>	100	86 ± 4,11 p ≤ 0,05
3	<i>PDGFC</i>	100	82 ± 3,92 p ≤ 0,05
4	<i>HSPA5</i>	100	155 ± 6,12 p ≤ 0,01

Примітка. Відносний рівень експресії мРНК *ADM*, *SLC1A3*, *HSPA5* та *PDGFC* у підшкірній жировій тканині дорослих чоловіків з ожирінням без ознак резистентності до інсуліну нормалізували за рівнем експресії гена бета-актину і представляли у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %; n = 6; p – значення "p" при порівнянні з контролем

Результати дослідження відносного рівня експресії генів *ADM*, *SLC1A3*, *HSPA5* та *PDGFC* у підшкірній жировій тканині дорослих чоловіків із ожирінням без ознак резистентності до інсуліну свідчать про те, що експресія досліджених генів у підшкірній жировій тканині істотно змінюється за умов ожиріння й указує на їх можливу участь у розвитку ожиріння та пов'язаних із ним метаболічних ускладнень.

Отже, результати цієї роботи розкривають нові аспекти молекулярних механізмів розвитку ожиріння, вони свідчать про участь генів *ADM*, *SLC1A3*, *HSPA5* та *PDGFC* у розвитку цього патологічного стану. Показано, що зміни в експресії цих генів за умов ожиріння мають гено-специфічний і тканинно-специфічний характер. Значне підвищення рівня експресії гена *HSPA5* у крові підлітків і підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням указує на розвиток опосередкованого ожирінням стресу ендоплазматичного ретикулула, оскільки *HSPA5* є шапероном, причетним до формування третинної структури протеїнів, і посилено експресується за умов індукції цього стресу, але він також причетний і до розвитку метаболічного синдрому. Відомо, що активність IRE1, основного сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулула, контролюється шапероном *HSPA5*/BiP і що за умов цього стресу *HSPA5* посилює проліферацію клітин і антиапоптоз, а його пригнічення блокує ріст злоякісних пухлин [16–18]. Отримані нами результати роблять певний внесок у розуміння молекулярних механізмів підвищеної схильності до канцерогенезу організмів з ожирінням, оскільки всі проаналізовані в цій роботі гени, а особливо гени *HSPA5* та *ADM*, задіяні не лише в розвитку ожиріння, а й контролюють ріст злоякісних пухлин [9–13, 15–18]. Усе це узгоджується з дослідженнями, проведеними японськими вченими на мишах, нокаутних за геном *SNARK* [19]. Вони показали, що розвиток ожиріння та метаболічного синдрому в таких тварин асоціюється зі схильністю до утворення злоякісних пухлин.

Висновки

1. Установлено, що в крові підлітків з ожирінням без ознак резистентності до інсуліну рівень експресії генів *SLC1A3*, *HSPA5* та *PDGFC* є підвищеним порівняно з контрольною групою.

2. Установлено, що в підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням рівень експресії генів *SLC1A3* та *PDGFC* знижується, а генів *ADM* та *HSPA5* – збільшується порівняно з контрольною групою.

3. Значне підвищення рівня експресії гена *HSPA5* у крові підлітків і підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням указує на наявність стресу ендоплазматич-

ного ретикулула, оскільки *HSPA5* є стрес-залежним шапероном, причетним до формування третинної структури протеїнів, і посилено експресується за умов індукції цього стресу.

4. Результати цієї роботи вказують на можливу участь генів *ADM*, *SLC1A3*, *HSPA5* та *PDGFC* у розвитку ожиріння та його ускладнень.

Список використаної літератури:

1. Minchenko D. The expression of TIMP1, TIMP2, VCAN, SPARC, CLEC3B and E2F1 in subcutaneous adipose tissue of obese males and glucose intolerance / D. Minchenko, O. Ratushna, Y. Bashta // CellBio. – 2013. – Vol. 2, № 2. – P. 25–33.
2. Мінченко Д. О. Молекулярні основи розвитку ожиріння та його метаболічних ускладнень у дітей / Д. О. Мінченко // Сучасна педіатрія. – 2015. – № 2(66). – С. 109–112.
3. A pilot investigation of visceral fat adiposity and gene expression profile in peripheral blood cells / M. Yamaoka, N. Maeda, S. Nakamura et al. // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, № 10. – P. e47377.
4. Impairment of peripheral circadian clocks precedes metabolic abnormalities in ob/ob mice / H. Ando, M. Kumazaki, Y. Motosugi et al. // Endocrinology. – 2011. – Vol. 152, № 4. – P. 1347–1354.
5. Adipose hypothermia in obesity and its association with period homolog 1, insulin sensitivity, and inflammation in fat / M. Yamaoka, N. Maeda, Y. Takayama et al. // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, № 11. – P. e112813.
6. Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration / R. Bravo, V. Parra, D. Gatica et al. // Int. Rev. Cell. Mol. Biol. – 2013. – Vol. 301. – P. 215–290.
7. Han J. Measurement of the unfolded protein response to investigate its role in adipogenesis and obesity / J. Han, R. J. Kaufman // Methods Enzymol. – 2014. – Vol. 538. – P. 135–150.
8. Expression of *CCN2*, *IQSEC*, *RSP01*, *DNAJC15*, *RIPK2*, *IL13RA2*, *IRS1*, and *IRS2* genes in blood cells of obese boys with and without insulin resistance / D. O. Minchenko, V. V. Davydov, O. A. Budreiko et al. // Fiziol. Zh. – 2015. – Vol. 61, № 1. – P. 10–18.
9. Adrenomedullin is up-regulated in patients with pancreatic cancer and causes insulin resistance in β cells and mice / G. Aggarwal, V. Ramachandran, N. Javed et al. // Gastroenterology. – 2012. – Vol. 143, № 6. – P. 1510–1517.
10. Adrenomedullin promotes intrahepatic cholangiocellular carcinoma metastasis and invasion by inducing epithelial-mesenchymal transition / C. Zhou, Y. Zheng, L. Li et al. // Oncol. Rep. – 2015. – Vol. 34, № 2. – P. 610–616.
11. Adrenomedullin 2 Improves Early Obesity-Induced Adipose Insulin Resistance by Inhibiting the Class II MHC in Adipocytes / S. Y. Zhang, Y. Lv, H. Zhang et al. // Diabetes. – 2016. – Vol. 65, № 8. – P. 2342–2355.
12. Effects of adrenomedullin on tumour necrosis factor alpha, interleukins, endothelin-1, leptin, and adiponectin in the epididymal fat and soleus muscle of the rat / S. B. Liao, P. F. Wong, B. M. Cheung et al. // Horm. Metab. Res. – 2013. – Vol. 45, № 1. – P. 31–37.
13. Adrenomedullin in the growth modulation and differentiation of acute myeloid leukemia cells / R. Di Liddo, D. Bridi, M. Gottardi et al. // Int. J. Oncol. – 2016. – Vol. 48, № 4. – P. 1659–1669.
14. A new splice variant of the glutamate-aspartate transporter: cloning and immunolocalization of GLAST1c in rat, pig and human brains / A. Lee, A. R. Anderson, S. J. Beasley et al. // J. Chem. Neuroanat. – 2012. – Vol. 43, № 1. – P. 52–63.
15. Platelet-derived growth factor-C (PDGF-C) induces anti-apoptotic effects on macrophages through Akt and Bad phosphorylation / D. Son, Y. R. Na, E. S. Hwang et al. // J. Biol. Chem. – 2014. – Vol. 289, № 9. – P. 6225–6235.

16. A J-Protein Co-chaperone Recruits BiP to Monomerize IRE1 and Repress the Unfolded Protein Response / N. Amin-Wetzel, R. A. Saunders, M. J. Kamphuis et al. // *Cell*. – 2017. – Vol. 171, № 7. – P. 1625–1637.

17. MicroRNA-30a-5p Inhibits the Growth of Renal Cell Carcinoma by Modulating GRP78 Expression / C. Wang, L. Cai, J. Liu et al. // *Cell. Physiol. Biochem*. – 2017. – Vol. 43, № 6. – P. 2405–2419.

18. KIAA1324 Suppresses Gastric Cancer Progression by Inhibiting the Oncoprotein GRP78 / J. M. Kang, S. Park, S. J. Kim et al. // *Cancer Res*. – 2015. – Vol. 75, № 15. – P. 3087–3097.

19. Susceptibility of Snark-deficient mice to azoxymethane-induced colorectal tumorigenesis and the formation of aberrant crypt foci / K. Tsuchihara, T. Ogura, R. Fujioka et al. // *Cancer Sci*. – 2008. – Vol. 99, № 4. – P. 677–682.

20. Hypoxic regulation of *MYBL1*, *MEST*, *TCF3*, *TCF8*, *GTF2B*, *GTF2F2* and *SNAI2* genes expression in U87 glioma cells upon IRE1 inhibition / O. H. Minchenko, D. O. Tsybmal, D. O. Minchenko, O. O. Kubaichuk // *Ukr Biochem. J*. – 2016. – Vol. 88, № 6. – P. 52–62.

References

1. Minchenko D, Ratushna O, Bashta Y, Herasymenko R, Minchenko O. The expression of *TIMP1*, *TIMP2*, *VCAN*, *SPARC*, *CLEC3B* and *E2F1* in subcutaneous adipose tissue of obese males and glucose intolerance. *CellBio*. 2013; Vol. 2(2):25–33.

2. Minchenko DO. Molecular bases of the development of obesity and its metabolic complications in children. *Modern Pediatrics* 2013;2(66):25–33.

3. Yamaoka M, Maeda N, Nakamura S, Kashine S, Nakagawa Y, Hiuge-Shimizu A, et al. A pilot investigation of visceral fat adiposity and gene expression profile in peripheral blood cells. // *PLoS One* 2012;7(10):e47377.

4. Ando H, Kumazaki M, Motosugi Y, Ushijima K, Maekawa T, Ishikawa E, et al. Impairment of peripheral circadian clocks precedes metabolic abnormalities in ob/ob mice. *Endocrinology* 2011;152(4):1347–54.

5. Yamaoka M, Maeda N, Takayama Y, Sekimoto R, Tsuchida Y, Matsuda K, et al. Adipose hypothermia in obesity and its association with period homolog 1, insulin sensitivity, and inflammation in fat. *PLoS One* 2014;9(11):e112813.

6. Bravo R, Parra V, Gatica D, Rodriguez AE, Torrealba N, Paredes F, et al. Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. *Int Rev Cell Mol Biol* 2013;301:215–90.

7. Han J, Kaufman RJ. Measurement of the unfolded protein response to investigate its role in adipogenesis and obesity. *Methods Enzymol* 2014;538:135–50.

8. Minchenko DO, Davydov VV, Budreiko OA, Moliavko OS, Kulieshova DK, Tiazhka OV, et al. Expression of *CCN2*, *IQSEC*, *RSP01*, *DNAJC15*, *RIPK2*, *IL13RA2*, *IRS1*, and *IRS2* genes in blood cells of obese boys with and without insulin resistance. *Fiziol Zh*. 2015;61(1):10–8.

9. Aggarwal G, Ramachandran V, Javeed N, Arumugam T, Dutta S, Klee GG, et al. Adrenomedullin is up-regulated in patients with pancreatic cancer and causes insulin resistance in β cells and mice. *Gastroenterology* 2012;143(6):1510–1517.

10. Zhou C, Zheng Y, Li L, Zhai W, Li R, Liang Z, et al. Adrenomedullin promotes intrahepatic cholangiocellular carcinoma metastasis and invasion by inducing epithelial-mesenchymal transition. *Oncol. Rep* 2015;34(2):610–6.

11. Zhang SY, Lv Y, Zhang H, Gao S, Wang T, Feng J, et al. Adrenomedullin 2 Improves Early Obesity-Induced Adipose Insulin Resistance by Inhibiting the Class II MHC in Adipocytes. *Diabetes* 2016;65(8):2342–55.

12. Liao SB, Wong PF, WSO, Cheung BM, Tang F. Effects of adrenomedullin on tumour necrosis factor alpha, interleukins, endothelin-1, leptin, and adiponectin in the epididymal fat and soleus muscle of the rat. *Horm Metab Res*. 2013 Jan;45(1):31–7.

13. Di Liddo R, Bridi D, Gottardi M, De Angeli S, Grandi C, Tasso A, et al. Adrenomedullin in the growth modulation and differentiation of acute myeloid leukemia cells. *Int J Oncol* 2016;48(4):1659–69.

14. Lee A, Anderson AR, Beasley SJ, Barnett NL, Poronnik P, Pow DV. A new splice variant of the glutamate-aspartate transporter: cloning and immunolocalization of GLAST1c in rat, pig and human brains. *J Chem Neuroanat* 2012;43(1):52–63.

15. Son D, Na YR, Hwang ES, Seok SH. Platelet-derived growth factor-C (PDGF-C) induces anti-apoptotic effects on macrophages through Akt and Bad phosphorylation. *J Biol Chem* 2014;289(9):6225–6235.

16. Amin-Wetzel N, Saunders RA, Kamphuis MJ, Rato C, Preissler S, Harding HP, et al. A J-Protein Co-chaperone Recruits BiP to Monomerize IRE1 and Repress the Unfolded Protein Response. *Cell* 2017;171(7):1625–37.

17. Wang C, Cai L, Liu J, Wang G, Li H, Wang X, et al. MicroRNA-30a-5p Inhibits the Growth of Renal Cell Carcinoma by Modulating GRP78 Expression. *Cell Physiol Biochem* 2017;43(6):2405–19.

18. Kang JM, Park S, Kim SJ, Kim H, Lee B, Kim J, et al. KIAA1324 Suppresses Gastric Cancer Progression by Inhibiting the Oncoprotein GRP78. *Cancer Res* 2015;75(15):3087–97.

19. Tsuchihara K, Ogura T, Fujioka R, Fujii S, Kuga W, Saito M, et al. Susceptibility of Snark-deficient mice to azoxymethane-induced colorectal tumorigenesis and the formation of aberrant crypt foci. // *Cancer Sci* 2008;99(4):677–82.

20. Minchenko OH, Tsybmal DO, Minchenko DO, Kubaichuk OO. Hypoxic regulation of *MYBL1*, *MEST*, *TCF3*, *TCF8*, *GTF2B*, *GTF2F2* and *SNAI2* genes expression in U87 glioma cells upon IRE1 inhibition. *Ukr Biochem J* 2016;88(6):52–62.

Надійшла до редколегії 26.09.2018

Отримано виправлений варіант 29.10.2018

Підписано до друку 29.10.2018

Received in the editorial 26.09.2018

Received a revised version on 29.10.2018

Signed in the press on 29.10.2018

Ю. М. Вилецька, асп.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,

Д. О. Минченко, канд. мед. наук, доц.,

Національний медичний університет ім. А. А. Богомольця, Київ, Україна,

Інститут біохімії імені А. В. Палладина, Київ, Україна,

В. В. Давыдов, д-р біол. наук, проф.

ГУ "Інститут охорони здоров'я дітей і підлітків НАМН України", Харків, Україна,

О. Г. Минченко, д-р біол. наук, проф.

Інститут біохімії імені А. В. Палладина, Київ, Україна

УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *ADM*, *SLC1A3*, *HSPA5* И *PDGFC* У ПОДРОСТКОВ И ВЗРОСЛЫХ МУЖЧИН С ОЖИРЕНИЕМ

Проанализирован относительный уровень экспрессии генов *ADM* (аденомедулина), *SLC1A3* (высокоаффинного переносчика глутамата глици), *HSPA5* (протеина теплового шока A5) и *PDGFC* (тромбоцитарного фактора роста C), которые кодируют полифункциональные белки, в крови подростков и жировой ткани взрослых мужчин с ожирением при отсутствии резистентности к инсулину для определения возможной их роли в развитии ожирения и его осложнений. Установлено, что относительный уровень экспрессии генов *SLC1A3*, *HSPA5* и *PDGFC* в крови подростков при ожирении без признаков резистентности к инсулину был выше по сравнению с контрольной группой относительно здоровых индивидуумов такого же возраста без признаков ожирения. Однако в крови подростков с ожирением относительный уровень экспрессии гена *ADM* существенно не изменялся. Показано также, что в подкожной жировой ткани мужчин с ожирением без признаков резистентности к инсулину относительный уровень экспрессии генов *SLC1A3* и *PDGFC* был ниже, а генов *ADM* и *HSPA5* – выше по сравнению с контрольной группой. Увеличение в подкожной жировой ткани уровня экспрессии гена *ADM*, который имеет гипотензивную активность, контролирует секрецию кортикотропина, лептина, эндотелина-1 и адипонектина и участвует в развитии резистентности к инсулину, а также усиленно экспрессируется в злокачественных опухолях, может иметь отношение к развитию осложненного ожирения, в том числе и образованию злокачественных опухолей. В основном это относится к увеличенной экспрессии гена *HSPA5*, который контролирует различные метаболические пути в клетках и вне их, обнаруживается в эндоплазматическом ретикулуме, ядре, митохондриях и цитозоле, играет важную роль в развитии стресса эндоплазматического ретикулума, ожирения, резистентности к инсулину и канцерогенезе. Таким образом, уровень экспрессии генов, которые причастны к развитию ожирения и стрессу эндоплазматического ретикулума, а также регуляции процессов пролиферации, изменялся в крови и жировой ткани при ожирении гено-специфически.

Ключевые слова: экспрессия генов, *ADM*, *SLC1A3*, *HSPA5*, *PDGFC*, кровь, жировая ткань, ожирение.

Y. M. Viletska, PhD stud.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
D. O. Minchenko, assoc. prof.
Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
V. V. Davydov, prof.
SI "Institute of Children and Adolescent Health Care, NAMS Ukraine", Kharkiv, Ukraine,
O. H. Minchenko, prof.
Palladin Institute of Biochemistry, Kyiv, Ukraine

THE LEVEL OF ADM, SLC1A3, HSPA5 AND PDGFC GENE EXPRESSIONS IN OBESE ADOLESCENTS AND ADULT MEN

The aim of this work was to analyze the relative level of the expression of ADM (adrenomedullin), SLC1A3 (glial high affinity glutamate transporter), HSPA5 (heat shock protein family A member 5) and PDGFC (platelet derived growth factor C) genes, which encoding poly-functional proteins, in adolescents blood and adipose tissue in adult men with obesity without insulin resistance to determine their possible role in the development of obesity and its complications. It was shown that relative expression level of SLC1A3, HSPA5 and PDGFC genes in the blood of obese adolescents without insulin resistance was significantly increased as compared to control group of relative healthy individuals of the same age without signs of obesity. At the same time, the expression level of ADM gene did not change significantly in these obese adolescents. It was also shown that in subcutaneous adipose tissue of obese adult men without insulin resistance the relative level of SLC1A3 and PDGFC gene expressions was decreased, but ADM and HSPA5 genes – increased as compared to control group. The increased level of ADM gene expression, which has hypotensive activity, controls corticotrophin, leptin, endothelin-1 and adiponectin secretion and is related to the development of insulin resistance and metabolic syndrome as well as overexpressed in malignant tumors, possibly related to the development of obesity complications including tumorigenesis. To a large extent, this also applies to increased expression of HSPA5 gene, which is involved in controlling various metabolic pathways, both in and outside cells, found in the endoplasmic reticulum, nucleus, mitochondria, and cytosol, plays an important role in the endoplasmic reticulum stress, obesity, insulin resistance and carcinogenesis. Therefore, the expression level of genes, which related to the development of obesity and endoplasmic reticulum stress as well as proliferation processes, was significantly changed in the blood and adipose tissue at obesity in gene-specific manner.

Key words: gene expressions, ADM, SLC1A3, HSPA5, PDGFC, blood, adipose tissue, obesity.

УДК 616.72-002: 577.1

А. Вовк, асп.,
О. Короткий, канд. біол. наук,
Д. Янковський, студ.,
Є. Торгалло, канд. біол. наук,
К. Дворщенко, д-р біол. наук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ВМІСТ ТБК-АКТИВНИХ СПОЛУК І АКТИВНІСТЬ АНТИОКСИДАНТНИХ ФЕРМЕНТІВ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТЕОАРТРОЗУ І ТРИВАЛОГО ВВЕДЕННЯ МУЛЬТИПРОБІОТИКА

Досліджено дію мультипробіотика на вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів і антиоксидантних ферментів у сироватці крові щурів за умов моноіодацетат-індукованого остеoarтрозу.

Дослідження проведені на білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях масою 180–240 г із дотриманням загальних етичних принципів експериментів на тваринах. Усіх тварин поділяли на чотири експериментальні групи. Перша група – контроль: тваринам у перший день вводили в колінну зв'язку 0,05 мл 0,9 %-го розчину NaCl і щоденно, протягом 14 днів, з 8-ї по 22-гу добу вводили пергастрально 1 мл питної води в перерахунок на 1 кг маси тіла тварини. Друга група – мультипробіотик: тваринам у перший день вводили в колінну зв'язку 0,05 мл 0,9 %-го розчину NaCl і щоденно, протягом 14 днів, з 8-ї по 22-гу добу вводили пергастрально мультипробіотик "Симбітер®" ("Пролісок", Україна) дозою 140 мг/кг, розведений в 1 мл питної води на 1 кг маси тварини. Третя група – модель остеoarтрозу: щурам у перший день вводили в колінну зв'язку 1 мг моноіодацетату натрію, розчиненого в 0,05 мл 0,9 %-го розчину NaCl, і щоденно, протягом 14 днів, вводили пергастрально 1 мл питної води в перерахунок на 1 кг маси тварини. Четверта група – остеoarтроз + мультипробіотик: тваринам вводили в перший день у колінну зв'язку 1 мг моноіодацетату натрію, розчиненого в 0,05 мл 0,9 %-го розчину NaCl, і пергастрально – мультипробіотик дозою 140 мг/кг, розведений в 1 мл питної води на 1 кг маси тварини. Тварин умертвляли на 30 добу після початку експерименту згідно з протоколом етичного комітету, після чого швидко робили забір крові. Вміст ТБК-активних сполук визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою. Супероксиддисмутазну активність оцінювали за здатністю ферменту конкурувати з нітросинім тетразолієм за супероксидні радикали. Каталазну активність вимірювали за кількістю незруйнованого пероксиду водню у пробі.

Установлено, що при моноіодацетат-індукованому остеoarтрозі в сироватці крові щурів порушується окисно-антиоксидантна рівновага: збільшується вміст ТБК-активних сполук, знижується супероксиддисмутазна та зростає каталазна активність. Показано, що при тривалому введенні мультипробіотика тваринам з моноіодацетат-індукованим остеoarтрозом вищевказані показники відновлювались.

Ключові слова: моноіодацетат-індукований остеoarтроз, мультипробіотик, ТБК-активні сполуки, супероксиддисмутаз, каталаза, сироватка крові.

Вступ. Серед порушень опорно-рухового апарату провідне місце займають захворювання суглобів різної локалізації, які стають частою причиною звернень пацієнтів до лікаря. Розвиток патології суглобів пов'язаний із цілою низкою факторів: інфекційні захворювання, механічні травми, надлишкова вага, хвороби хребта, автоімунні процеси, порушення обміну речовин, малорухливий спосіб життя, спадкова схильність, неправильне харчування, хронічний стрес тощо. Соціальна значущість патології суглобів визначається високим ступенем розповсюдженості, багаторічним персистуванням

болю і запалення та поступовим погіршенням якості життя хворих. У зв'язку з цим профілактика та лікування захворювань суглобів є однією з важливих проблем сучасної медицини [1, 2].

Серед досліджень останніх років з'являються дані про взаємозв'язок між розвитком захворювань суглобів і станом мікрофлори травної системи [3]. Показано, що сприйнятливості мишей до розвитку колаген-індукованого артриту залежить від видового складу їхньої мікрофлори [4]. У дослідженнях, проведених Alipour і співав., показано, що в пацієнтів з ревматоїд-

ним артритом, які отримували пробіотики, знижувався у крові рівень С-реактивного білка, прозапальних інтерлейкінів і зменшувався набряк суглобів [5]. Тому актуальним є дослідження біологічної дії пробіотичних препаратів на організм при патології суглобів.

Отже, метою роботи було дослідити дію мультипробіотика на вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) і антиоксидантних ферментів у сироватці крові щурів за умов моноодацетат-індукованого остеоартрозу.

Об'єкт та методи досліджень. Дослідження проведені на білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях масою 180–240 г із дотриманням загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 року), іншими міжнародними угодами і національним законодавством з цієї галузі. За добу до проведення експерименту тварин піддавали харчовій депривації з вільним доступом до води.

Усіх тварин поділяли на чотири експериментальні групи. Перша група – контроль: тваринам у перший день вводили в колінну зв'язку 0,05 мл 0,9 % розчину NaCl і щоденно, протягом 14 діб, з 8-ї по 22-гу добу вводили пергастрально 1 мл питної води в перерахунок на 1 кг маси тіла тварини. Друга група – мультипробіотик: тваринам у перший день вводили в колінну зв'язку 0,05 мл 0,9 % розчину NaCl і щоденно, протягом 14 діб, з 8-ї по 22-гу добу вводили пергастрально мультипробіотик "Симбітер®" ("Пролісок", Україна) дозою 140 мг/кг, розведений в 1 мл питної води на 1 кг маси тварини. Третя група – модель остеоартрозу: щурам у перший день вводили в колінну зв'язку 1 мг моноодацетату натрію (МІА), розчиненого у 0,05 мл 0,9 % розчину NaCl [6], і щоденно, протягом 14 діб, вводили пергастрально 1 мл питної води в перерахунок на 1 кг маси тварини. Четверта група – остеоартроз + мультипробіотик: тваринам вводили в перший день у колінну зв'язку 1 мг моноодацетату натрію, розчиненого в 0,05 мл 0,9 % розчину NaCl, і пергастрально – мультипробіотик дозою 140 мг/кг, розведений в 1 мл питної води на 1 кг маси тварини. Тварин умертвляли на 30 добу після початку експерименту згідно з протоколом етичного комітету, після чого швидко робили забір крові. Кров інкубували в термостаті при 37 °C протягом 30 хв, після чого центрифугували при 1000 g протягом 15 хв. Сироватку відбирали в пластикові мікропробірки та зберігали при –71 °C не більше 3 місяців до початку

подальших досліджень. Загальна кількість тварин, залучених до експериментальних досліджень, становила 20 особин. Вміст ТБК-активних сполук визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [7]. Супероксиддисмутазну активність оцінювали за здатністю ферменту конкурувати з нітросинім тетразолієм за супероксидні радикали [8]. Каталазну активність вимірювали за кількістю незруйнованого пероксиду водню у пробі [9]. Статистичну обробку результатів дослідження проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики [10].

Результати та їх обговорення. Значна частина захворювань суглобів супроводжується розвитком запалення. Запальні процеси безпосередньо пов'язані з активацією вільнорадикальних процесів у організмі. Тому стан окисно-антиоксидантної системи в організмі відображає інтенсивність розвитку захворювання [11].

У нашій роботі ми досліджували інтенсивність вільнорадикальних процесів за вмістом у сироватці крові ТБК-активних сполук, які є проміжними продуктами ПОЛ. Установлено, що в щурів при моноодацетат-індукованому остеоартрозі в сироватці крові вміст ТБК-активних сполук зростає в 2,1 раза порівняно з показниками контрольної групи тварин (табл. 1). Одержані дані продемонстрували, що при експериментальному остеоартрозі в сироватці крові накопичуються продукти ПОЛ, що свідчить про порушення балансу між інтенсивністю вільнорадикальних процесів і роботою антиоксидантної системи.

Важливим фактором, від якого залежить концентрація вільних радикалів у організмі, є кооперативна робота антирадикальних ферментів антиоксидантної системи – супероксиддисмутази та каталази, які регулюють рівень активних метаболітів кисню. Супероксиддисмутаза каталізує дисмутацію аніон-радикала кисню в пероксид водню, а каталаза каталізує процес розщеплення пероксиду водню до води. Послідовна робота цього ферментативного ланцюга антиоксидантної системи забезпечує підтримку стаціонарного рівня концентрації вільних радикалів.

Згідно з проведеними експериментальними дослідженнями показано, що в сироватці крові щурів при моноодацетат-індукованому остеоартрозі супероксиддисмутаза активність знижується в 1,6 раза, а каталазна активність зростає в 1,5 раза порівняно з контролем (табл. 1).

Таблиця 1. Вміст ТБК-активних сполук і активність антиоксидантних ферментів у сироватці крові щурів за умов остеоартрозу та введення мультипробіотика ($M \pm m$, $n = 5$)

Групи тварин	Показник	ТБК-активні сполуки, нмоль $\times$ мг білка ⁻¹	Супероксиддисмутаза, ум. од. $\times$ хв ⁻¹ $\times$ мг білка ⁻¹	Каталазна активність, нмоль $\times$ хв ⁻¹ $\times$ мг білка ⁻¹
Контроль		7,05 $\pm$ 0,68	0,21 $\pm$ 0,02	0,71 $\pm$ 0,06
Мультипробіотик		6,59 $\pm$ 0,64	0,19 $\pm$ 0,02	0,74 $\pm$ 0,07
Остеоартроз		14,63 $\pm$ 1,32*	0,13 $\pm$ 0,01*	1,08 $\pm$ 0,09*
Остеоартроз + Мультипробіотик		10,18 $\pm$ 0,97#	0,17 $\pm$ 0,01''#	0,65 $\pm$ 0,06#

* – $p < 0,05$ відносно контролю; # – $p < 0,05$ відносно групи тварин, яким вводили мультипробіотик

Зниження активності супероксиддисмутази в сироватці крові щурів при моноодацетат-індукованому остеоартрозі може виникати внаслідок збільшення рівня вільних радикалів, які, у свою чергу, можуть викликати окиснення амінокислот в активному центрі молекули ферменту, що призводить до його конформаційних перебудов і втрати ним функціональної активності. За даними літератури пероксид водню може викликати інактивацію активності супероксиддисмутази. Це може бути пов'язано з окисненням пероксидом водню кількох

гістидинових залишків апопротейну супероксиддисмутази та відновленням Cu^{2+} до Cu^+ у його складі [12-14]. Підвищення каталазної активності в сироватці крові щурів при моноодацетат-індукованому остеоартрозі свідчить про збільшення вмісту активних форм кисню, у тому числі пероксиду водню, інактивацію якого здійснює даний фермент.

Отримані результати свідчать, що в сироватці крові при моноодацетат-індукованому остеоартрозі порушується окисно-антиоксидантна рівновага, що підтвер-

джується збільшенням рівня продуктів ПОЛ і зміною роботи антиоксидантних ферментів.

При тривалому введенні мультипробіотика тваринам з експериментальним остеоартрозом у сироватці крові спостерігається зниження вмісту продуктів ПОЛ – ТБК-активних сполук – у 1,4 раза відносно групи тварин з моделлю остеоартрозу (табл. 1). За тих самих експериментальних умов у сироватці крові спостерігається часткове відновлення активності антиоксидантних ферментів: супероксиддисмутаза активність зростає в 1,3 раза, а каталаза – відновлюється до контрольного рівня. Виявлено, що введення щурам мультипробіотика не впливає на вміст досліджуваних параметрів у сироватці крові контрольної групи щурів (табл. 1).

Ефективність дії досліджуваного мультипробіотика пов'язана з широким спектром його біологічної активності та високим рівнем безпечності для організму. Механізм дії мультипробіотика "Симбітер[®]" базується на його здатності дієво ліквідувати мікроекологічні розлади та зменшувати запальні процеси на локальному й системному рівнях організму. Крім того, бактеріальні штами у складі мультипробіотика "Симбітер[®]" є активними продуцентами фізіологічно активних метаболітів: вітамінів, коротколанцюгових жирних кислот, антиоксидантів та імунomodulatorів, що розширює спектр біологічної активності даного препарату [15-17].

Висновки. Згідно з отриманими результатами експериментальних досліджень показано, що при монооддацетат-індукованому остеоартрозі в сироватці крові щурів активуються вільнорадикальні процеси (збільшення вмісту ТБК-активних сполук, зниження супероксиддисмутази та зростання каталазної активності), що призводить до розвитку окисного стресу. Тривале введення мультипробіотика щурам з експериментальною моделлю остеоартрозу відновлює окисно-антиоксидантну рівновагу в сироватці крові.

Список використаної літератури:

1. Cook C. Clinical Update: Why PRP Should Be Your First Choice for Injection Therapy in Treating Osteoarthritis of the Knee / C. Cook, P. Smith // *Curr. Rev. Musculoskelet. Med.* – 2018. – Vol. 11(4). – P. 583–592.
2. Man G. Osteoarthritis pathogenesis – a complex process that involves the entire joint / G. Man, G. Mologhianu // *J. Med. Life.* – 2014. – Vol. 7, № 1. – P. 37–41.
3. Bravo-Blas A. Microbiota and arthritis: correlations or cause? / A. Bravo-Blas, H. Wessel, S. Milling // *Curr Opin Rheumatol.* – 2016. – Vol. 28(2). – P. 161–167.
4. Zeng B. Role of the Gut Microbiome in Modulating Arthritis Progression in Mice / B. Zeng et al. // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 30594.
5. Alipour B. Effects of *Lactobacillus casei* supplementation on disease activity and inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis patients: a randomized double-blind clinical trial / B. Alipour, A. Homayouni-Rad, E. Vaghef-Mehrabany et al. // *Int. J. Rheum. Dis.* – 2014. – Vol. 17(5). – P. 519–527.
6. Baragi V. A new class of potent matrix metalloproteinase 13 inhibitors for potential treatment of osteoarthritis: Evidence of histologic and clinical efficacy without musculoskeletal toxicity in rat models / V. Baragi, G. Becher, A. Bendele et al. // *Arthritis. Rheum.* – 2009. – Vol. 60(7). – P. 2008–2018.
7. Стальная И. Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили // *Современные методы в биохимии.* – М.: Медицина, 1977. – С. 66–68.
8. Чевари С. Роль супероксиддисмутази в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах / С. Чевари, И. Чаба, Й. Секей // *Лаб. дело.* – 1985. – № 11. – С. 678–681.
9. Метод определения активности каталазы / М. Королюк та ін. // *Лаб. дело.* – 1988. – № 1. – С. 16–19.
10. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных / О. Ю. Реброва. – М.: Информполиграф, 2002.
11. Drevet S. Reactive oxygen species and NADPH oxidase 4 involvement in osteoarthritis / S. Drevet, G. Gavazzi, L. Grange et al. // *Exp./Gerontol.* – 2018. – Vol. 111. – P. 107–117.
12. Kwon H. Oxidative modification and inactivation of Cu,Zn-superoxide dismutase by 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride

/ H. Kwon, S. Choi, M. Won et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. – Vol. 1543(1). – P. 69–76.

13. Jung O. Inactivation of extracellular superoxide dismutase contributes to the development of high-volume hypertension / O. Jung, S. Marklund, N. Xia et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2007. – Vol. 27(3). – P. 470–477.

14. Demicheli V. Human Mn-superoxide dismutase inactivation by peroxynitrite: a paradigm of metal-catalyzed tyrosine nitration *in vitro* and *in vivo* / V. Demicheli, D. Moreno, R. Radi // *Metallomics.* – 2018. – Is. 5, № 10. – P. 679–695.

15. Вплив окисного стресу на рівень експресії генів *TGF-β* і *HGF* у печінці щурів в умовах тривалої шлункової гіпохлоридрії та за введення мультипробіотика Симбітер / К. О. Дворченко та ін. // *Укр. біохім. журн.* – 2013. – Т. 85, № 5. – С. 114–123.

16. Azad M. Immunomodulatory effects of probiotics on cytokine profiles / M. Azad, M. Sarker, D. Wan // *Biomed. Res. Int.* – 2018:8063647. doi: 10.1155/2018/8063647.

17. Probiotics prevent intestinal barrier dysfunction in acute pancreatitis in rats via induction of ileal mucosal glutathione biosynthesis / F. Lutgendorff et al. // *PLoS ONE.* – 2009. – Vol. 4, № 2. – P. e4512.

References

18. Cook C.S., Smith P.A. Clinical Update: Why PRP Should Be Your First Choice for Injection Therapy in Treating Osteoarthritis of the Knee // *Curr. Rev. Musculoskelet. Med.* – 2018. – Vol. 11(4). – P. 583–592.
19. Man G.S., Mologhianu G. Osteoarthritis pathogenesis – a complex process that involves the entire joint // *J. Med. Life.* – 2014. – Vol. 7, №1. – P. 37–41.
20. Bravo-Blas A., Wessel H., Milling S. Microbiota and arthritis: correlations or cause? // *Curr Opin Rheumatol.* – 2016. – Vol. 28(2). – P. 161–167.
21. X., Zeng B., Zhang J. et al. Role of the Gut Microbiome in Modulating Arthritis Progression in Mice // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 30594.
22. Alipour B., Homayouni-Rad A., Vaghef-Mehrabany E. et al. Effects of *Lactobacillus casei* supplementation on disease activity and inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis patients: a randomized double-blind clinical trial // *Int. J. Rheum. Dis.* – 2014. – Vol. 17(5). – P. 519–527.
23. Baragi V.M., Becher G., Bendele A.M., et al. A new class of potent matrix metalloproteinase 13 inhibitors for potential treatment of osteoarthritis: Evidence of histologic and clinical efficacy without musculoskeletal toxicity in rat models // *Arthritis. Rheum.* – 2009. – Vol. 60(7). – P. 2008–2018.
24. Стальная И.Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И.Д. Стальная, Т.Г. Гаришвили // *Современные методы в биохимии.* – М.: Медицина, 1977. – С. 66–68.
25. Чевари С. Роль супероксиддисмутази в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах / С. Чевари, И. Чаба, Й. Секей // *Лаб. дело.* – 1985. – № 11. – С. 678–681.
26. Метод определения активности каталазы / М. Королюк [та ін.] // *Лаб. дело.* – 1988. – № 1. – С. 16–19.
27. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. – М.: Информполиграф, 2002. – 305 с.
28. Drevet S., Gavazzi G., Grange L., Dupuy C., Lardy B. Reactive oxygen species and NADPH oxidase 4 involvement in osteoarthritis // *Exp/ Gerontol.* – 2018. – Vol. 111. – P. 107–117.
29. Kwon H.Y., Choi S.Y., Won M.H., Kang T., Kang J.H. Oxidative modification and inactivation of Cu,Zn-superoxide dismutase by 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. – Vol. 1543(1). – P. 69–76.
30. Jung O., Marklund S.L., Xia N., Busse R., Brandes R.P. Inactivation of extracellular superoxide dismutase contributes to the development of high-volume hypertension // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2007. – Vol. 27(3). – P. 470–477.
31. Demicheli V., Moreno D.M., Radi R. Human Mn-superoxide dismutase inactivation by peroxynitrite: a paradigm of metal-catalyzed tyrosine nitration *in vitro* and *in vivo* // *Metallomics.* – 2018. – Is. 5, №10. – P. 679–695.
32. Вплив окисного стресу на рівень експресії генів *TGF-β* і *HGF* у печінці щурів в умовах тривалої шлункової гіпохлоридрії та за введення мультипробіотика Симбітер / К. О. Дворченко [та ін.] // *Укр. біохім. журн.* – 2013. – Т. 85, № 5. – С. 114–123.
33. Azad M.A.K., Sarker M., Wan D. Immunomodulatory effects of probiotics on cytokine profiles // *Biomed. Res. Int.* – 2018:8063647. doi: 10.1155/2018/8063647.
34. Probiotics prevent intestinal barrier dysfunction in acute pancreatitis in rats via induction of ileal mucosal glutathione biosynthesis / F. Lutgendorff [et al.] // *PLoS ONE.* – 2009. – Vol. 4, № 2. – P. e4512.

Надійшла до редколегії 2.10.2018

Отримано виправлений варіант 1.11.2018

Підписано до друку 1.11.2018

Received in the editorial 2.10.2018

Received a revised version on 1.11.2018

Signed in the press on 1.11.2018

А. Вовк, асп.,
А. Короткий, канд. биол. наук,
Д. Янковский, студ.,
Е. Торгалло, канд. биол. наук,
Е. Дворщенко, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

СОДЕРЖАНИЕ ТБК-AКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТЕОАРТРОЗА И ДЛИТЕЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ МУЛЬТИПРОБИОТИКА

Исследовано действие мультипробиотика на содержание продуктов перекисного окисления липидов и антиоксидантных ферментов в сыворотке крови крыс при моноиодацетат-индуцированном остеоартрозе.

Исследования проведены на белых нелинейных половозрелых крысах-самцах массой 180–240 г с соблюдением общих этических принципов экспериментов на животных. Всех животных разделяли на четыре экспериментальные группы. Первая группа – контроль: животным в первый день вводили в коленную связку 0,05 мл 0,9 %-го раствора NaCl и ежедневно, на протяжении 14 суток, с 8-го по 22-й день вводили пергастрально 1 мл питьевой воды в перерасчете на 1 кг массы тела животного. Вторая группа – мультипробиотик: животным в первый день вводили в коленную связку 0,05 мл 0,9 %-го раствора NaCl и ежедневно, на протяжении 14 суток, с 8-го по 22-й день вводили пергастрально мультипробиотик "Симбистер®" ("Пролисок", Украина) в дозе 140 мг/кг, разведенный в 1 мл питьевой воды на 1 кг массы животного. Третья группа – модель остеоартроза: крысам в первый день вводили в коленную связку 1 мг моноиодацетата натрия, разведенного в 0,05 мл 0,9 %-го раствора NaCl, и ежедневно, на протяжении 14 суток, вводили пергастрально 1 мл питьевой воды в пересчете на 1 кг массы животного. Четвертая группа – остеоартроз + мультипробиотик: животным в первый день вводили в коленную связку 1 мг моноиодацетата натрия, растворенного в 0,05 мл 0,9 %-го раствора NaCl, и пергастрально – мультипробиотик в дозе 140 мг/кг, разведенный в 1 мл питьевой воды на 1 кг массы животного. Животных умертвляли на 30 сутки после начала эксперимента согласно протоколу этического комитета, после чего быстро делали забор крови. Содержание ТБК-активных соединений определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой. Супероксиддисмутазную активность оценивали по способности фермента конкурировать с нитросиним тетразолием за супероксидные радикалы. Каталазную активность измеряли по количеству неразрушенной перекиси водорода в пробе.

Установлено, что при моноиодацетат-индуцированном остеоартрозе в сыворотке крови крыс нарушается окислительно-антиоксидантное равновесие: увеличивается содержание ТБК-активных соединений, снижается супероксиддисмутазная и увеличивается каталазная активность. Показано, что при длительном введении мультипробиотика животным с моноиодацетат-индуцированным остеоартрозом вышеуказанные показатели восстанавливались.

Ключевые слова: моноиодацетат-индуцированный остеоартроз, мультипробиотик, ТБК-активные соединения, супероксиддисмутаза, каталаза, сыворотка крови.

A. Vovk, PhD stud.,
O. Korotkyi, PhD,
D. Yankovsky, stud.,
Ye. Torgalo, PhD,
K. Dvorshchenko, DSc
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

CONTENT OF TBA-ACTIVE COMPOUNDS AND ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES IN RAT SERUM UNDER EXPERIMENTAL OSTEOARTHRITIS AND LONG-TERM ADMINISTRATION OF MULTIPROBIOTIC

The aim of the study was to investigate the effect of multiprobiotics on the content of lipid peroxidation products and antioxidant enzymes in blood serum of rats during monoiodoacetate-induced osteoarthritis (MIA-induced OA).

The study was carried out on white non-linear, sexually mature male rats (weight 180-240g), according to general ethical principles of experiments on animals. All animals were divided into four experimental groups. The first group – Control: animals got injection into knee ligament 0.05 ml of 0.9 % NaCl solution on the first day of the experiment and then got intragastric administration 1 ml of drinking water per 1 kg of the animal weight daily for 14 days from the 8th to 22nd days. The second group – Multiprobiotic: animals got injection into knee ligament 0.05 ml of 0.9 % NaCl solution on the first day of the experiment and then got intragastric administration 140 mg / kg of multiprobiotic Symbiter® (Prolisok, Ukraine) diluted in 1 ml of drinking water per 1 kg of animal weight. The third group, MIA-induced OA: animals got injection into knee ligament 1 mg of sodium monoiodoacetate, dissolved in 0.05 ml of 0.9 % NaCl on the first day of the experiment and then got intragastric administration 1 ml of drinking water per 1 kg of the animal weight daily for 14 days from the 8th to 22nd days. The fourth group – MIA-induced OA + Multiprobiotic: animals got injection into knee ligament 0.05 ml of 1 mg of sodium monoiodoacetate, dissolved in 0.05 ml of 0.9 % NaCl on the first day of the experiment and then got intragastric administration 140 mg / kg of multiprobiotic diluted in 1 ml of drinking water per 1 kg of animal weight. All animals were killed on day 30 of the experiment, according to the protocol of the ethics committee with rapid blood sampling. The content of TBA-active compounds was determined by reaction with thiobarbituric acid. Superoxide dismutase activity was evaluated by the ability of the enzyme to compete with nitrosin tetrazolium for superoxide radicals. The catalase activity was measured by the amount of undiluted hydrogen peroxide in the samples.

It has been established that MIA-induced OA disturbed oxidative-antioxidant balance of the rat serum: the content of TBC-active compounds was increased, superoxide dismutase was reduced and catalase activity was increased. It was shown that with the long-term administration of multiprobiotics in animals with MIA-induced OA, the above indicators were restored.

Keywords: monoiodoacetate-induced osteoarthritis, multiprobiotic, TBA-active compounds, superoxide dismutase, catalase, blood serum.

УДК: 612.112.7:612.111.33:577.19

Л. Дяченко, асп.,
Л. Степченко, канд. біол. наук
Дніпровський державний аграрно-економічний університет, Дніпро, Україна

ЗМІНИ МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНИХ ПОКАЗНИКІВ КРОВІ ЩУРІВ НА ТЛІ ЗАСТОСУВАННЯ КОРМОВИХ ДОБАВОК ГУМІНОВОЇ ПРИРОДИ ТА ЗА ДІЇ СТРЕС-ФАКТОРІВ

Регуляція процесів життєдіяльності та підтримання функціональної лабільності організму відбувається за рахунок процесів адаптації, що реалізуються за участі нервової, ендокринної та імунної систем. У роботі представлені результати дослідження морфофункціональних показників крові щурів за впливу водно-імобілізаційного комбінованого стресу (ВІКС) і на тлі застосування природних антиоксидантів кормових добавок гумінової природи "Гумілід", "Еко Імпульс Анімал" та вітаміну Е. Дослідження проводили на білих статевозрілих молодих щурах-самцях на базі віварію. Тварин було поділено на 6 груп по 8 тварин у кожній. Перша група (контроль) – інтактні тварини. Щурам другої, третьої, четвертої, п'ятої та шостої груп моделювали ВІКС. На наступний день після моделювання ВІКС тварин другої групи виводили з експерименту, а щурам третьої, четвертої, п'ятої та шостої експериментальних груп воду, кормові добавки й вітамін Е вводили перорально за допомогою спеціального дозатора індивідуально впродовж 18 діб, після чого їх теж виводили з експерименту. Кров для досліджень відбирали із серця (правого шлуночка) під тіопенталовим наркозом у день виведення тварин з експерименту. За умов стресу спостерігалися достовірні зміни морфофункціональних показників крові щурів порівняно з інтактною групою. За впливу ВІКС спостерігали різке зниження кількості еритроцитів, вмісту гемоглобіну та гематокритного числа, що вказує на розвиток клітинної відповіді. На 18-ту добу після дії ВІКС відбувалася активація процесів адаптації, при цьому досліджувані показники кількості еритроцитів і вмісту гемоглобіну зростали порівняно з результатами в крові щурів на наступну добу після дії ВІКС, але залишались достовірно нижчими від значень у інтактних тварин. У крові тварин, які отримували низькомолекулярний антиоксидант – вітамін Е – у відновний період реєстрували повернення досліджуваних показників до референтних значень, що вказує на поліпшення стану щурів. Аналогічні результати були отримані у тварин, які впродовж 18 діб отримували природний антиоксидант – кормову добавку гумінової природи "Гумілід". Однак використання в той самий період кормової добавки гумінової природи "Еко Імпульс Анімал" не викликало виражених достовірних змін морфофункціональних показників у крові щурів порівняно з тваринами, які отримували очищену воду. Різниця в отриманих результатах впливу природних кормових добавок гумінової природи може бути пов'язана з біологічною активністю гумінових речовин, яка залежить від методу отримання цих добавок і якості вихідної сировини.

Ключові слова: еритроцити, "Гумілід", "Еко Імпульс Анімал", стрес.

Вступ. Регуляція процесів життєдіяльності та підтримання функціональної лабільності організму відбувається за рахунок процесів адаптації, які здійснюються за впливу нервової, ендокринної та імунної систем. Процеси адаптації реалізуються за допомогою відповідних функціональних систем. Вплив стрес-факторів різного генезу на живі організми може викликати загальні неспецифічні адаптаційні реакції, спрямовані на нормалізацію процесів гомеостазу, і залежать від типу, сили та тривалості дії стрес-факторів. Однак наслідки такого впливу (переактивація, неповноцінна адаптація, процеси перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) і формування активних форм кисню) створюють підґрунтя для розвитку тяжкого перебігу хвороб і розвитку їх хронічного стану.

Відомо, що активні форми кисню (АФК) здатні впливати на компоненти периферичної крові. Еритроцити, які привалюють серед інших клітин крові та мають велику площу клітинної мембрани, приймають на себе головну частину негативного впливу АФК у зв'язку з тим, що при окисненні двовалентного заліза в тривалентне відбувається додаткова генерація супероксидних радикалів, які є активаторами вільнорадикальних процесів на плазматичних мембранах і в цитозолі. При цьому відбувається порушення процесів транспорту газів через мембрану та втрата еритроцитами їх реологічних властивостей. Як наслідок відбувається прискорення процесів лізису еритроцитів у селезінці та кров'яному руслі (Chumakova et al., 2009; Dubinina, 2001).

Ураховуючи це, перспективним напрямом на сьогоднішній день є пошук природних речовин, здатних знижувати негативні наслідки окисного стресу й тим самим підвищувати неспецифічну резистентність і адаптаційну здатність організму тварин. Одним із основних антиоксидантів вважають вітамін Е, який є поліфункціональним, а саме може бути інгібітором АФК або ефективним перехоплювачем органічних радикалів, або активувати інші механізми окисного захисту. Вплив вітаміну Е на організм реалізується за рахунок

мембранопротекторних властивостей, які обумовлені здатністю реагувати з гідроксильним радикалом, інактивувати супероксидний радикал та інгібувати ланцюжкову реакцію перекисного окиснення мембранних ліпідів (Petrova and Donchenko, 2008).

Численні дослідження підтверджують, що гумінові кормові добавки та препарати на їх основі проявляють широкий спектр біологічної дії (Stepchenko, 2011; Griban et al., 2010; Yefimov, 2012, 2016), активують окисидантно-антиоксидантну систему у свійських і лабораторних тварин за рахунок підвищення активності СОД і каталази (Paronik et al., 2015; Skorik, 2006; Mihaylenko et al., 2017). При цьому можливим механізмом дії гумінових речовин може бути наявність у їхньому складі та транспорт у внутрішньому середовищі металів (Zn, Cu, Mn, Fe), які необхідні для формування активних центрів металопротеїнів (Mihaylenko et al., 2017). Крім того, гумінові речовини виявляють антиоксидантну властивість, тобто здатні нейтралізувати різні форми АФК шляхом прямої взаємодії (Fedko et al., 2005). Так, наявність карбоксильних груп у структурі гумінових речовин обумовлює їх участь у реакціях іонного обміну, гідроксильних груп – у комплексоутворенні, ароматичних фрагментів – в окисно-відновних, донорно-акцепторних і гідробонних взаємодіях.

Крім того, природні гумінові кормові добавки здатні швидко засвоюватись і включатись у метаболічні процеси організму, не мають токсичної дії, здатні підвищувати рівень резистентності організму тварин (Stepchenko and Skorik, 2006; Buchko, 2015).

Однак дані про вплив кормових добавок гумінової природи "Гумілід" та "Еко Імпульс Анімал" і вітаміну Е на морфофункціональні показники крові щурів за впливу комбінованого стресу відсутні. Тому **метою даного експерименту** є дослідження впливу кормових добавок "Гумілід" та "Еко Імпульс Анімал" і вітаміну Е на морфофункціональні показники крові щурів за впливу водно-імобілізаційного комбінованого стресу (ВІКС).

Матеріали і методи. Дослідження проводили на білих статевозрілих молодих щурах-самцях масою тіла 180–200 г на базі віварію. Упродовж усього експерименту щурів утримували в стандартних умовах, з вільним доступом до води та корму.

Тварин було поділено на шість груп по шість у кожній. Перша група (контроль) – інтактні тварини. Щурам другої, третьої, четвертої, п'ятої та шостої груп моделювали комбінований стрес. За основу було взято модель водно-імобілізаційного стресу (Weiner, 1996) у комбінації з елементами емоційного стресу (подовження світлового дня), за рахунок чого був досягнутий ефект комбінованого стресу.

Тварин другої групи виводили з експерименту на наступний день після моделювання комбінованого стресу. Тваринам третьої, четвертої, п'ятої та шостої експериментальних груп воду, кормові добавки та вітамін Е вводили перорально індивідуально за допомогою спеціального дозатора впродовж 18 діб, після чого тварин виводили з експерименту. Щурам третьої групи одноразово на добу додатково давали воду. Тварини четвертої групи отримували додатково до раціону водний розчин кормової добавки "Гумілід" (ТУ У 15.7-00493675004 2009), тварини п'ятої групи – додатково до раціону водний розчин кормової добавки "Еко Імпульс Animal" (ТУ У 10.9-00493675-008 2016) у розрахунку 5 та 2,5 мг/кг маси тіла, відповідно (Дяченко Л. М., Степченко Л. М., 2017). Тварини шостої групи отримували масляний розчин вітаміну Е в розрахунку 50 мг/кг маси тіла, виробник ПрАТ "Технолог", Україна (Belay et al., 2001).

Кров для досліджень відбирали із хвостової вени (на перший день експерименту) та із серця (правого шлуночка) під тиопенталовим наркозом (60 мкг/кг) у день виведення тварин з експерименту. У стабілізованій крові щурів визначали кількість еритроцитів, вміст гемоглобіну, гематокрит, кольоровий показник на автоматичному гематологічному аналізаторі Automated Veterinary Hematology Analyzer PCE 90Vet (США) на базі Науково-дослідного центру біобезпеки й екологічного контролю ресурсів АПКДДАЕУ. Також окремо було розраховано еритроцитарні коефіцієнти: середній об'єм еритроцита (MCV), MCH – середній вміст гемоглобіну в еритроциті, MCHC – середня концентрація гемоглобіну в еритроциті.

Усі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і наукових цілей (Страсбург, 1986).

Вірогідність різниць оцінювали за t-критерієм Стьюдента. Результати вважали вірогідними при $P \leq 0,05$.

Результати дослідження. Морфофункціональні показники крові щурів є важливими діагностичними ознаками, які тонко відображають реакцію організму на різні типи стресових подразників. Такі показники, як вміст гемоглобіну та кількість еритроцитів, кольоровий показник і гематокрит, еритроцитарні індекси дають змогу оцінити вплив гіпоксичного й окисного стану на морфофункціональні показники крові щурів.

На наступний день після моделювання водно-імобілізаційного комбінованого стресу (табл. 1) вміст гемоглобіну у тварин другої групи зменшувався на 29 % ($p < 0,001$) порівняно з першою групою тварин. На 18 добу після моделювання водно-імобілізаційного комбінованого стресу цей показник у тварин третьої групи, які отримували воду, був меншим на 10 % ($p < 0,01$) порівняно з тваринами інтактною групи. У щурів, які післястресовий період додатково до раціону впродовж 18 діб отримували кормові добавки "Гумілід", "Еко Імпульс Animal" та вітамін Е, вміст гемоглобіну був вищим на 43 ($p < 0,001$), 30 ($p < 0,001$) та 47 % ($p < 0,001$), відповідно, порівняно з цим значенням у тварин другої

групи, які не отримували в післястресовий період додатково до раціону біологічно активні добавки, і достовірно не відрізнявся від відповідних значень у інтактних тварин. Важливо зазначити, що вміст гемоглобіну у тварин четвертої та шостої груп на 18 добу додавання до раціону природної кормової добавки "Гумілід" і вітаміну Е зростав на 14 ($p < 0,01$) та 16 % ($p < 0,01$), відповідно, порівняно з тваринами третьої групи, тоді як у тварин п'ятої групи, що отримували у післястресовий період кормову добавку "Еко Імпульс Animal", достовірної різниці з тваринами третьої групи не виявлено.

Кількість еритроцитів у крові тварин другої групи зменшилась на 27 % ($p < 0,001$) порівняно зі щурами першої групи. На 18 добу після моделювання водно-імобілізаційного комбінованого стресу (група 3) кількість еритроцитів зменшувалась на 21 % ($p < 0,01$) порівняно зі щурами першої групи. Цей показник у крові тварин п'ятої групи, які післястресовий період додатково до раціону впродовж 18 діб отримували кормову добавку "Еко Імпульс Animal", вірогідно зменшувався на 20 % ($p < 0,01$) порівняно зі значеннями в інтактних тварин. Таке зменшення вмісту гемоглобіну може вказувати на можливе пригнічення процесів диференціювання й утворення еритроцитів. Також цей процес може супроводжуватись запуском процесів руйнування зрілих клітин крові на тлі зміни кислотно-лужного балансу. Підставою для таких змін може бути вплив ВІКС на організм щурів. У тварин четвертої та шостої експериментальних груп, які післястресовий період додатково до раціону впродовж 18 діб отримували кормову добавку "Гумілід" і вітамін Е, було виявлено достовірне зростання кількості еритроцитів відповідно на 20 ($p < 0,01$) та 19 % ($p < 0,01$) порівняно з тваринами другої групи, які не відрізнялись від контрольних значень.

У тварин другої групи після моделювання водно-імобілізаційного комбінованого стресу показник гематокриту зменшувався на 38 % ($p < 0,001$) порівняно зі щурами першої групи. На 18 добу у тварин третьої групи показник гематокриту був меншим на 20 % ($p < 0,001$) порівняно з інтактними щурами, що пояснюється зменшенням вмісту гемоглобіну та кількості еритроцитів у крові цих тварин, що вірогідно є наслідком негативного впливу ВІКС на організм щурів. Отже, післястресовий період тривалістю 18 діб не є достатнім для відновлення вмісту гемоглобіну, кількості еритроцитів і гематокритного числа до контрольних значень. Показник гематокриту у тварин четвертої та п'ятої груп, які отримували кормові добавки "Гумілід" та "Еко Імпульс Animal", вірогідно був нижчим на 9 ($p < 0,01$) і 17 % ($p < 0,01$), відповідно, порівняно з цим показником у тварин першої групи й перебував у межах референтних значень (Makarova et al., 2013). При цьому гематокритне число було достовірно вищим у тварин третьої, четвертої, п'ятої та шостої груп на 30 ($p < 0,001$), 48 ($p < 0,001$), 35 ($p < 0,001$) та 51 % ($p < 0,001$), відповідно, порівняно з тваринами другої групи. У тварин четвертої та шостої експериментальних груп, які післястресовий період додатково до раціону впродовж 18 діб отримували кормову добавку "Гумілід" і вітамін Е, показник гематокриту був відповідно вищим на 14 ($p < 0,01$) та 16 % ($p < 0,05$) порівняно з тваринами третьої групи. Отже, вищий вміст гемоглобіну та гематокритного числа у крові щурів четвертої й шостої груп підтверджує позитивний вплив кормової добавки "Гумілід" і вітаміну Е на дихальну функцію крові, процеси синтезу гемоглобіну та диференціації клітин крові. Проте використання кормової добавки "Еко Імпульс Animal" у післястресовий період (18 діб) не викликало достовірної різниці кількості еритроцитів, вмісту гемоглобіну та гематокритного числа з показниками в крові тварин, які отримували впродовж цього періоду воду (третья група).

Кольоровий показник характеризує насиченість еритроцитів гемоглобіном і був у тварин усіх експериментальних груп у межах норми (Makarova et al., 2013). При цьому у тварин шостої групи кольоровий показник достовірно збільшувався на 5 % ($p < 0,05$) порівняно зі щу-

рами першої дослідної групи та на 4 % ($p < 0,05$) – порівняно зі щурами третьої дослідної групи. Отже, використання вітаміну Е у післястресовий період впливає на співвідношення гемоглобіну до еритроцитів (табл. 1).

Таблиця 1. Гематологічні показники периферичної крові щурів за умов стресу й додаткового використання кормових добавок гумінової природи та вітаміну Е ($M \pm m$, $n=6$)

Групи	Гемоглобін, г/л	Еритроцити, $10^{12}/л$	Гематокрит, %	Кольоровий показник, од.
Група 1 (інтактні)	102,00 $\pm$ 2,130	6,64 $\pm$ 0,209	38,44 $\pm$ 0,341	0,955 $\pm$ 0,009
Група 2 (ВІКС)	72,80 $\pm$ 1,432 ***	4,88 $\pm$ 0,102 ***	23,68 $\pm$ 0,992 ***	0,998 $\pm$ 0,018 *
Група 3 (ВІКС + очищена вода)	91,80 $\pm$ 1,432 **###	5,02 $\pm$ 0,267 **	30,78 $\pm$ 0,417 ***###	0,958 $\pm$ 0,004 #
Група 4 (ВІКС + "Гумілід")	104,20 $\pm$ 1,481 ###°	5,88 $\pm$ 0,089 ##°	35,10 $\pm$ 0,417 ***###°	0,964 $\pm$ 0,012
Група 5 (ВІКС + "Еко Імпульс Animal")	94,80 $\pm$ 1,757 *###	5,32 $\pm$ 0,055 *	32,04 $\pm$ 0,753 ***###	0,968 $\pm$ 0,010
Група 6 (ВІКС + вітамін Е)	106,80 $\pm$ 2,401 ###°°	5,80 $\pm$ 0,124 *##°°	35,76 $\pm$ 0,970 *###°°	1,00 $\pm$ 0,009 *

Тут і далі: * – різниця вірогідна порівняно з контролем, $p < 0,05$; ** – різниця вірогідна порівняно з контролем, $p < 0,01$; *** – різниця вірогідна порівняно з контролем, $p < 0,001$;

– різниця вірогідна порівняно з другою групою, $p < 0,05$; ## – різниця вірогідна порівняно з другою групою, $p < 0,01$; ### – різниця вірогідна порівняно з другою групою, $p < 0,001$;

° – різниця вірогідна порівняно з третьою групою, $p < 0,05$; °° – різниця вірогідна порівняно з третьою групою, $p < 0,01$; °°° – різниця вірогідна порівняно з третьою групою, $p < 0,001$

Значення середнього об'єму еритроцитів (MCV) у тварин експериментальних груп (табл. 2) було в межах норми (Makarova et al., 2013). Зміни значення MCV можуть характеризувати порушення водно-електролітного балансу й дати можливість точніше визначити розмір еритроцитів. Так, у тварин другої та третьої груп середній корпускулярний об'єм збільшився на 8 ($p < 0,001$) та 2 % ($p < 0,01$) порівняно з першою групою. Можливо, наслідком впливу стрес-факторів на еритроцитарну систему в щурів є розвиток незначного макроцитозу. Такі зміни можуть порушувати процеси мікроциркуляції, оскільки клітини з великим об'ємом здатні уповільнювати швидкість току крові та процеси транспорту кисню до тканин.

МСН (середній вміст гемоглобіну в еритроциті) відображає абсолютний вміст гемоглобіну в одному еритроциті. За літературними джерелами МСН варіюється у межах 15,0–22,0 пг (Makarova et al., 2013). МСН у всіх тварин експериментальних груп не виходять за межі контрольних значень (Makarova et al., 2013). При цьому МСН достовірно збільшувався у тварин другої та шос-

тої дослідних груп відповідно на 6 ($p < 0,001$) та 5 % ($p < 0,05$) порівняно зі щурами першої дослідної групи.

Аналізуючи морфофункціональні показники крові щурів другої групи, ми встановили, що на тлі впливу водно-імобілізаційного комбінованого стресу спостерігається зростання MCV та МСН із паралельним зменшенням вмісту гемоглобіну та кількості еритроцитів, тобто в організмі тварин, яким моделювали водно-імобілізаційний комбінований стрес, порушувались процеси дихання, які супроводжувались можливою загибеллю клітин еритроцитів і активацією адаптивних процесів, які спрямовані на компенсацію завданої шкоди.

Значення МСНС (середня концентрація гемоглобіну в еритроциті) – це істинний показник дефіциту заліза в організмі, він може вказувати на порушення засвоєння заліза еритроцитами, що може бути пов'язано зі зменшенням кількості еритроцитів. Відомо, що норми для МСНС для лабораторних щурів дорівнює 30,0–35,0 % (Makarova et al., 2013). За даними МСНС у щурів усіх дослідних груп перебувають у межах референтних значень.

Таблиця 2. MCV, МСН, МСНС за умов стресу й додаткового використання кормових добавок гумінової природи та вітаміну Е ($M \pm m$, $n=5$)

Група	MCV, фл(10-15/л)	МСН, пг(10-12г)	МСНС, %
Група 1 (інтактні)	57,85 $\pm$ 0,219	17,57 $\pm$ 0,156	30,38 $\pm$ 0,289
Група 2 (ВІКС)	62,81 $\pm$ 0,539 ***	18,65 $\pm$ 0,193 ***	29,69 $\pm$ 0,081
Група 3 (ВІКС+18 діб вода)	59,05 $\pm$ 0,080 *###	17,63 $\pm$ 0,109	29,85 $\pm$ 0,061 ##
Група 4 (ВІКС+18 діб "Гумілід")	59,78 $\pm$ 0,779 ##	17,74 $\pm$ 0,214	29,68 $\pm$ 0,113
Група 5 (ВІКС+18 діб "Еко Імпульс Animal")	60,15 $\pm$ 0,879 #	17,81 $\pm$ 0,171 ##	29,63 $\pm$ 0,232 #
Група 6 (ВІКС+18 діб вітамін Е)	61,65 $\pm$ 0,979 *	18,42 $\pm$ 0,170 *	29,91 $\pm$ 0,252

Тут і далі: * – різниця вірогідна порівняно з контролем, $p < 0,05$; ** – різниця вірогідна порівняно з контролем, $p < 0,01$; *** – різниця вірогідна порівняно з контролем, $p < 0,001$;

– різниця вірогідна порівняно з другою групою, $p < 0,05$; ## – різниця вірогідна порівняно з другою групою, $p < 0,01$; ### – різниця вірогідна порівняно з другою групою, $p < 0,001$;

° – різниця вірогідна порівняно з третьою групою, $p < 0,05$; °° – різниця вірогідна порівняно з третьою групою, $p < 0,01$; °°° – різниця вірогідна порівняно з третьою групою, $p < 0,001$

На 18 добу після моделювання водно-імобілізаційного комбінованого стресу спостерігали підвищення вмісту гемоглобіну, кількості еритроцитів і значень MCV та MCH у крові тварин третьої групи порівняно зі щурами другої групи, це можна пояснити можливою активацією процесів адаптації та відновлення гомеостазу організму. Слід також зауважити, що за вказаний період (18 діб) процеси адаптації та нейтралізації впливу водно-імобілізаційного комбінованого стресу, можливо, проходили таким чином, що повного повернення досліджуваних показників до нормальних значень не відбувалося.

Результати аналізу крові тварин четвертої та шостої груп, які отримували кормову добавку "Гумілід" і вітамін Е, відповідно, упродовж 18 діб адаптації, указують на покращення стану щурів і повернення досліджуваних показників до нормальних значень. Вітамін Е – відомий низькомолекулярний антиоксидант із мембранно-клітинними протективними властивостями. "Гумілід" може виявляти свої властивості як оксидант не лише за рахунок прямої взаємодії, а й опосередковано, використовуючи оксидантно-антиоксидантні властивості організму. Отже, сукупно ці властивості сприяють більш ефективному усуненню наслідків впливу стрес-факторів на організм щурів і нормалізації гомеостазу, що відображають морфофункціональні показники крові.

У попередніх дослідженнях нами було встановлено, що використання у достресовий період кормової добавки "Еко-імпульс Анімал" має схожий ефект на еритроцитарну систему щурів, у порівнянні з кормовою добавкою "Гумілід" (Diachenko and Stepchenko, 2018). Однак, використання кормової добавки "Еко-імпульс Анімал" у післястресовий період, не проявляло виражених протективних властивостей на еритроцитарну систему щурів та достовірно не відрізнялося від значень у тварин третьої групи, які отримували після дії ВІКС очищену воду.

Висновки.

1. За впливу водно-імобілізаційного комбінованого стресу було встановлено достовірне зменшення вмісту гемоглобіну на 29 % ($p < 0,001$), кількості еритроцитів – на 27 % ($p < 0,001$), гематокритного числа – на 38 % ($p < 0,001$), відповідно, порівняно з інтактними тваринами.

2. Адаптаційний період (18 діб) після дії водно-імобілізаційного комбінованого стресу викликав зменшення вмісту гемоглобіну на 10 % ($p < 0,01$), кількості еритроцитів – на 21 % ($p < 0,01$), гематокритного числа – на 20 % ($p < 0,001$), відповідно, порівняно з інтактними тваринами.

3. Застосування природного антиоксиданту, кормової добавки "Гумілід", на 18 добу після дії ВІКС викликало достовірне зростання вмісту гемоглобіну на 43 % ($p < 0,001$), кількості еритроцитів – на 20 % ($p < 0,01$), показника гематокритного числа – на 48 % ($p < 0,001$), відповідно, порівняно з тваринами другої групи. При цьому у тварин четвертої групи було зареєстровано достовірне зростання вмісту гемоглобіну та показника гематокритного числа на 14 % ($p < 0,01$) порівняно з тваринами третьої групи, які після дії водно-імобілізаційного комбінованого стресу отримували очищену воду.

4. Використання в післястресовий період (18 діб) кормової добавки "Еко Імпульс Анімал" не викликало виражених змін морфофункціональних показників у крові щурів, що достовірно не відрізнялись від значень у тварин третьої групи, які після дії водно-імобілізаційного комбінованого стресу отримували очищену воду.

Список використаних джерел:

- Белай И. М. Исследование гипополипидемических и антиоксидантных свойств пикамила и карнитинахлорида / И. М. Белай, В. В. Дунаев, В. С. Тишкин // Укр. ревматолог. журн. – 2001. – № 1(3) / – С. 21-25.
- Бучко О. М. Иммунологичні та гематологічні показники крові свиней за дії гумінової добавки і аскорбінової кислоти / О. М. Бучко // Young Scientist. – 2005. – № 2(17). – С. 25–28.
- Щодо ефективності використання гумінових препаратів у скортарстві та механізми їх дії на організм / В. Г. Грибан, В. Г. Єфімов, В. М. Ракитянський та ін. // Наук. вісн. ЛНУВМБТ імені С. З. Гжицького. – 2015. – Т. 17. – № 3(63).
- Дубинина О. Я. Оксидативний стрес і оксидативна модифікація білків / О. Я. Дубинина // Мед. хімія. – 2001. – № 3(2). – С. 5–12.
- Дяченко Л. М. Стан еритроцитарної системи у крові щурів на тлі застосування кормових добавок гумінової природи за впливу комбінованого стресу / Л. М. Дяченко, Л. М. Степченко // Наук.-техн. бюлетень НДЦ біобезпеки та екол. контролю ресурсів АПК. – 2018 (подано до друку).
- Єфімов В. Г. Вплив гумінових речовин на мінеральний обмін у корів / В. Г. Єфімов, В. М. Ракитянський // Наук.-техн. бюлетень НДЦ біобезпеки та екол. контролю ресурсів АПК. – 2012. – Т. 1, № 1. – С. 66.
- Єфімов В. Г. Вплив подавання обробленого торфу як добавки на показники клітинного імунітету, антиоксидантного статусу та продуктивності поросят у ранньому після відлучення періоді / В. Г. Єфімов, К. М. Костішків, В. М. Ракитянський // Human and Veterinary Medicine. – 2016. – № 8(3). – С. 133–136.
- Михайленко Є. О. Протеїновий та амінокислотний обмін у м'язах курчат-бройлерів кросу КОББ 500 на тлі застосування кормової добавки "Гумілід" / Є. О. Михайленко, О. О. Дьомшина, Л. М. Степченко // Наук. вісн. Львів. нац. ун-ту ветеринарної медицини та біотехнології імені С. З. Гжицького. – 2017. – Т. 19. – № 77.
- Вплив корвітину та гуміліду на стан оксидантно-антиоксидантної системи щурів на фоні введення адреналіну / В. А. Паронік, Л. М. Степченко, Л. М. Дяченко та ін. // Біологія тварин. – 2015. – Т. 17, № 4. – С. 109–114.
- Петрова Г. В. Роль α -токоферолу в оксидативному стресі тимцитів крысы, индуцированном пероксидом водорода и менадином / Г. В. Петрова, Г. В. Донченко // Укр. біохім. журн. – 2008. – Т. 80, № 3.
- Скорік М. В. Взаємозв'язок глутатіонного обміну параметрів крові курей-несучок на тлі худрохумату / М. В. Скорік, Л. М. Степченко // Veterinary medicine. – 2006. – № 86. – С. 292–297.
- Stepchenko L. Condition of erythrocyte antioxidant laying hens for the actions of humic substances / L. Stepchenko, M. Skorik // Technical bulletin Scientific Institute of Animal Biology and State research control institute of veterinary preparations and feed additives. – 2006. – Vol. 7, № 3, 4. – С. 137–143.
- Федько И. В. К вопросу об использовании биологически активных гуминовых веществ в медицине / И. В. Федько, М. В. Гостищева, Р. Р. Исмазова // Химия растительного сырья. – 2005. – № 1. – С. 49–52.
- Чумакова А. С. Изменения свободнорадикальных процессов в различных организмах крыс разного возраста при остром стрессе / А. С. Чумакова, Д. Л. Теплий, Я. В. Нестерова // Биолог. исследования. – 2009. – № 4. – С. 34–37.
- Makarova V. G. Physiological, biochemical and biometric indices of the norm of experimental animals / V. G. Makarova // Directory. – SPB. : Publishing house "LEMA", 2013.
- Stepchenko L. M. Biologically active substances humic nature as regulators of homeostasis of poultry / L. M. Stepchenko // Collection of conference materials. "Radostim, 2011". – Minsk, 2011. – С. 164–166.
- Weiner H. Use of animal models in peptic ulcer disease / H. Weiner // PsychosomMed. – 1996. – Vol. 58, № 6. – P. 524–545.

References

- Belay IM, Tishkin VS. Investigation of hypolipidemic and antioxidant properties of picamilon and carnitine chloride. Ukrainian Rheumatological Journal. 2001;1(3):21-25.
- Buchko OM. Immunological and hematological parameters of blood of pigs for action of humic additive and ascorbic acid. Young Scientist. 2005; 2 (17):25-28.
- GribanVG, EfimovVG, RakyatinskyVM[et al.]. On the Effectiveness of the Use of Humene Preparations in Animal Husbandry and the mechanism of their effect on the organism. Scientific Bulletin of LNUVMBT named after SZ Gzhysky. 2015; 17(3):63
- Dubinina OY. Occasional stress and occidental modification of proteins. Medicine chemistry. 2001; 3 (2):5-12
- Dyachenko LM, Stepchenko LM. The state of the erythrocytic system in the blood of rats against the background of the use of feed additives of humic nature under the influence of combined stress. Scientific and technical bulletin of NDC of biosafety and ecology. control of the resources of the agroindustrial complex. Forthcoming 2018
- Efimov VG, RakyatinskyVM. Influence of humic substances on mineral exchange in cows. Scientific and technical bulletin of NDC of biosafety and ecology. control of the resources of the agroindustrial complex. 2012; 1(1):66

7. Efimov VG, Kostyshkevich KM, Rakytansky VM. Influence of supply of treated peat as additive on cellular immunity, antioxidant status and piglet productivity in early postpartum period. Human and Veterinary Medicine. 2016; 8 (3):133-136.
8. Mikhaileiko EO, Domshina OO, Stepchenko LM. Protein and amino acid exchange in the muscles of broiler chickens COBB 500 cross with the use of the feed supplement "Gumilid". Scientific Bulletin of the Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnology named after SZ Gzhytsky. 2017; 19(77):110. doi.org/10.15421/nvivet7725
9. Paronik VA, Stepchenko LM, Dyachenko LM, [et al.]. Influence of corvetane and humidine on the state of the oxidative-antioxidant system of rats on the background of adrenaline introduction. Biology of animals. 2015; 17(4):109-114.
10. Petrova GV, Donchenko GV. The role of α -tocopherol in the oxidative stress of thymocytes in rat induced by hydrogen peroxide and menadion. Ukr. Biochemical Journal. 2008; 80(3)
11. Skorik. MV, Stepchenko LM. Interconnection of glutathione exchange of parameters of blood of hens-bearers against the background of a wormhormat. Veterinary medicine. 2006; 86:292-297.
12. Stepchenko LM, Skorik. MV. Condition of erythrocyte antioxidant laying hens for the actions of humic substances. Technical bulletin Scientific Institute of Animal Biology and the State Research Control Institute of Veterinary Preparations and Feed Additives. 2006: 7(3.4.):137-143.

13. Fedko IV, Goshchevaya MV, Ismatova RR. On the Use of Biologically Active Humic Substances in Medicine. Chemistry of vegetable raw materials. 2005; 1:49-52
14. Chumakova AC, Warm DL, Nesterova Ya V. Frequencies of free radical processes in different organisms of rats of different ages under acute stress. Biologicheskii issledovaniya. 2009; 4:34- 37.
15. Makarova V.G. Physiological, biochemical and biometric indices of the norm of experimental animals. Directory SPB : Publishing house "LEMA"; 2013. p.116.
16. Stepchenko L.M. Biologically active substances of humic nature as regulators of homeostasis of poultry. Collection of conference materials. Radostim 2011. Minsk 2011: 164-166.
17. Weiner H. Use of animal models in peptic ulcer disease. Psychosom Med. 1996; 58(6):524 – 545.

Надійшла до редколегії 2.10.2018
Отримано виправлений варіант 1.11.2018
Підписано до друку 1.11.2018

Received in the editorial 2.10.2018
Received a revised version on 1.11.2018
Signed in the press on 1.11.2018

Л. Дяченко, асп.,

Л. Степченко, канд. биол. наук

Днепропетровский государственный аграрно-экономический университет, Днепро, Украина

ИЗМЕНЕНИЯ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ КРЫС НА ФОНЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОРМОВЫХ ДОБАВОК ГУМИНОВОЙ ПРИРОДЫ И ПОД ВЛИЯНИЕМ СТРЕСС-ФАКТОРОВ

Регуляция процессов жизнедеятельности и поддержания функциональной лабильности организма происходит за счет процессов адаптации при участии нервной, эндокринной и иммунной систем. В работе представлены результаты исследования морфофункциональных показателей крови крыс при воздействии водно-иммобилизационного комбинированного стресса (ВИКС) и на фоне применения натуральных антиоксидантов кормовых добавок гуминовой природы "Гумилид", "Эко Импульс Animal" и витамина Е. Исследование проводили на белых половозрелых молодых крысах-самцах на базе вивария. Животные были разделены на 6 групп по 8 животных в каждой. Первая группа (контроль) – интактные животные. Крысам второй, третьей, четвертой, пятой и шестой групп моделировали ВИКС. На следующий день после моделирования ВИКС животных второй группы выводили из эксперимента, а крысам третьей, четвертой, пятой и шестой экспериментальных групп воду, кормовые добавки и витамин Е вводили перорально с помощью специального дозатора индивидуально в течение 18 суток, после чего их тоже выводили из эксперимента. Кровь для исследования отбирали из сердца (правого желудочка) под тиопенталовым наркозом в день вывода животных из эксперимента. В условиях стресса наблюдались достоверные изменения морфофункциональных показателей крови крыс по сравнению с интактной группой животных. Под влиянием ВИКС наблюдали резкое снижение количества эритроцитов, содержания гемоглобина и гематокритного числа, что указывает на развитие клеточного ответа. На 18-й день после действия ВИКС происходила активация процессов адаптации, при этом исследуемые показатели количества эритроцитов и содержания гемоглобина росли по сравнению с результатами в крови крыс на следующие сутки после воздействия ВИКС, но оставались достоверно ниже значений у интактных животных. В крови животных, получавших низкомолекулярный антиоксидант – витамин Е – в восстановительный период регистрировали возращение исследуемых показателей к референтным значениям, что указывает на улучшение состояния крыс. Аналогичные результаты были получены у животных, которые в течение 18 суток получали природный антиоксидант – кормовую добавку гуминовой природы "Гумилид". Однако использование в этот же период кормовой добавки гуминовой природы "Эко Импульс Animal" не вызывало выраженных достоверных изменений морфофункциональных показателей в крови крыс по сравнению с животными, получавшими очищенную воду. Разница в полученных результатах воздействия природных кормовых добавок гуминовой природы может быть связана с биологической активностью гуминовых веществ, которая зависит от метода получения этих добавок и качества исходного сырья.

Ключевые слова: эритроциты, "Гумилид", "Эко Импульс Animal", стресс.

L. Diachenko, PhD stud.,

L. Stepchenko, PhD

Dnipro state agrarian and economic university, Dnipro, Ukraine

CHANGES OF MORPHO-FUNCTIONAL INDICATORS IN BLOOD OF RATS AFTER THE INFLUENCE OF FEED ADDITIVES OF HUMIC NATURAL AND FOR ACTIONS OF STRESS FACTORS

The regulation of vital functions and maintenance of the functional lability of the organism occurs due to the adaptation processes that are implemented with the participation of the nervous, endocrine and immune systems. The results of the study of morpho-functional parameters of blood of rats for the actions of water-immobilization combined stress (VICS) and after the influence of natural antioxidants of feed additives of humic nature "Gumilid", "Eco-Impulse Animal" and vitamin E. The research was conducted on white sex- mature young male rats based on vivarium. Animals were divided into 6 groups of 8 animals each. Group 1 (control) – intact animals. Rats 2,3,4,5, and 6 groups were modeled by VICS. The following day, after the simulation of VICS of animals, 2 groups were withdrawn from the experiment, and 3,4,5 and 6 experimental rats, water, feed additives and vitamin E were administered orally with a special dosage unit individually for 18 days, after which they were also withdrawn from the experiment. Blood for research was taken from the heart (right ventricle) under thiopental anesthesia on the day the animals were removed from the experiment. Under conditions of stress, there were significant changes in the morpho-functional parameters of blood in rats, compared with the intact group of animals. A sharp decrease in the concentration of erythrocytes, hemoglobin and hematocrit content indicates the possible development of the cellular response to the effects of VICS. The recovery period (18 days) after the action of VICS caused the activation of adaptation processes, while the studied parameters remained significantly lower than those in intact animals. In the blood of animals receiving the feed supplement "Gumilide" and vitamin E in the recovery period, they indicate an improvement in the condition of the rats and the return of the studied parameters to the reference values. On the contrary, the use of the feed supplement "Eco Impulse Animal" during this period did not cause marked changes in the morphological and functional parameters in the blood of rats compared with animals that received purified water.

Key words: Erythrocytes, Gumilid, Eco Impulse Animal, stress.

УДК 577.352.4:616.36-018-092.9

О. Наконечна, д-р мед. наук
Харківський національний медичний університет, Харків, Україна,
А. Безродна, асп.
К. Кривонос, канд. мед. наук, асист.
Харківський національний медичний університет, Харків, Україна,
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Харків, Україна

ВПЛИВ БЛОКСОПОЛІМЕРІВ НА РЕГУЛЯЦІЮ Й ОСНОВНІ ПОКАЗНИКИ БІЛКОВОГО ТА ВУГЛЕВОДНОГО ОБМІНУ В ЩУРІВ В УМОВАХ ПІДГОСТРОГО ТОКСИКОЛОГІЧНОГО ЕКСПЕРИМЕНТУ

У процесі підгострого токсикологічного експерименту вивчено вплив групи блоксополімерів (БП) у складі поліетиленгліколю (ПЕГ-400), поліпропіленгліколю (ППГ) та етиленгліколю (ЕГ) на основні показники вуглеводного і білкового обміну та їх регуляцію в організмі щурів. За результатами досліджень визначено, що зазначені ксенобіотики (КБ) у дозах 1/10 та 1/100 ДЛ₅₀ порушують регуляцію вуглеводного й білкового обміну та їх основні показники. Дослідженнями вмісту гормонів, які регулюють білковий і вуглеводний обмін, у крові щурів виявлено зниження інсуліну, тестостерону та естрадіолу. Аналіз вмісту інсуліну виявив його зниження в сироватці крові за умов впливу ПЕГ-400 у дозах 1/10 та 1/100 ДЛ₅₀ на 54 і 38 %, відповідно. За умов впливу ППГ вміст інсуліну знижувався на 51 і 30 % залежно від дози. Токсифікація щурів ЕГ сприяла зниженню вмісту інсуліну на 59 і 44 %. Вміст тестостерону в самців щурів знижувався на 52 та 41 % за умов впливу поліетиленгліколю в дозах 1/10 та 1/100 ДЛ₅₀, відповідно, а естрадіолу в самиць – на 47 та 42 %. Токсифікація щурів ксенобіотиком ППГ у дозах 1/10 та 1/100 ДЛ₅₀ спричинила також зниження тестостерону на 34 та 25 %, а естрадіолу – на 33 та 28 % відповідно для самців і самиць. Щодо оцінювання вмісту статевих гормонів за умов впливу найбільш токсичного ксенобіотика ЕГ, то зміни, які спостерігалися, були найсуттєвішими, а саме: вміст тестостерону знижувався на 71 та 57 % за умов впливу ЕГ у дозах 1/10 та 1/100 ДЛ₅₀, відповідно, а естрадіолу – на 64 та 58 %.

Дослідженнями моніторингових показників вуглеводного та білкового обміну в організмі щурів під впливом ксенобіотиків виявлено зниження в крові глюкози та лактату. Оцінка моніторингових показників білкового обміну під впливом ПЕГ-400, ППГ та ЕГ засвідчила зниження загального білка й сечовини на тлі підвищення креатиніну.

Результати підгострого токсикологічного експерименту достовірно доводять наявність порушення білкового і вуглеводного обміну та їх регуляції в організмі щурів під впливом досліджуваних ксенобіотиків.

Ключові слова: ксенобіотики, токсифікація, регуляція, білковий обмін, вуглеводний обмін.

Вступ. Блоксополімери (БП) на основі оксипропілену та етилену широко використовуються практично в усіх галузях господарства країни, а постійно зростаючий асортимент косметичних і миючих засобів, пральних порошків і сучасних будівельних матеріалів для оздоблення квартир для населення обумовлює агресивне проникнення цих ксенобіотиків (КБ) до середовища перебування людини [1, 2]. Зростаючий вплив на організм КБ змінює його стійкість та імунологічну реактивність, оскільки за літературними даними (у т. ч. авторів публікації) цей клас хімічних речовин володіє радіоміметичними та мембранотропними властивостями, викликає в організмі широкий спектр порушень, підвищує інтенсивність вільнорадикального перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), що може призвести до дисбалансу основних регуляторних систем (нервової, ендокринної, імунної) [3]. Недостатнє інформування населення щодо впливу побутової хімії на організм людини сприяє збільшенню захворюваності різних груп населення на безпліддя, ожиріння, вади розвитку, рак, оскільки доведено, що КБ як ендокринні руйнівники (ЕР) призводять до порушення функції ЦНС, щитоподібної залози, обміну речовин, гомеостазу тощо [4]. Епігенетичні зміни за умов впливу КБ відіграють ключову роль у диференціюванні клітин упродовж життя й у період ембріогенезу, оскільки дані хімічні речовини можуть суттєво впливати на експресію генів у всіх тканинах організму [5]. На рівні популяції це матиме наслідки для розвитку спектра патологічних станів, які об'єднані під однією етіологією й називаються екопатологічними захворюваннями [6]. У результаті створено реальну небезпеку для здоров'я широких верств населення.

Зокрема, в експериментальних роботах вітчизняних учених розкриті питання впливу різних класів КБ на прикладі оксигетильованих алкілфенолів на гормональний обмін білих щурів. Доведено, що ці речовини впливають на порушення з боку ендокринної системи на всіх рівнях її структурно-функціональної організації (гіпоталамус – гіпофіз – наднирники) [7].

В основі механізму дії КБ як ЕР лежить їх властивість специфічно з'єднуватися як ліганди з гормональними рецепторами клітин, які відповідають на ці сигнали гормоноподібними ефектами [8, 9], тобто ЕР грають роль псевдогормонів, оскільки викликані ними гормональні ефекти фізіологічно не обумовлені. З огляду на можливість постійного надходження КБ із водою, повітрям, продуктами харчування й акумуляції їх у клітинах і тканинах живих організмів, створюються умови для їх тривалої дії, що замінює цілеспрямоване виділення власних гормонів. ЕР можуть виступати як системні нейроендокринні та імунні забруднювачі, істотно порушуючи перебіг регуляторних процесів у організмі тварин і людини [10].

Учені, які розробляють медико-біологічні аспекти проблеми КБ, зазначають, що глибокі механізми метаболічних порушень виникнення та розвитку широкого спектра патологій унаслідок шкідливого впливу цього класу блоксополімерів на організм потребують постійного всебічного дослідження як у плані поглиблення, так і з метою вивчення нових класів ксенобіотиків [11].

Метою цього дослідження є вивчення впливу групи блоксополімерів у складі поліетиленгліколю, поліпропіленгліколю та етиленгліколю на регуляцію й основні показники вуглеводного і білкового обміну в організмі щурів за умов підгострого токсикологічного експерименту.

Матеріали та методи дослідження. Дослідження проведено на 70 білих щурах обох статей популяції WAG. Тварини перебували у стандартних умовах віварію. Тварин поділили на сім експериментальних груп: контрольну та шість дослідних по десять тварин у кожній. Розрахунок необхідної дози ксенобіотиків для підгострого експерименту здійснювали, виходячи з даних про параметри гострої токсичності [12]: 1/10 та 1/100 від середньолетальної дози (ДЛ₅₀) досліджуваних речовин відповідно становили для ПЕГ-400 2,89 та 0,289 г/кг маси тіла щурів, ППГ – 3,25 та 0,325 г/кг, ЕГ – 0,55 та 0,055 г/кг. Водні розчини КБ щодня натщесерце внутрішньожелудково вводились дозою 1/10 та 1/100 ДЛ₅₀ за допомогою

металевого зонда протягом 45 діб. Контрольна група тварин отримувала відповідні об'єми питної води.

Після закінчення 45-денного підгострого токсикологічного експерименту щурів виводили з нього відповідно до Міжнародних рекомендацій щодо проведення медико-біологічних досліджень із використанням лабораторних тварин шляхом цервікальної дислокації із застосуванням гільйотини згідно із затвердженими інструкціями та законодавчими актами.

Після закінчення експерименту в сироватці крові визначали вміст основних показників вуглеводного (глюкози, лактату) і білкового обміну (сечовини, креатиніну, загального білка), а також гормонів, які їх регулюють – вміст інсуліну, тестостерону й естрадіолу.

Вміст загального білка в крові визначали за допомогою біуретової реакції [13]. Принцип методу: білки реагують у лужному середовищі із сіркокислою міддю з утворенням сполук фіолетового кольору.

Вміст креатиніну в сироватці крові та сечі визначали спектрофотометричним методом за допомогою набору реактивів "Філісіт-Діагностика" (Дніпро, Україна). Принцип методу заснований на тому, що пікринова кислота взаємодіє в лужному середовищі з креатиніном з утворенням продукту червоного кольору [14].

Вміст сечовини в сироватці крові та сечі визначали діацетилмонооксидним методом за допомогою набору реактивів "Філісіт-Діагностика" (Дніпро, Україна). Принцип методу заснований на тому, що сечовина утворює з діацетилмонооксидом у присутності іонів заліза (III) та тіосемікарбазиду комплекс червоного кольору, за інтенсивністю забарвлення якого визначали її концентрацію [13].

Концентрацію глюкози в сироватці крові визначали глюкозооксидазним методом з використанням наборів реактивів фірми АТ "Реагент" (Україна, Дніпро). Принцип методу: глюкоза окиснюється під дією глюкозооксидази киснем повітря з утворенням гідрогену пероксиду, який у присутності фенолу з 4-аміноантипірином формує забарвлену сполуку [13].

Концентрацію лактату в сироватці крові визначали ензиматичним колориметричним методом. Принцип методу: молочна кислота взаємодіє з киснем за дії лактатоксидази з утворенням піривату та пероксиду водню. Останній з 4-аміноантипірином і п-хлорфенолом під дією пероксидази утворює хіноніміновий забарвлений продукт.

Вміст естрадіолу й тестостерону в сироватці крові визначали методом імуноферментного аналізу за допомогою наборів реактивів фірми ООО "ХЕМА" (РФ): "Естрадіол-ИФА", "Тестостерон-ИФА". Вміст інсуліну визначали методом імуноферментного аналізу за допомогою наборів реактивів фірми "EIA-2048 Insulin Elisa" (США). Дослідження проведені на біохімічному аналізаторі "Lab Line-80" (Австрія). Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням пакету програм Statistic 6.0.

Результати досліджень та їх обговорення. За результатами досліджень вмісту гормонів, які регулюють білковий і вуглеводний обмін, за умов впливу досліджуваних ксенобіотиків ПЕГ-400, ППГ та ЕГ у дозах 1/10 та 1/100 ДЛ₅₀ було виявлено зниження інсуліну, тестостерону й естрадіолу в крові щурів (табл. 1).

Таблиця 1. Вміст гормонів в умовах тривалої субтоксичної дії ПЕГ-400, ППГ та ЕГ у крові щурів (М±m, n=10)

Показники	Контроль (n=10)	Група спостереження, ДЛ ₅₀					
		ПЕГ-400		ППГ		ЕГ	
		1/10	1/100	1/10	1/100	1/10	1/100
Інсулін (мкОд/мл)	37,52±3,66	17,17±1,69*	23,12±1,43*	18,24±1,93*	26,45±2,34*	15,24±1,82*	20,86±1,86*
Естрадіол (мкОд/мл), самки	8,43±0,76	4,45±0,34*	4,89±0,47*	5,67±0,41*	6,03±0,37*	3,04±0,46*	3,58±0,54*
Тестостерон (мкОд/мл), самці	0,87±0,06	0,42±0,06*	0,51±0,05*	0,57±0,04*	0,65±0,07*	0,25±0,07*	0,37±0,06*

Примітка: * – p<0,05 відносно контролю

КБ в умовах довготривалого надходження в організм, володіючи мембранотропною дією, виступають у ролі модуляторів радіоміметичних ефектів, основними симптомами яких є: накопичення в організмі продуктів вільнорадикального окиснення ліпідів; виснаження активності антиоксидантної системи; порушення структурно-функціонального стану біологічних мембран, зниження білоксинтезуючої функції клітин і активності маркерних мембраноспецифічних ферментів; порушення біоенергетики, окисного фосфорилування і тканинного дихання, пригнічення клітинного і гуморального імунітету, зміщення гормональної та нейромедіаторної активності, синтезу РНК та ДНК [3, 15].

КБ викликають в організмі щурів значні структурно-метаболическі порушення в печінці, які поєднані з її детоксикаційною функцією. Оскільки печінка бере участь у метаболізмі деяких гормонів, то її дисфункція за умов впливу КБ може супроводжуватися порушеннями цих процесів. Так, інсулін інактивується в печінці шляхом протеолізу або дезамінування, з тестостерону утворюються 17-кетостероїди андростерон і етіохоланолон, які кон'югують із сульфатами та виводяться в такому вигляді із сечею. Естрадіол у печінці перетворюється на естріол і естрон, після чого кон'югує з глюкуроноювою кислотою і сульфатами [3].

Відомо, що ключову роль у регуляції вмісту глюкози в крові відіграє гормон інсулін. Вміст цього гормону в крові змінюється паралельно вмісту глюкози [7]. Аналіз вмісту інсуліну виявив його зниження в сироватці крові за умов впливу ПЕГ-400 у дозах 1/10 та 1/100 ДЛ₅₀ на 54 і 38 %, відповідно. За умов впливу ППГ вміст інсуліну знижувався на 51 і 30 % залежно від дози. Токсифікація щурів ЕГ сприяла зниженню вмісту інсуліну на 59 і 44 % (табл. 1). КБ погіршують передачу сигналу інсуліну в периферичних тканинах, з'являється резистентність до інсуліну через сприяння експресії супресорів сигналізації цитокінів [16].

Гормони анаболічної дії – це статеві гормони. Біохімічний ефект тестостерону полягає в активації синтезу білка, РНК, ДНК. Естрадіол активує в печінці синтез транспортних білків для тироксину, заліза, міді тощо [17–19]. Вміст тестостерону в самців щурів знижувався на 52 та 41 % за умов впливу поліетиленгліколю в дозах 1/10 та 1/100 ДЛ₅₀, відповідно, а естрадіол у самиць – на 47 та 42 %. Токсифікація щурів ксенобіотиком ППГ у дозах 1/10 та 1/100 ДЛ₅₀ призвела також до зниження тестостерону на 34 та 25 %, а естрадіолу – на 33 та 28 % відповідно для самців і самиць. Щодо оцінки вмісту статевих гормонів за умов впливу найбільш токсичного ксенобіотика ЕГ, то зміни, які спостерігалися, були

найсуттєвішими, а саме: вміст тестостерону знижувався на 71 та 57 % за умов впливу ЕГ у дозах 1/10 та 1/100 ДЛ₅₀, відповідно, а естрадіол – на 64 та 58 %.

Таким чином, токсифікація щурів ксенобіотиками пригнічує синтез як основного регулятора обміну глюкози та інсуліну, так і статевих гормонів, які безпосеред-

ньо впливають на матричний синтез білка в умовах тривалого підгострого експерименту.

Результати дослідження вмісту основних показників білкового та вуглеводного обміну в крові щурів за умов впливу досліджуваних ксенобіотиків ПЕГ-400, ППГ та ЕГ у дозах 1/10 та 1/100 ДЛ₅₀ виявили суттєві їх зміни (табл. 2).

Таблиця 2. Вміст показників вуглеводного та білкового обміну в умовах тривалої субтоксичної дії ПЕГ-400, ППГ та ЕГ у крові щурів (M±m, n=10)

Показники	Контроль (n=10)	Група спостереження, ДЛ ₅₀					
		ПЕГ-400		ППГ		ЕГ	
		1/10	1/100	1/10	1/100	1/10	1/100
Глюкоза (ммоль/л)	4,65±0,37	1,93±0,14*	2,29±0,16*	2,23±0,21*	2,78±0,25*	1,56±0,10*	1,97±0,15*
Лактат (ммоль/л)	4,8±1,3	2,15±0,25*	2,42±0,16*	2,36±0,31*	2,63±0,24*	2,03±0,21*	2,27±0,25*
Сечовина (ммоль/л)	5,16±0,32	3,82±0,81*	4,4±0,57*	4,30±1,36*	4,85±0,24*	2,84±0,78*	3,51±0,88*
Креатинін (мкмоль/л)	69,2±4,17	130,8±2,94*	117,1±3,15*	127,4±2,17*	113,3±4,5*	169,8±5,98*	137,1±6,25*
Загальний білок (г/л)	74,2±3,8	52,6±2,8*	58,4±2,9*	58,6±1,7*	63,1±2,4*	32,6±4,6*	41,6±3,5*

Примітка: * – p<0,05 відносно контролю

КБ шкідливо впливають на енергетичний баланс і гомеостаз глюкози. Глюкоза транспортується крізь плазматичну мембрану за допомогою специфічних білків-переносників монокарбоксилату 1 (МСТ1) і монокарбоксилату 4 (МСТ4). За умов впливу КБ відбувається порушення функціонування в мембрані білків-транспортерів, а саме пригнічення їх діяльності, як наслідок спостерігається менше виробництво і транспортування лактату, що призводить до численних дегенеративних відхилень у клітинах, зокрема до змін у циклі Кребса й активності його ферментів (малатдегідрогенази, ізоцитратдегідрогенази тощо) у мітохондріальних фракціях, зниження аеробного окиснення ацетил-КоА, низького рівня генерації АТФ і як наслідок – апоптозу [20].

Оцінка моніторингових показників вуглеводного обміну під впливом поліетиленгліколю, поліпропіленгліколю та етиленгліколю в дозах 1/10 та 1/100 ДЛ₅₀ виявила зниження в крові глюкози та лактату.

Так, ПЕГ-400 знижує в крові вміст глюкози на 58 і 51 % та лактату – на 55 і 50 % відповідно в дозах 1/10 та 1/100 ДЛ₅₀ (табл. 2). Токсифікація ПЕГ-400 щурів знижує в крові вміст глюкози на 52 і 40 %, лактату – на 51 і 45 %, відповідно. За умов токсифікації ксенобіотиком ЕГ спостерігалось зниження в крові вмісту глюкози на 66 і 58 % на тлі зниження лактату на 58 і 53 %.

У попередніх дослідженнях ми виявили, що ксенобіотики значно впливають на структурний і метаболічний стан печінки, призводять до порушення функції монооксигеназної системи, змін фізико-хімічних властивостей і фосфоліпідного складу мембран гепатоцитів [3].

Оцінка моніторингових показників білкового обміну під впливом поліетиленгліколю, поліпропіленгліколю та етиленгліколю в дозах 1/10 та 1/100 ДЛ₅₀ виявила зниження в крові загального білка й сечовини на тлі підвищення креатиніну, що дозволяє судити про превалювання катаболічних процесів над анаболічними синтезами, а також пригнічення білоксинтезуючої функції печінки [21].

ПЕГ-400 знижує вміст загального білка на 29 і 21 %, сечовини – на 26 і 15 % на тлі підвищення вмісту креатиніну на 89 і 69 %, відповідно, у дозах 1/10 та 1/100 ДЛ₅₀ (табл. 2).

Токсифікація ППГ знижує вміст загального білка на 21 і 15 %, сечовини – на 17 і 6 % на тлі підвищення вмісту креатиніну на 84 і 64 %, відповідно, у дозах 1/10 та 1/100 ДЛ₅₀.

Токсифікація ЕГ знижує вміст загального білка на 56 і 44 %, сечовини – на 45 і 32 % на тлі підвищення

вмісту креатиніну на 145 і 98 %, відповідно, у дозах 1/10 та 1/100 ДЛ₅₀.

Висновки. За результатами досліджень установленно, що поліетиленгліколь, поліпропіленгліколь і етиленгліколь у дозах 1/10 та 1/100 ДЛ₅₀ порушують вуглеводний і білковий обмін та їх регуляцію.

1. Результати дослідження вмісту гормонів, які регулюють білковий і вуглеводний обмін у крові щурів за умов впливу досліджуваних ксенобіотиків ПЕГ-400, ППГ та ЕГ у дозах 1/10 та 1/100 ДЛ₅₀, виявили зниження інсуліну, тестостерону та естрадіолу.

2. Оцінка моніторингових показників вуглеводного обміну в організмі щурів під впливом ПЕГ-400, ППГ та ЕГ у дозах 1/10 та 1/100 ДЛ₅₀ виявила зниження вмісту глюкози та лактату.

3. Оцінка моніторингових показників білкового обміну в організмі щурів під впливом ПЕГ-400, ППГ та ЕГ у дозах 1/10 та 1/100 ДЛ₅₀ виявила зниження в крові загального білка та сечовини на тлі підвищення креатиніну.

Список використаної літератури:

1. Blythe T. Electrical Properties of Polymers / T. Blythe, D. Bloor. – London : Cambridge University Press. – 2008.
2. Статистичний бюлетень "Виробництво промислової продукції за видами в Україні за 2016 рік". – К., 2017.
3. Наконечна О. А. Біохімічні механізми порушень стану інтегративних систем організму за умов дії простих поліефірів та засоби їх корекції : автореф. дис ... д-ра мед. наук / О. А. Наконечна. – Луганськ, 2012.
4. The impacts of endocrine disruptors on wildlife, people and their environments. The Weybridge+15 (1996–2011) report. European Environment Agency. – Copenhagen, Denmark, European Environment Agency. – 2012.
5. Collotta M. Epigenetics and pesticides / M. Collotta, P. A. Bertazzi, V. Bollati // Toxicology. – 2013. – № 307. – P. 35–41.
6. Наконечна О. А. Інформативні біохімічні показники для оцінки стану нервової системи організму за умов тривалого впливу простих поліефірів / О. А. Наконечна // Експериментальна і клінічна медицина. – 2014. – № 1(62). – С. 32–35.
7. Маракушин Д. И. Влияние оксигенированных алкилфенолов на гормональный обмен белых крыс в подостром эксперименте / Д. И. Маракушин, О. А. Наконечная, И. Г. Максимова // Annals of Mechnikov Institute. – 2013. – № 2. – С. 35–39.
8. Skinner M. K. Endocrine disruptors in 2015: epigenetic transgenerational inheritance / M. K. Skinner // Nat. Rev. Endocrinol. – 2016. – № 12. – С. 68–70.
9. Endocrinedisrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement / E. Diamanti-Kandarakis, J. P. Bourguignon, L. C. Giudice et al. // Endocrine Reviews. – 2009. – Vol. 30, № 4. – P. 293–342.
10. Ендокринні руйнівники в Україні: стан проблеми та шляхи її вирішення (Національний огляд. Перша версія) НАМН, КІІВ, 2018 – 159 с.
11. Gabbianelli R. Modulation of the Epigenome by Nutrition and Xenobiotics during Early Life and across the Life Span: The Key Role of Lifestyle / R. Gabbianelli // Lifestyle Genomics. – 2018. – Published online : July 12. DOI: 10.1159/000490751.

12. Дымент О. Н. Гликоли и другие производные окисей этилена и пропилен / О. Н. Дымент. – М.: Химия, 1976.
13. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике / В. С. Камышников. – 3-е изд. – М.: Медпрессинформ, 2009.
14. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник / под ред. проф. В. В. Меншикова. – М.: Медицина, 1987.
15. Жуков В. И. Простые и макроциклические эфиры: научные основы охраны водных объектов / В. И. Жуков, Л. Д. Попова, О. В. Зайцева. – Х.: Торнадо, 2000.
16. Effect of bisphenol A on SOCS-3 and insulin signaling transduction in 3T3-L1 adipocytes / E. D. Yue, C. Wei, Q. I. Humin, Q. L. Qian // Molecular medicine reports. – 2016. – Vol. 14. – P. 331–336.
17. Біохімічні показники в нормі і при патології: навч. довідник / Д. П. Бойкін, Т. І. Бондарчук, О. Л. Іванків та ін.; за ред. О. Я. Склярєва. – К.: Медицина, 2007.
18. Xing H. Z. 3-Monochloropropane-1, 2-diol causes irreversible damage to reproductive ability independent of hormone changes in adult male rats / H. Z. Xing, B. Fang, G. F. Pang // Food Chem. Toxicol. – 2018. – № 16. – P. 69–75.
19. Chen Y. Testosterone mediates hyperthermic response of mice to heat exposure / Y. Chen, T. Yu // Life Sci. – 2018. – № 1 (214). – P. 34–40.
20. Analysis Related to the Effects of Xenobiotics on Glucose Metabolism in Male Testes Research Trends and Hotspots / F. Yongsheng, Y. Guangxia, Y. Jun, S. Jiantao // Int. J. Environ. Res. Public Health. – 2018. – № 15(8). – P. 15–29.
21. Decoding cell death signals in liver inflammation / C. Brenner, L. Galluzzi, O. Kepp, G. Kroemer // J. of Hepatology. – 2013. – № 59(3). – P. 583–594.

References

1. Blythe T., Bloor D. Electrical Properties of Polymers. London: Cambridge University Press, 2008. 496 p.
2. Statistical bulletin "Production of industrial products by types in Ukraine for 2016". – K., 2017.
3. Nakonechnaya O. A. Biochemical mechanisms of violations of the state of integrative systems of the organism under the conditions of the action of simple polyesters and means of their correction: abstract of dissertation Doctor of Medical Sciences. Lugansk, 2012. 40 p.
4. The impacts of endocrine disruptors on wildlife, people and their environments. The Weybridge+15 (1996–2011) report. European Environment Agency: Copenhagen, Denmark, European Environment Agency, 2012. 112 p.
5. Collotta M., Bertazzi P.A., Bollati V. Epigenetics and pesticides. Toxicology. 2013;307:35–41.
6. Nakonechnaya OA. Informative biochemical indicators for assessing the state of the nervous system of the organism under conditions of prolonged exposure to simple polyethers. Experimental and clinical medicine. 2014; 1(62): 32–35.

О. Наконечная, д-р мед. наук

Харьковский национальный медицинский университет, Харьков, Украина,

А. Безродная, асп.,

К. Кривонос, канд. мед. наук, асист.

Харьковский национальный медицинский университет, Харьков, Украина,

Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина, Харьков, Украина

7. Marakushin D.I., Nakonechnaya O.A., Maksimova I.G. The effect of oxyethylenated alkylphenols on the hormone exchange of white rats in a subacute experiment. Annals of Mechnikov Institute. 2013; 2:35–39.

8. Skinner M.K. Endocrine disruptors in 2015: epigenetic transgenerational inheritance. Nat. Rev Endocrinol. 2016; 12: 68–70.

9. Diamanti-Kandarakis E., Bourguignon J.P., Giudice L.C. [et al.] Endocrinedisrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. Endocrine Reviews. 2009; 4(30): 293–342.

10. National survey of endocrine disrupters in Ukraine: the state of the problem and the ways of its solution (First version) NAMS, KYIV, 2018 – 159 p.

11. Gabbianelli R. Modulation of the Epigenome by Nutrition and Xenobiotics during Early Life and across the Life Span: The Key Role of Lifestyle. Lifestyle Genomics. 2018; Published online: July 12. DOI: 10.1159/000490751

12. Dyiment O. N. Glycols and other derivatives of oxides of ethylene and propylene. Moscow: Chemistry, 1976. 373 p.

13. Kamyshnikov V. S Handbook of clinical, biochemical research and laboratory diagnosis. 3th ed. – M.: MEDpress Inform, 2009. 896 p.

14. Laboratory research methods in the clinic. Handbook / Ed. prof. V.V. Menshikov. – M.: Medicine, 1987. 368 p.

15. Zhukov V.I., Popova L.D., Zaytseva O.V. Simple and macrocyclic ethers: the scientific basis for the protection of water bodies. Kharkov: Tornado, 2000. 438 p.

16. Yue E.D., Wei Chen, Humin Q.I., Qian Q.L. Effect of bisphenol A on SOCS-3 and insulin signaling transduction in 3T3-L1 adipocytes. Molecular medicine reports. 2016.; 14: 331–336.

17. Boykin D.P. Biological Indicators in Norms and Pathologies / For ed. O.Y. Sklyarov. – K.: Medicine, 2007. – 320 p.

18. Xing H.Z., Fang B., Pang G.F. 3-Monochloropropane-1, 2-diol causes irreversible damage to reproductive ability independent of hormone changes in adult male rats. Food Chem. Toxicol. 2018; 16: 69–75.

19. Chen Y., Yu T. Testosterone mediates hyperthermic response of mice to heat exposure. Life Sci. 2018; 1 (214): 34–40.

20. Yongsheng F., Guangxia Y., Jun Y., Jiantao S. Analysis Related to the Effects of Xenobiotics on Glucose Metabolism in Male Testes Research Trends and Hotspots. Int. J. Environ. Res. Public Health. 2018; 15(8): 15–29.

21. Brenner C., Galluzzi L., Kepp O., Kroemer G. Decoding cell death signals in liver inflammation. Journal of Hepatology. 2013; 59(3): 583–94.

Надійшла до редколегії 2.10.2018

Отримано виправлений варіант 1.11.2018

Підписано до друку 1.11.2018

Received in the editorial 2.10.2018

Received a revised version on 1.11.2018

Signed in the press on 1.11.2018

ВЛИЯНИЕ БЛОКСОПОЛИМЕРОВ НА РЕГУЛЯЦИЮ И ОСНОВНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ БЕЛКОВОГО И УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА У КРЫС В УСЛОВИЯХ ПОДОСТРОГО ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

В процессе подострого токсикологического эксперимента изучено влияние группы блоксополимеров (БП) в составе полиэтиленгликоля (ПЭГ-400), полипропиленгликоля (ППГ) и этиленгликоля (ЭГ) на основные показатели углеводного и белкового обмена и их регуляцию в организме крыс. По результатам исследований установлено, что данные ксенобиотики (КБ) в дозах 1/10 и 1/100 ДЛ50 нарушают регуляцию углеводного и белкового обмена и их основные показатели. Исследованиями содержания гормонов, которые регулируют белковый и углеводный обмен, в крови крыс установлено снижение инсулина, тестостерона и эстрадиола. Анализ содержания инсулина показал его снижение в сыворотке крови при воздействии ПЭГ-400 в дозах 1/10 и 1/100 ДЛ50 на 54 и 38 %, соответственно. В условиях воздействия ППГ содержание инсулина снижалось на 51 и 30 % в зависимости от дозы. Токсификация крыс ЭГ способствовала снижению содержания инсулина на 59 и 44 %. Содержание тестостерона у самцов крыс снижалось на 52 и 41 % в условиях воздействия полиэтиленгликоля в дозах 1/10 и 1/100 ДЛ50, соответственно, а эстрадиола у самок – на 47 и 42 %. Токсификация крыс ксенобиотиком ППГ в дозах 1/10 и 1/100 ДЛ50 привела также к снижению тестостерона на 34 и 25 %, а эстрадиола – на 33 и 28 % соответственно для самцов и самок. В результате оценки содержания половых гормонов в условиях воздействия наиболее токсичного из ксенобиотиков ЭГ обнаружено, что наблюдавшиеся изменения были существенными, а именно: содержание тестостерона снижалось на 71 и 57 % в условиях воздействия ЭГ в дозах 1/10 и 1/100 ДЛ50, соответственно, а эстрадиола – на 64 и 58 %. Исследованиями мониторинговых показателей углеводного и белкового обмена в организме крыс под влиянием ксенобиотиков установлено снижение в крови глюкозы и лактата. Оценка мониторинговых показателей белкового обмена под влиянием ПЭГ-400, ППГ и ЭГ показала снижение общего белка и мочевины на фоне повышения креатинина.

Результаты подострого токсикологического эксперимента достоверно доказывают наличие нарушений белкового и углеводного обмена.

Ключевые слова: ксенобиотики; токсификация; регуляция, белковый и углеводный обмен.

O. Nakonechna, DSc.
Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine,
A. Bezrodnyaya, PhD, stud.,
K. Krivonos, assist. prof.,
Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine,
Kharkiv National University named by V.N. Karazin, Kharkiv, Ukraine

EFFECT OF BLOXOPOLYMERS ON REGULATION AND MAIN INDICATORS OF THE PROTEIN AND CARBOHYDRATE METABOLISM IN RATS UNDER CONDITIONS OF SUBJECT TOXICOLOGICAL EXPERIMENT

In the process of a subacute toxicological experiment, the influence of a group of bloxopolymers (BP) in the composition of polyethylene glycol (PEG-400), polypropylene glycol (PPG) and ethylene glycol (EG) on the main indicators of carbohydrate and protein metabolism and their regulation in the rat organism was studied. According to the results of research, it was established that these xenobiotics (XB) in doses of 1/10 and 1/100 DL50 violate the regulation of carbohydrate and protein metabolism and their main indicators. Studies of the content of hormones that regulate protein and carbohydrate metabolism in the blood of rats revealed a decrease in insulin, testosterone and estradiol. Analysis of the content of insulin revealed its decrease in serum when exposed to PEG-400 at a doses of 1/10 and 1/100 DL50 by 54% and 38%, respectively. In terms of exposure to PPG, the insulin content decreased by 51% and 30% depending on the dose. Toxicification of EG rats contributed to a decrease in the insulin content by 59% and 44 %. The content of testosterone in male rats decreased by 52% and 41% under conditions of exposure to polyethylene glycol at a doses of 1/10 and 1/100 DL50, respectively, and estradiol in females – by 47% and 42%. Toxicification of rats with xenobiotic PPG in doses of 1/10 and 1/100 DL50 also led to a decrease in testosterone by 34% and 25%, and estradiol by 33% and 28%, respectively, for males and females. As a result of evaluating the content of sex hormones under the conditions of exposure to the most toxic XB EG, they showed that the changes observed were significant, namely: the testosterone content decreased by 71% and 57% under the conditions of exposure to EG at a doses of 1/10 and 1/100 DL50, respectively, and estradiol – by 64% and 58%. Studies of monitoring indicators of carbohydrate and protein metabolism in the body of rats under the influence of XB revealed a decrease in blood glucose and lactate. Evaluation of monitoring parameters of protein metabolism under the influence of PEG-400, PPG and EG showed a decrease in total protein and urea against the background of increased creatinine.

According to the results of the subacute toxicological experiment, the presence of a violation of protein and carbohydrate metabolism and their regulation in the rat body under the influence of the studied XB has been proven.

Key words: xenobiotics, toxicification, regulation, protein metabolism, carbohydrate metabolism.

UDC: 547.415.5: [616-006.6: 612.6]

M. Prylutskyi, PhD stud.
National University "Kyiv-Mohyla Academy", Kyiv, Ukraine,
N. Starodub, Doctor of Biological Sciences, Professor
National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine,
T. Lebyedyeva, Senior Researcher, PhD of Technical Sciences,
P. Shpylovyy, PhD of Technical Science
Glushkov Institute of Cybernetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

EXPRESS CONTROL OF LEVELS OF POLYAMINES BY IMMUNE BIOSENSOR BASED ON SPR

Oncological diseases are very common throughout the population of many countries of the world, especially among middle-aged and elder people. The main threat of cancer diseases underlies in the difficulty of diagnosing them in the early stages. That is why it is extremely important to search, create and work out the latest diagnostic methods for oncological diseases that would allow to determine them more precisely and in shorter terms. The purpose of the work was to develop a method for qualitative and quantitative analysis of spermine and spermidine polyamines as potential tumour markers using an optical biosensor based on the phenomenon of surface plasmon resonance. To conduct the research, methods of biosensor analysis were used. In the course of the research, model solutions of spermine and spermidine polyamines were analyzed and changes in shifts of the resonance angle of the biosensor depending on the concentration of the analytes were determined. According to the results obtained, there is a reason to state that the developed biosensor technique allows detecting both spermine and spermidine in small concentrations (detection range from 10 ng/ml to 100 ng/ml). Modification of the surface of the transducer with solutions of protein A and bovine serum albumin not only improved the quality of the analysis, but also blocked the nonspecific binding sites of the studied analytes with a sensitive layer of antibodies. In addition, it was shown that resonance angle shifts were larger for spermine analysis than for spermidine, due to the differences in the spatial structure. According to the results, it has been concluded that the use of surface plasmon resonance-based biosensor with surface modified by antibody to spermine or spermidine is effective for quantitative and qualitative analysis of polyamines spermine and spermidine as potential tumour markers.

Key words: surface plasmon resonance, spermine, spermidine, biosensor, tumour markers.

Introduction. Modern methods of diagnostics of oncological diseases require a lot of time and costs. To improve the diagnostic method of cancer diseases, it is necessary to research and create new analytical methods that can simplify diagnostics, reduce its cost and improve the quality of diagnosis [1]. One of the perspective directions of diagnostics of oncological diseases in the early stages is the investigation of tumour markers, which allow detecting the occurrence of tumour process with high accuracy long before the appearance of clinical symptoms, especially in risk group patients [2, 3]. One of these markers are polyamines [4]. According to the preliminary data, it has been shown that there are higher levels of putrescine, spermidine and spermine in the tissues of cancer patients than in the normal tissue [5]. According to the research performed earlier it was stated that normal levels of polyamines in pancreatic cancer for spermidine was 286 nmol/ml and for spermidine and 175 nmol/ml in

blood serum. Also, according to the data received by authors mentioned above, during pancreatic cancer the levels of polyamines became twice higher [6]. The other authors compared data concerning breast cancer. According to obtained data it was mentioned that concentration of polyamines in healthy people in breast tissue is in range 16.6-100 nmol/g of tissue for spermine and 18-89.3 nmol/g of tissue for spermidine. In breast cancer patients the concentration was in range 91.4-199 nmol/g of tissue for spermine and 73.9-169.7 nmol/g of tissue for spermidine [7, 8]. It is also known that in case of absence of polyamines or suppression of the enzymes of their synthesis, the proliferation of tumour cells does not occur [9].

The problem of early diagnostics of breast cancer is not only in its asymptomatic progress, but also in the absence of reliable markers which contribute to early detection of the pathologic process. According to statistics, 80% of patients randomly detect a tumour by themselves. Most of

the patients are diagnosed with individual prophylactic examinations by doctors of different specialties, considerably fewer in case of massive examinations conducted by professionals in area of oncology [10]. Modern diagnostic methods of molecular analysis focus primarily on non-invasive approach, namely the analysis of biological fluids and, primarily, the circulating blood [11, 12]. Indeed, such analysis does not require material received directly from the tumour tissue and, therefore, does not depend on the tumour localization, referring to the early detection of primary tumours or secondary loci, and so very perspective for modern diagnostic medicine [12].

Biosensors providing the possibility of analysis of clinical samples at home or during emergency hospital diagnostics look promising. In particular, the perspective biosensors are those based on the phenomenon of surface plasmon resonance (SPR). The effect of SPR is accompanied by the appearance of a decaying electromagnetic wave, which extends deep into the environment (in biosensor studies – a solution of biomolecules), fading exponentially as a function of distance in length about 1 micron. The angular dependence of the intensity of the reflected light of the SPR manifests itself in the form of a clear minimum on a characteristic angle. The value of this angle is very sensitive to the refractive index of the environment, which is the basis for creating sensitive sensors for biosensors [13].

SPR-biosensors attract the attention of researchers, above all, by their ability to register interactions without the use of labels, by high sensitivity, accuracy and reproducibility of the results, as well as by the possibility of rapid analysis. The technology of SPR detection is universal and allows recording the interactions of both low molecular weight objects and macromolecules, their agglomerates, viruses and even entire cells. It has resulted in the intensive use of the method in fundamental research, environmental monitoring, food safety control, and also in clinical analysis [14].

Since biosensors can be used to analyze different biological markers, one of these in the perspective could be polyamines [15]. The effectiveness of qualitative and quantitative evaluation of polyamines, such as spermine and spermidine, was studied by SPR-based immune biosensor in order to estimate its use in the diagnosis of the cancer markers.

Materials and Methods. In this research we used an optical device "Plasmontest" developed at the Glushkov Institute of Cybernetics of the National Academy of Sciences of Ukraine (Fig. 1). The device of angular type "Plasmontest" is based on Kretschman scheme and

equipped by charge coupling devices (CCD) array of 2048 pixels. Refractive index of glass prism is 1.61. Thermal stabilization of a measuring cell and CCD line are realized by Peltier elements. Precisions are -0.1°C and 1°C for a measuring cell and for CCD line, respectively. SPR substrate is a glass plate with a deposited layer of gold with thickness of 50 nm. This plate subsequently served as a transducer – a converter of biological interaction into optical signal. It is placed on prism and covered by measuring cell. Temperature of measuring area during investigation was 25°C .

The 0.1 M phosphate-salt buffer solution (PBS) was used to create the analytical system, which was introduced into a cell in a volume of 1 ml. Then, solution of protein A obtained from *Staphylococcus aureus* (Sigma-Aldrich) ($1\text{ }\mu\text{g/ml}$) was placed on a transducer surface and kept for 20 min. After a thorough washing of the surface with PBS and registering a magnitude of resonant angle in the cell we put a solution of monoclonal antibody to polyamines (Sigma) at the concentration of $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ in the volume of $20\text{ }\mu\text{l}$ in measuring cell. Then, a solution of bovine serum albumin (BSA) was applied onto a transducer surface in the volume of $20\text{ }\mu\text{l}$ at the concentration of $1\text{ }\mu\text{g/ml}$. After 30 min, the transducer surface was washed with PBS and the magnitude of the resonance angle was recorded. The use of BSA was caused by the necessity of blocking possible free places on the surface of transducer, which could remain after the immobilization of specific monoclonal antibodies. The next step was the injection of spermine (Sigma-Aldrich) at the concentrations ranging from 10 ng/ml to 100 ng/ml in one series of studies, and in the another – spermidine (Sigma-Aldrich) at the same concentrations, which was followed by keeping them in the measuring cell for 20 min for binding to the immobilized specific antibodies. Polyamines were dissolved in 0.1 M PBS solution. After that, the cell was washed with PBS solution and changes in the resonance angle were recorded. The intensity of the formation of the antigen-antibody complex was recorded after each washing of the transducer surface. Changes in the resonance angle were evaluated using special computer program. The total time of the analysis starting from the preliminary preparation of the transducer surface is about 30–40 min. However, in case of preliminary modification of transducer surface it is possible to lower the time of analysis to 10 minutes, which makes the used method potentially more effective than other modern methods. The method of immobilization and modification of transducer surface used in presented research is based on the data obtained in previous research [16].



Fig.1. Optical device "Plasmontest"

Results and Discussion. In the course of the study, we obtained data showing the shifts of resonance angle, both after modification the surface of the transducer and after the solutions of polyamines applied. This tendency is observed both in the study of spermine and in spermidine.

As we can see during the process of immobilization of sensitive layer there is a slight change of resonant angle. For example, during immobilization of antibodies, shifts of resonant angle during the preparation of the sensitive layer are higher for spermine (0.06 ± 0.0028 degrees) than for spermidine (0.05 ± 0.0026 degrees). Then, an incubation of different amounts of spermine and spermidine was made. As it is shown, in general, affinity to antibodies is higher in spermine than in spermidine. Also it is revealed that with the elevation of polyamine concentration, shifts of resonant angle become higher. For example, shifts of resonant angle during incubation of 10 ng/ml of polyamines is higher

in spermine (0.12 ± 0.004 degrees) than in spermidine (0.09 ± 0.0035 degrees). It is lower than during the evaluation of shifts of resonant angle in 25 ng/ml concentration of polyamines and signifies 0.28 ± 0.01 degrees for spermine and 0.14 ± 0.006 degrees for spermidine. Furthermore, shifts of resonant angle during the estimation of 50 ng/ml are higher from those in 250 ng/ml and 100 ng/ml and are equal to 0.37 ± 0.02 degrees for spermine and 0.22 ± 0.01 degrees for spermidine. Finally, during the estimation of 100 ng/ml concentration of polyamines it was shown that shifts of resonant angle are much higher than during the estimation of concentrations 50, 25 and 10 ng/ml and are equal to 0.52 ± 0.03 for spermine and 0.29 ± 0.01 for spermidine.

The values of the resonance angle during the analysis performed on plate with deposited layer of gold without any modifications are shown in Table 1.

Table 1. Shifts of the resonance angle during the preparation of sensitive surface for the study of spermine and spermidine polyamines

	Spermine	Spermidine
PBS (phosphate buffered saline)	0	0
Monoclonal antibodies	0.06 ± 0.002	0.05 ± 0.002
10 ng/ml	0.12 ± 0.004	0.09 ± 0.003
25 ng/ml	0.28 ± 0.01	0.14 ± 0.006
50 ng/ml	0.37 ± 0.02	0.22 ± 0.01
100 ng/ml	0.52 ± 0.03	0.29 ± 0.01

All values with $P < 0.05$ comparing with SPR minimum on pure gold films with PBS only during analysis both spermine and spermidine; $n = 5$.

The study of the resonant shifts of spermine and spermidine was carried out on substrates previously modified by such substances as protein A for better orientation of antibodies, with shifts of resonant angle equal for spermine and spermidine (0.04 ± 0.002 degrees). It was used BSA for blocking non-specific binding sites and obtained almost the same values in spermine (0.14 ± 0.007 degrees) and spermidine (0.13 ± 0.006 degrees).

After proper surface modification the evaluation of shifts of resonant angle was made during the process of immobilization of polyamines in different concentrations. Comparing the studied concentrations of polyamines with BSA shifts it was shown that 10 ng/ml of spermine and spermidine differ a little from BSA (0.15 ± 0.007 degrees for spermine and 0.11 ± 0.005 degrees for spermidine). Also, as it can be seen, with each next concentration the resonant angle shifts are higher comparing with previous concentration, as well as with BSA. The shifts of 25 ng/ml concentration are higher than 10 ng/ml and are equal to 0.36 ± 0.02 degrees for spermine and 0.19 ± 0.009 degrees for spermidine.

During the estimation of 50 ng/ml shifts, it was shown that these shifts are higher than those in 25 and 10 ng/ml

as well as BSA (0.55 ± 0.03 degrees for spermine and 0.28 ± 0.02 degrees for spermidine). The last studied concentration was 100 ng/ml and the shifts of resonant angle are equal to 0.34 ± 0.02 degrees for spermidine and 0.75 ± 0.03 for spermine. Studying concentrations lower or higher than mentioned above showed their insignificance. The results of studies showed an increase of SPR angle shifts from lower to higher concentrations of spermine and spermidine (Table 2).

That is why we can say that there was conjugation of polyamines on the surface of transducer, as a result of the formation of a complex between polyamines and bounded antibodies. It was also found that the minimum concentration of polyamines, in which the biosensor was able to detect them, is 10 ng/ml. Less concentrations of both spermine and spermidine were not detected by the biosensor and were found to be insignificant. The maximum concentration recorded was 100/ml, which is apparently the result of filling free spaces on the sensitive surface of the transducer. It was also shown that spermine is more affine to antibodies, since the deviation of the resonance angle in all concentrations is significantly higher than that of spermidine (Table 2).

Table 2. Shifts of the resonance angle during determination of the concentrations which the biosensor can determine on model solutions of spermine and spermidine

	Spermine	Spermidine
PBS (phosphate buffered saline)	0	0
Protein A	0.04 ± 0.002	0.04 ± 0.002
Monoclonal antibodies	0.09 ± 0.004	0.08 ± 0.004
BSA (Bovine Serum Albumin)	0.14 ± 0.007	0.13 ± 0.006
10 ng/ml	0.15 ± 0.007	0.11 ± 0.005
25 ng/ml	0.36 ± 0.02	0.19 ± 0.009
50 ng/ml	0.55 ± 0.03	0.28 ± 0.02
100 ng/ml	0.75 ± 0.03	0.34 ± 0.02

All values with $P < 0.05$ comparing with BSA shifts of resonant angle during analysis both spermine and spermidine; $n = 5$.

So, according to the results obtained, the following conclusions can be made. The optical biosensor based on the surface plasmon resonance is capable to determine such polyamines as spermine and spermidine in the concentration range of 10 to 100 ng/ml. Modifying the surface of the transducer with substances such as BSA and protein A could increase the sensitivity of the transducer surface. Moreover, modification of transducer surface orients the active centers of specific antibodies in the direction of the solution and blocks the non-specific binding sites on the surface of the transducer. Shifts in the resonance angle in spermine analysis were higher than in the case of spermidine determination, which is obviously due to the different spatial structure of these analytes.

Список використаних джерел:

1. Bilynskyj B. T. Evolution of clinical problems in breast cancer and modern oncology progress. / Bilynskyj B. T. // Oncology. 2010, 12 (3), 282–285.
2. Mechev D. S. Hormones and tumor markers: clinical and methodological aspects (manual). / Mechev D. S., Moskalets O. I., Bondaruk O. S. // Kyiv: "Medicine of Ukraine". 2007, 96 p.
3. Lodeiro C. Light and colour as analytical detection tools: a journey into the periodic table using polyamines to bio-inspired systems as chemosensors / Lodeiro C. // Chemical Society Reviews. 2010, 39(8), 2948–2976.
4. Moskalets A. I. Tumor markers in laboratory diagnostics. / Moskalets A. I., Shcherbina O. V. // Laboratory diagnostics. 2011, N 1, 64–72.
5. Tsutsui H. High-throughput LC–MS/MS based simultaneous determination of polyamines including N-acetylated forms in human saliva and the diagnostic approach to breast cancer patients / Tsutsui H. // Analytical chemistry. 2013, 85 (24), 11835–11842.
6. Takayama T. Diagnostic approach to breast cancer patients based on target metabolomics in saliva by liquid chromatography with tandem mass spectrometry / Takayama T. // Clinica Chimica Acta. 2016, 452, 18–26.
7. Levêque J. Polyamine profiles in tumor, normal tissue of the homologous breast, blood, and urine of breast cancer sufferers. / Levêque J. // Breast Cancer Research and Treatment. 2000, 60(2), 99–105.
8. Zaleto S. P. Metabolism of polyamines in tumor tissues and in urine of patients with breast tumors. / Zaleto S. P., Berdinskikh N. K., Lialushko N. M. // Oncology. 2000, 2 (4), 250–252.
9. Zaleto S. P. Norarginine enhances the antitumor activity of inhibitors of polyamines synthesis in vivo. / Zaleto S. P., Gogol S. V., Klenov O. O. // Oncology. 2017, 19 (1), 17–24.
10. Tamkovych S. N., Vojcyskyj V. E. Laktyonov P. P. // Biomedical chemistry. 2014, 60 (2), 141–160.
11. Byun J. A. et al. Serum polyamines in pre-and post-operative patients with breast cancer corrected by menopausal status / Byun J. A. et al. // Cancer letters. 2009, 273 (2) 300–304.
12. Miolo G. et al. Pharmacometabolomics study identifies circulating spermidine and tryptophan as potential biomarkers associated with the complete pathological response to trastuzumab-paclitaxel neoadjuvant therapy in HER-2 positive breast cancer / Miolo G. et al. // Oncotarget. 2016, 7 (26), 39809–39822.
13. Kivirand K., Rinken T. Biosensors for biogenic amines: the present state of art mini-review / Kivirand K., Rinken T. // Analytical Letters. 2011, 44 (17), 2821–2833.
14. Dykman L. A. Golden nanoparticles in biology and medicine: achievements of recent years and prospects. / Dykman L. A., Hlebcov N. G. // Acta Naturae. 2011, 3 (2), 36–58.
15. Bonaiuto E. Ternary Hybrid γ -Fe₂O₃/CrVI/Amine Oxidase Nanostructure for Electrochemical Sensing: Application for Polyamine

Detection in Tumor Tissue / Bonaiuto E. // Chemistry–A European Journal. 2016, 22 (20), 6846–6852.

16. Starodub N.F. Antibody immobilization on the metal and silicon surface. / Starodub N.F. / The use of selfassembled layer and specific receptors. Bioelectrochemistry. 2005, 66 (1-2), 111–115.

References

1. Bilynskyj B. T. Evolution of clinical problems in breast cancer and modern oncology progress. Oncology. 2010, 12 (3), 282–285 (In Ukrainian).
2. Mechev D. S., Moskalets O. I., Bondaruk O. S. Hormones and tumor markers: clinical and methodological aspects (manual). Kyiv: "Medicine of Ukraine". 2007, 96 p. (In Russian).
3. Lodeiro C. Light and colour as analytical detection tools: a journey into the periodic table using polyamines to bio-inspired systems as chemosensors // Chemical Society Reviews. 2010, 39(8), 2948–2976..
4. Moskalets A. I., Shcherbina O. V. Tumor markers in laboratory diagnostics. Laboratory diagnostics. 2011, N 1, 64–72. (In Russian).
5. Tsutsui H. High-throughput LC–MS/MS based simultaneous determination of polyamines including N-acetylated forms in human saliva and the diagnostic approach to breast cancer patients // Analytical chemistry. 2013, 85 (24), 11835–11842.
6. Takayama T. Diagnostic approach to breast cancer patients based on target metabolomics in saliva by liquid chromatography with tandem mass spectrometry // Clinica Chimica Acta. 2016, 452, 18–26.
7. Levêque J. Polyamine profiles in tumor, normal tissue of the homologous breast, blood, and urine of breast cancer sufferers. Breast Cancer Research and Treatment. 2000, 60(2), 99–105.
8. Zaleto S. P., Berdinskikh N. K., Lialushko N. M. Metabolism of polyamines in tumor tissues and in urine of patients with breast tumors. Oncology. 2000, 2 (4), 250–252. (In Ukrainian).
9. Zaleto S. P., Gogol S. V., Klenov O. O. Norarginine enhances the antitumor activity of inhibitors of polyamines synthesis in vivo. Oncology. 2017, 19 (1), 17–24. (In Ukrainian).
10. Tamkovych S. N., Vojcyskyj V. E. Laktyonov P. P. Modern methods of breast cancer diagnostics. Biomedical chemistry. 2014, 60 (2), 141–160. (In Russian).
11. Byun J. A. et al. Serum polyamines in pre-and post-operative patients with breast cancer corrected by menopausal status // Cancer letters. 2009, 273 (2) 300–304.
12. Miolo G. et al. Pharmacometabolomics study identifies circulating spermidine and tryptophan as potential biomarkers associated with the complete pathological response to trastuzumab-paclitaxel neoadjuvant therapy in HER-2 positive breast cancer // Oncotarget. 2016, 7 (26), 39809–39822.
13. Kivirand K., Rinken T. Biosensors for biogenic amines: the present state of art mini-review // Analytical Letters. 2011, 44 (17), 2821–2833.
14. Dykman L. A., Hlebcov N. G. Golden nanoparticles in biology and medicine: achievements of recent years and prospects. Acta Naturae. 2011, 3 (2), 36–58. (In Russian).
15. Bonaiuto E. Ternary Hybrid γ -Fe₂O₃/CrVI/Amine Oxidase Nanostructure for Electrochemical Sensing: Application for Polyamine Detection in Tumor Tissue // Chemistry–A European Journal. 2016, 22 (20), 6846–6852.
16. Starodub N.F. Antibody immobilization on the metal and silicon surface. The use of selfassembled layer and specific receptors. Bioelectrochemistry. 2005, 66 (1-2), 111–115.

Надійшла до редколегії 2.10.2018

Отримано виправлений варіант 1.11.2018

Підписано до друку 1.11.2018

Received in the editorial 2.10.2018

Received a revised version on 1.11.2018

Signed in the press on 1.11.2018

М. Прилуцький, асп.

Національний університет "Києво-Могилянська академія", Київ, Україна,

М. Стародуб, д-р біол. наук, проф.

Національний університет біоресурсів та природокористування, Київ, Україна,

Т. Лебедєва, канд. тех. наук, П. Шпильовий, канд. тех. наук

Інститут кібернетики імені В. М. Глушкова НАН України, Київ, Україна

ЕКСПРЕСНИЙ КОНТРОЛЬ РІВНЯ ПОЛІАМІНІВ ЗА ДОПОМОГОЮ ІМУНОБІОСЕНСОРА НА ОСНОВІ ППР

Онкологічні захворювання поширені серед населення багатьох країн світу, особливо серед людей середнього та старшого віку. Основна загроза онкологічних захворювань полягає саме у труднощах їх діагностики на ранніх етапах. Тому вкрай важливим є пошук, створення та впровадження новітніх методів діагностики онкологічних захворювань, які б дозволили визначати захворювання точніше та у коротші терміни. Метою роботи була розробка методики якісного та кількісного аналізу поліамінів сперміну та спермідину, як потенційних маркерів онкологічних захворювань з використанням оптичного біосенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу. Для проведення досліджень застосовували методи біосенсорного аналізу. В ході досліджень було проаналізовано модельні розчини поліамінів сперміну та спермідину та визначені зміни відхилення резонансного кута біосенсора, залежно від концентрації досліджуваних аналітів. Відповідно до одержаних результатів, є підстави стверджувати, що розроблена біосенсорна методика дає змогу

виявляти спермін і спермідин у малих кількостях (діапазон чутливості – у межах від 10 нг/мл до 100 нг/мл). Модифікація поверхні трансдюсера розчинами білку А та бичачого сироваткового альбуміну дозволила не лише покращити якість проведення аналізу, але й заблокувати неспецифічні місця зв'язування досліджуваних аналітів з чутливим шаром антитіл. Показано, що зміни резонансного кута були дещо більшими у випадку аналізу сперміну порівняно з тими, що їх спостерігали для спермідину, внаслідок відмінностей у просторовій структурі. За одержаними результатами зроблено висновок, що використання імунобіосенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу з попередньою модифікацією поверхні трансдюсера є ефективним для якісного й кількісного аналізу поліамінів сперміну та спермідину як потенційних маркерів онкологічних захворювань.

Ключові слова: поверхневий плазмонний резонанс, рак грудної залози, спермін, спермідин, біосенсор, онкомаркери.

М. Прилуцкий, асп.

Национальный университет "Киево-Могилянская академия", Киев, Украина,

Н. Стародуб, д-р биол. наук, проф.

Национальный университет биоресурсов и природопользования, Киев, Украина,

Т. Лебедева, канд. тех. наук, П. Шпылевой, канд. тех. наук

Институт кибернетики имени В. М. Глушкова НАН Украины, Киев, Украина

ЭКСПРЕССНЫЙ КОНТРОЛЬ УРОВНЯ ПОЛИАМИНОВ С ПОМОЩЬЮ ИМУНОБИОСЕНСОРА НА ОСНОВЕ ППР

Онкологические заболевания распространены среди населения многих стран мира, особенно среди людей среднего и старшего возраста. Основная угроза онкологических заболеваний заключается именно в трудностях их диагностики на ранних этапах. Поэтому крайне важным является поиск, создание и отработка новейших методов диагностики онкологических заболеваний, позволяющих определять заболевания точнее и в короткие сроки. Целью работы была разработка методики качественного и количественного анализа полиаминов спермина и спермидина как потенциальных маркеров онкологических заболеваний с использованием оптического биосенсора на основе поверхностного плазмонного резонанса. Для проведения исследований использовали методику биосенсорного анализа. В ходе исследований были проанализированы модельные растворы полиаминов спермина и спермидина, определены изменения отклонения резонансного угла биосенсора в зависимости от концентрации исследуемых аналитов. Согласно полученным результатам, есть основания утверждать, что разработанная биосенсорная методика позволяет выявлять спермин и спермидин в малых количествах (диапазон чувствительности – в пределах 10–100 нг/мл). Модификация поверхности трансдюсера растворами белка А и бычьего сывороточного альбумина позволила не только улучшить качество проведения анализа, но и заблокировать неспецифические места связывания исследуемых аналитов с чувствительным слоем антител. Показано, что изменения резонансного угла были несколько увеличенными при анализе спермина по сравнению с наблюдаемыми для спермидина вследствие различий в пространственной структуре. Полученные результаты дают возможность сделать вывод, что использование имунобиосенсора на основе поверхностного плазмонного резонанса с предыдущей модификацией поверхности трансдюсера является эффективным для качественного и количественного анализа полиаминов спермина и спермидина как потенциальных маркеров онкологических заболеваний.

Ключевые слова: поверхностный плазмонный резонанс, рак грудной железы, спермин, спермидин, биосенсор, онкомаркеры.

Наукове видання



ВІСНИК

КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

**ПРОБЛЕМИ РЕГУЛЯЦІЇ
ФІЗІОЛОГІЧНИХ ФУНКЦІЙ**

Випуск 2(25)

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.



Формат 60x84^{1/8}. Ум. друк. арк. 7,5. Наклад 300. Зам. № 218-9008.
Гарнітура Arial. Папір офсетний. Друк офсетний. Вид. № Б5.
Підписано до друку 29.11.18

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_div.chief@univ.net.ua; redaktor@univ.net.ua
http: vpc.univ.kiev.ua

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 1103 від 31.10.02