

# ВІСНИК

КІЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ISSN 1728-2624

## ПРОБЛЕМИ РЕГУЛЯЦІЇ ФІЗІОЛОГІЧНИХ ФУНКЦІЙ — 2(21)/2016

Засновано 1958 року

Подано експериментальні дані про особливості будови, розвитку і функціонування рослинних і тваринних організмів, флору і фауну України, одержаних науковцями НДІ фізіології імені академіка Богача та ННЦ "Інститут біології та 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.

Подано экспериментальные данные об особенностях строения, развития и функционирования растительных и животных организмов, полученных учеными НИИ физиологии имени академика Богача и ННЦ "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 research institute and 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 student.

### ВІДПОВІДАЛЬНИЙ РЕДАКТОР

### РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ

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

Є. О. Торгало, канд. біол. наук (відп. секр.); С. Є. Вакал, асист. (техн. секр.); С. Сабо, д-р біол. наук, проф. (м. Ірвайн, США. Університет Каліфорнії); О. В. Жолос, д-р біол. наук, проф. (Королівський університет Белфаста, м. Белфаст, Великобританія); М. Шандор, д-р біол. наук, проф. (Західно-Угорський Університет, м. Сомбатхей, Угорщина); С. Юозас, д-р біол. наук, проф. (Інститут ботаніки, м. Вільнюс, Литва); Б. Каленгхем, проф. (м. Кембридж, Великобританія); В. О. Іваниця, д-р біол. наук, проф.; Т. В. Берегова, д-р біол. наук, проф.; Д. Н. Говорун, д-р біол. наук, проф.; Дж. Воллес, д-р біол. наук, проф. (Торонто, Онтаріо, Канада); І. Г. Ємельянов, д-р біол. наук, проф.; Е. М. Дзержинський, д-р біол. наук, проф.; І. Ю. Костіков, д-р біол. наук, проф.; О. Я. Скляров, д-р біол. наук, проф.; В. С. Мартинюк, д-р біол. наук, проф.; М. Ю. Макарчук, д-р біол. наук, проф.; В. П. Поліщук, д-р біол. наук, проф.; В. К. Рибальченко, д-р біол. наук, проф.; Н.Ю. Таран, д-р біол. наук, проф.; А. В. Сиволоб, д-р біол. наук, проф.; А. Г. Мойсеєнок, д-р біол. наук, проф., чл.-кор. НАН Білорусії

### Адреса редколегії

03127, Київ-127, просп. акад. Глушкова, 2а,

ННЦ "Інститут біології та медицини";

тел (38044) 521-35-98; [www.biovestnik.com](http://www.biovestnik.com); [bulletin.vestnik@gmail.com](mailto:bulletin.vestnik@gmail.com)

### Затверджено

Вченю радою ННЦ "Інститут біології та медицини "

12.12.16 (протокол № 6)

### Атестовано

Вищою атестаційною комісією України.

Постанова Президії ВАК України

№ 1-05/3 від 14.04.10

### Зареєстровано

Міністерством юстиції України.

Свідоцтво про державну реєстрацію

КВ № 16053-4525 ПР від 09.11.09

### Засновник та видавець

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ,

Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет".

Свідоцтво внесено до Державного реєстру

ДК № 1103 від 31.10.02

### Адреса видавця

01601, Київ-601, б-р Т.Шевченка, 14, кімн. 43

тел (38044) 239 31 72, 239 32 22; факс 239 31 28

Журнал входить  
до наукометрических баз /  
Abstracted and Indexed:

Index Copernicus (з 2012 р. ICV-2013 = 5,93), Cite Factor (з 2014 р.), Research Bible (з 2013 р.). Academic Keys (з 2013 р.), DOAJ (з 2013 р.), EBSCO.EJS (з 2012 р.), Free medical journals list of Geneva Foundation for Medical Education and Research (з 2014 р.); HINARI (з 2013 р.); Medical Journals Links (з 2013 р.); OAJI (з 2012 р.); The Knowledge Network (з 2014 р.); Ulrich's Periodicals Directory (з 2012 р.); WorldCat (з 2013 р.); E-Library.ru (з 2014 р.).

---

**ЗМІСТ**

---

<b>Калінін І., Цудзевич Б.</b>	
Особливості функціонування антиоксидантної системи в тканинах щурів при отруєнні важкими металами .....	5
<b>Кондратюк Т., Собко В., Берегова Т., Остапченко Л.</b>	
Особливості розвитку продуценту меланіну <i>PSEUDONADSONIELLA BRUNNEA</i> в умовах впливу нітрату свинцю .....	8
<b>Охрей А., Куценко Т., Макарчук М.</b>	
Вплив занять музикою на виконання прямого і зворотнього тестів Струпа .....	14
<b>Вірич П., Шелюк О., Мартинюк В., Павловський В.</b>	
Особливості брадикінін-індукованого скорочення гладеньких м'язів шлунку залежно від концентрації сполук на основі 3-заміщених 1,4-бензіазепін-2-онів .....	19
<b>Голобородько Є., Іщук Т., Синельник Т., Конопельнюк В.</b>	
Порівняльний аналіз ефектів лікувального введення Орлістату й Біонанокомпозиту на основі фенугреку на показники-маркери ендогенної інтоксикації в щурів із експериментальним ожирінням .....	23
<b>Тіхова Є., Берник О., Савчук О., Дворщенко К., Остапченко Л.</b>	
Інтенсивність вільнорадикальних процесів у хрящовій тканині щурів з колаген-індукованим артритом .....	27
<b>Лилик М., Сорочинська О., Манюх О., Байляк М.</b>	
Статеві особливості амінокислотного обміну у <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> за споживання альфа-кетоглутарату .....	31
<b>Нужина Н., Ткачук О., Фукаляк А.</b>	
Динаміка пігментного комплексу трьох видів шипшини за умов гіпертермії.....	36
<b>Храбко М., Федорук Р.</b>	
Ріст і розвиток організму самців щурів F <sub>1</sub> та його імунофізіологічна активність у період випоювання різних доз нанотехнологічного і хімічно синтезованого цитрату германію .....	39
<b>Чорненська Н., Раєцька Я., Савчук О., Остапченко Л.</b>	
Біохімічні зміни в сироватці крові щурів за умов експериментальної опікової хвороби та їх корекція меланіном .....	44
<b>Воробйова Н., Ложко Д., Корнелюк О.</b>	
Стабільність рекомбінантного білка AIMP1/P43 людини в комплексі з <i>mRHK</i> .....	49
<b>Катрій Т., Савчук О., Шандюк В., Мельник В.</b>	
Характеристика протромбінового пулу пацієнтів, які перенесли ішемічний інсульт .....	53
<b>Царенко Т., Гайда Л., Кравченко О.</b>	
Показники ендотоксемії пацієнтів із ішемічним інсультом та цукровим діабетом другого типу .....	57
<b>Кізуб І., Харченко О., Костюк О., Остапченко Л., Клименко К., Соловйов А.</b>	
Участь протеїнікази С у механізмах порушення судинного тонусу за умов цукрового діабету. Частина 4 .....	61
<b>Федорчук С., Чікіна Л., Герасько Т., Зима І., Тукаєв С.</b>	
Статичні електричні потенціали як показники стану очікування за умов формування емоційного вигорання у студентів.....	66
<b>Ткаченко О., Коваленко В.</b>	
Вікові особливості впливу метаболічного синдрому на ембріон-фетальний розвиток потомства самців щурів .....	71
<b>Александров А., Конопельнюк В., Скопенко О., Іщук Т.</b>	
Вміст амінокислот у щурів за умов довготривалого введення прогестерону .....	75
<b>Дворщенко К., Драниця А., Торгало Є., Короткий О., Берегова Т.</b>	
Показники протеїнового обміну у крові щурів при вивченні хронічної токсичності композиції на основі меланіну .....	79
<b>Білюк А., Негеля А., Гарманчук Л., Скачкова О.</b>	
Активність цитохромоксидази та сукцинатдегідрогенази в первинній культурі перешеплюваної карциноми легень Льюїс на різних етапах росту пухлини .....	81
<b>Гончаревський С., Мартинюк В.</b>	
Добова динаміка температури препрезентативних зон шкіри людини.....	86

---

---

## СОДЕРЖАНИЕ

---

<b>Калинин И., Цудзевич Б.</b>	
Особенности функционирования антиоксидантной системы в тканях крыс при отравлении тяжелыми металлами.....	5
<b>Кондратюк Т., Собко В., Береговая Т., Остапченко Л.</b>	
Особенности развития продукта меланина PSEUDONADSONIELLA BRUNNEA в условиях влияния нитрата свинца .....	8
<b>Охрей А., Куценко Т., Макарчук М.</b>	
Влияние занятий музыкой на выполнение прямых и обратных тестов Струпа .....	14
<b>Вирыч П., Шелюк О., Мартынюк В., Павловский В.</b>	
Особенности брадикинин-индуцированного сокращения гладких мышц желудка зависимо от концентрации соединений на базе 3 -замещенных -1,4 – бензиазепин -2- онов .....	19
<b>Голобородько Е., Ищук Т., Синельник Т., Конопельнюк В.</b>	
Сравнительный анализ эффектов лечебного введения Орлистата и Бионанокомпозита на основе фенугрея на показатели-маркеры эндогенной интоксикации у крыс с экспериментальным ожирением.....	23
<b>Тихова Е., Берник О., Савчук А., Дворщенко К., Остапченко Л.</b>	
Интенсивность свободнорадикальных процессов в хрящевой ткани крыс с каллаген-индуцированным артритом.....	27
<b>Лилик М., Сорочинская О., Манюх О., Байляк М.</b>	
Половые особенности аминокислотного обмена в <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> за употребления альфа-кетоглутарата.....	31
<b>Нужина Н., Ткачук О., Фукаляк А.</b>	
Динамика пигментного комплекса трех видов шиповника при условии гипертермии .....	36
<b>Храбко М., Федорук Р.</b>	
Рост и развитие организма самцов крыс F <sub>1</sub> и его иммунофизиологическая активность в период выпаивания разных доз нанотехнологического и химически синтезированного цитрата германия .....	39
<b>Чорненська Н., Раецкая Я., Савчук О., Остапченко Л.</b>	
Бioхимические изменения в сыворотке крови крыс в условиях экспериментальной ожоговой болезни и их коррекция меланином .....	44
<b>Воробьева Н., Корнелюк А., Ложко Д.</b>	
Стабильность рекомбинантного белка AIMP1/P43 человека в комплекса с тРНК .....	49
<b>Катрий Т., Савчук А., Шандюк В., Мельник В.</b>	
Характеристика протромбинового пула у больных перенесших ишемический инсульт .....	53
<b>Царенко Т., Гайда Л., Кравченко О.</b>	
Показатели эндотоксемии пациентов с ишемическим инсультом и сахарным диабетом второго типа .....	57
<b>Кизуб И., Харченко О., Костюк А., Остапченко Л., Клименко К., Соловьев А.</b>	
Участие протеинкиназы С в механизмах нарушения сосудистого тонуса при сахарном диабете. Часть 4 .....	61
<b>Федорчук С., Чикина Л., Герасько Т., Зима И., Тукаев С.</b>	
Статистические электрические потенциалы как показатели состояния ожидания в условиях формирования эмоционального выгорания у студентов .....	66
<b>Ткаченко О., Коваленко В.</b>	
Возрастные особенности влияния метаболического синдрома на эмбрио-фетальное развитие потомства самцов крыс .....	71
<b>Александров А., Конопельнюк В., Скопенко О., Ищук Т.</b>	
Содержание аминокислот у крыс в условиях длительного введения прогестерона .....	75
<b>Дворщенко Е., Драница А., Торгало Е., Короткий А., Береговая Т.</b>	
Показатели протеинового обмена в крови крыс при изучении хронической токсичности композиции на основе меланина .....	79
<b>Билюк А., Негеля А., Гарманчук Л., Скачкова О.</b>	
Активность цитохромоксидазы и сукцинатдегидрогеназы в первичной культуре превитой карциномы легких Льюис на различных этапах роста опухоли .....	81
<b>Гончаревский С., Мартынюк В.</b>	
Суточная динамика температуры репрезентативных зон кожи человека.....	86

---

**CONTENTS**

---

<b>Kalinin I., Tsudzevich B.</b>	
The functioning of antioxidant system of the tissue of rats, poisoned with heavy metals .....	5
<b>Kondratiuk T., Sobko V., Beregova T., Ostapchenko L.</b>	
Features of melanin producer <i>PSEUDONADSONIELLA BRUNNEA</i> under the influence of nitrate lead .....	8
<b>Okhrei A., Kutsenko T., Makarchuk M.</b>	
Effect of music lessons on the implementation of the direct and inverse tests Scab .....	14
<b>Virych P., Shelyuk O., Martynyuk V., Pavlovsky V.</b>	
Features bradykinin-induced smooth muscle contraction of stomach in a concentration dependent compounds based on 3-substituted 1,4-benzodiazepin-2-ones .....	19
<b>Goloborodko I., Ishchuk T., Synelnyk T., Konopelnikov V.</b>	
Comparative analysis therapeutic effects introduction Bionanocomposite and Orlistat which based on fenugreek on indicators-markers of endogenous intoxication in rats with experimental obesity .....	23
<b>Tihova E., Bernuk O., Savchuk O., Dvorshenko K., Ostapchenko L.</b>	
Intensity of free radical processes in cartilage in rats with collagen-induced arthritis .....	27
<b>Lylk M., Sorochynska O., Maniukh O., Bayliak M.</b>	
Gender differences of amino acid metabolism in <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> on alpha-ketoglutarate-supplemented food .....	31
<b>Nuzhyna N., Tkachuk O., Fukalyak A.</b>	
Dynamics of pigment complex three species of wild rose under hyperthermia .....	36
<b>Khrabko M., Fedoruk R.</b>	
Growth and development of F <sub>1</sub> male rats organism and its immunophysiological activity during the period watering them different doses of nanotechnology and chemically synthesized germanium citrate .....	39
<b>Chornenka N., Rayetska Ya., Savchuk O., Ostapchenko L.</b>	
Biochemical changes in blood serum of rats with experimental burn disease and their correction melanin .....	44
<b>Vorobyova N., Kornelyuk A., Lozhko D.</b>	
Stability of human recombinant AIM1/P43 protein in the complex with tRNA .....	49
<b>Katrii T., Savchuk O., Shandyuk V., Melnyk V.</b>	
Characteristics of pool protrombin in patients with ischemic stroke .....	53
<b>Tsarenko T., Gayda L., Kravchenko O.</b>	
Endotoxication indicators in the blood of patients with ischemic stroke complicated by type two diabetes mellitus .....	57
<b>Kizub I., Kharchenko O., Kostiuk O., Ostapchenko L., Klymenko K., Soloviev A.</b>	
Protein kinase C participation in mechanisms of vascular tone abnormality in diabetes mellitus. PFRT 4 .....	61
<b>Fedorchuk S., Chikina L., Gerasko T., Zima I., Tukaev S.</b>	
Statistical electric potential as an indicator of a wait state in the formation of emotional burnout student .....	66
<b>Tkachenko O., Kovalenko V.</b>	
Age features of influence metabolic syndrome on fetal embryonic development of the offspring of male rats .....	71
<b>Aleksandrov A., Ishchuk T., Konopelnikov V., Scopenko O.</b>	
Amino acids level in rats under progesterone long-term administration .....	75
<b>Dvorshchenko K., Dranitsina A., Torgalo I., Korotkiy O., Beregova T.</b>	
Indices of protein metabolism in blood of rats in the study of chronic toxicity based on melanin .....	79
<b>Biluk A., Nehelia A., Garmanchuk L., Skachkova O.</b>	
The activity of succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase in primary culture in oculated Lewis lung carcinoma in various stages of tumor growth .....	81
<b>Goncharevskyi S., Martynyuk V.</b>	
Daily dynamics temperature representative are as of human skin .....	86

# ВИПУСК 2(21)

УДК 577.576.546.48.59.085:599

І. Калінін, канд. біол. наук  
Національний педагогічний університет імені М.П. Драгоманова, Київ,  
Б. Цудзевич, д-р біол. наук  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

## ОСОБЛИВОСТІ ФУНКЦІОNUВАННЯ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ В ТКАНИНАХ ЩУРІВ ПРИ ОТРУЄННІ ВАЖКИМИ МЕТАЛАМИ

Досліджено вплив важких металів (міді сульфату, цинку сульфату, кадмію сульфату і свинцю азотокислого) на пероксидне окиснення ліпідів (ПОЛ) і на активність глутатіонзалежних ферментів крові та печінки інтоксикованих щурів. Показано, що введення щуром важких металів викликає підвищення вмісту в крові та печінці ТБК-активних продуктів і дієнових кон'югатів. При дії важких металів знижується активність каталази і супероксиддисмутази. Встановлено зниження активності глутатіонпероксидази і глутатіонтрансферази під впливом підвищених доз важких металів. За дії важких металів зменшується вміст відновленого глутатіону в тканинах щурів.

**Ключові слова:** мідь, цинк, кадмій, свинець, кров, печінка, щури, антиоксидантна система.

**Вступ.** Сучасне техногенне забруднення довкілля важкими металами досить значне і чинить несприятливу дію на здоров'я людей і тварин [1]. Негативні фактори навколошнього середовища, в тому числі й важкі метали, призводять до розладу антиоксидантного захисту та викликають посилення вільнопардикального окиснення (ВРО). Це супроводжується зміною конформації ліпідів, що призводить до порушення структурних і функціональних властивостей біомембрани, підвищенню їхньої лабільноті й проникності, розбалансуванню ферментних систем мембрани, порушенню електронотранспортних ланцюгів мітохондрій. Крім того, продукти ВРО ушкоджують білки, тілові сполуки, нуклеотидофосфати, ушкоджують ядерну ДНК з утворенням її одноланцюгових розривів [2].

За оцінкою активності процесів ПОЛ і ВРО та ступеня зсуву рівноваги між про- та антиоксидантними системами можна розглядати об'єктивні й дуже чутливі показники загального стану організму, активності й функціонування систем підтримки гомеостазу [3].

За рівнем продуктів ПОЛ можна судити про інтенсивність ВРО в різних біологічних системах і тканинах організму, тобто про ступінь їхнього ушкодження під дією несприятливих факторів середовища [4-5]. При оцінці активності ВРО необхідно мати на увазі, що клітина, організм мають у своєму розпорядженні безліч захисних механізмів, що більш-менш ефективно протидіють ВРО. Показником ступеня посилення ВРО може бути збільшення кількості продуктів ВРО.

Антиоксидантна система захисту організму контролює і гальмує всі етапи вільнопардикальних реакцій, починаючи від їх ініціації і закінчуючи утворенням гідропероксидів і ТБК-активних продуктів. Основний механізм контролю цих реакцій пов'язаний з ланцюгом зворотних окисно-відновних реакцій за участю іонів металів змінної валентності, глутатіону, аскорбату, токоферолу та інших речовин, значення яких особливо важливо для збереження білків і деяких складових мембрани. Є підстави вважати, що тривалість життя макромолекул

у клітині багато в чому визначається саме їх стійкістю до атаки вільнопардикальних продуктів [6].

**Метою роботи** було дослідження впливу інтоксикації важкими металами на функціонування антиоксидантної системи у тканинах щурів.

**Матеріали і методи.** Досліди проводили на білих нелінійних щурах-самцях, одного віку, масою 180-200 г., впродовж 14 діб. Тварини були розділені на п'ять груп: перша – інтактні (контроль), друга – тваринам перорально вводили розчин купрум сульфату в дозі 3 мг/кг, що становить 1/10 від ЛД<sub>50</sub>, третя – щуром перорально вводили розчин цинку сульфату в дозі 2 мг/кг, що становить 1/20 від ЛД<sub>50</sub>, четверта – тваринам перорально вводили розчин кадмію сульфату в дозі 1,5 мг/кг, що становить 1/30 від ЛД<sub>50</sub>, п'ята – тваринам перорально вводили розчин плюмбум нітрату в дозі 1,7 мг/кг, що становить 1/50 від ЛД<sub>50</sub>. Щурів декапітували під ефірним наркозом і відбирали кров та тканини печінки для подальших досліджень. Вся робота проводилася відповідно до конвенції Ради Європи щодо захисту хребетних тварин, яких використовують у наукових цілях. Кров отримували загальновідомими методами, а препарати гомогенної фракції клітин печінки – методом диференційного центрифугування [7]. Вміст ТБК-активних продуктів визначали за [8], дієнових кон'югатів (ДК) за [9]. Визначали активність: супероксиддисмутази (СОД, КФ 1.15.1.1) за методом [10]; каталази (КАТ, КФ 1.11.1.9) за [11]; глутатіонпероксидази (ГП, КФ 1.11.1.9) та глутатіонтрансферази (ГТ, КФ 2.5.1.18) за [12-13]. Вміст відновленого глутатіону (GSH) визначали методом [14]. Вміст білків у тканинах визначали методом О.Н. Lowry et al. [15]. Експериментальні дані обробляли статистично з використанням t-критерію Стьюдента [16].

**Результати та обговорення.** У крові та чисельних тканинах печінки щурів за інтоксикації іонами Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> та Pb<sup>2+</sup> виявлено активацію пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), яке оцінювали по накопиченню ТБК-активних продуктів (табл. 1).

Таблиця 1. Вміст ТБК-активних продуктів у крові та тканинах печінки щурів за умов інтоксикації важкими металами (M±m, n=8)

Групи тварин	Вміст ТБК-активних продуктів	
	Кров, мкмоль/л	Печінка, мкмоль/мг білка
Контроль	1,34±0,05	0,74±0,03
Інтоксиковані CuSO <sub>4</sub>	1,87±0,09*	0,97±0,04*
Інтоксиковані ZnSO <sub>4</sub>	1,91±0,04*	0,95±0,05*
Інтоксиковані CdSO <sub>4</sub>	2,23±0,08*	1,02±0,07*
Інтоксиковані Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2,16±0,05*	1,01±0,05*

Примітка: \* – P≤0,05 – відносно контролю.

Інтоксикація купром сульфатом призводить до збільшення ТБК-активних продуктів на 40% у крові та на 31% у печінці; цинку сульфатом – на 42% в крові та на 31% в печінці, кадмію сульфатом – на 66% в крові та на

38% в печінці; плюмбум нітратом – на 61% в крові та на 36% в печінці, відносно контрольної групи тварин.

Вміст дієнових кон'югатів у тканинах щурів (табл. 2) визначали як відношення оптичної густини при 233 і 218 нм.

**Таблиця 2. Вміст дієнових кон'югатів у крові та тканинах печінки щурів за умов інтоксикації важкими металами ( $M \pm m$ , n=8)**

Групи тварин	Вміст дієнових кон'югатів	
	Кров (нмоль/мл)	Печінка (нмоль/г)
Контроль	3,04±0,15	23,47±0,42
Інтоксиковані $CuSO_4$	3,53±0,18	24,64±0,45
Інтоксиковані $ZnSO_4$	3,59±0,20	25,11±0,47
Інтоксиковані $CdSO_4$	3,77±0,14*	28,63±0,52*
Інтоксиковані $Pb(NO_3)_2$	3,83±0,16*	29,10±0,61*

Примітка: \* –  $P \leq 0,05$  – відносно контролю.

Після інтоксикації іонами важких металів збільшується вміст ДК у крові і печінці щурів. Так у крові вміст ДК достовірно збільшився на 24% при інтоксикації кадмію сульфатом та на 26% – плюмбумом нітратом, а у печінці встановлено достовірне збільшення на 22% при інтоксикації кадмію сульфатом і на 24% – плюмбумом нітратом, порівняно з контрольною групою.

Антиоксидантна система захисту організму контролює і гальмує всі етапи вільнопарадикальних реакцій, починаючи від їх ініціації і закінчуючи утворенням ТБК-активних продуктів та шифових основ.

Дослідження активності супероксиддисмутази та каталази наведено в таблиці 3.

**Таблиця 3. Активність супероксиддисмутази (СОД) та каталази (КАТ) в тканинах щурів за дії іонів важких металів ( $M \pm m$ , n=8)**

Групи тварин	Кров		Печінка	
	СОД (ум.од)	КАТ (мкмоль/хв/мг білка)	СОД (ум.од)	КАТ (мкмоль/хв/мг білка)
Контроль	0,83±0,05	11,2±1,1	2,83±0,32	0,18±0,03
Інтоксиковані $CuSO_4$	0,68±0,02	10,1±0,9	2,68±0,17	0,12±0,02*
Інтоксиковані $ZnSO_4$	0,70±0,04	10,7±0,7	2,71±0,15	0,14±0,03*
Інтоксиковані $CdSO_4$	0,60±0,03*	8,5±0,9*	1,37±0,14*	0,09±0,01*
Інтоксиковані $Pb(NO_3)_2$	0,62±0,05*	8,9±0,8*	1,72±0,19*	0,11±0,01*

Примітка: \* –  $P \leq 0,05$  – відносно контролю.

Отже, інтоксикація іонами важких металів призводить до зниження активності СОД і КАТ у досліджуваних тканинах щурів, особливо при інтоксикації іонами кадмію та плюмбуму.

Дослідження активності глутатіонзалежних ферментів тканин щурів наведено в таблиці 4.

**Таблиця 4. Активність глутатіонпероксидази і глутатіонтрансферази та вміст відновленого глутатіону в тканинах щурів за дії іонів важких металів ( $M \pm m$ , n=8)**

Групи тварин	Кров			Печінка		
	ГП (ммоль/хв·л)	ГТ (ммоль/хв·л)	GSH (ммоль/л)	ГП (мкмоль/хв·мг білка)	ГТ (мкмоль/хв·мг білка)	GSH (мкмоль/мг·білка)
Контроль	0,273±0,12	68,0±4,71	0,379±0,04	0,37±0,02	0,48±0,05	0,80±0,04
Інтоксиковані $CuSO_4$	0,214±0,11*	35,7±3,68*	0,294±0,03*	0,34±0,03	0,46±0,07	0,67±0,05
Інтоксиковані $ZnSO_4$	0,211±0,14*	34,1±3,52*	0,276±0,07*	0,36±0,05	0,44±0,03	0,62±0,07
Інтоксиковані $CdSO_4$	0,170±0,09*	27,4±2,90*	0,252±0,02*	0,28±0,04*	0,39±0,02*	0,31±0,03*
Інтоксиковані $Pb(NO_3)_2$	0,181±0,10*	29,7±3,10*	0,263±0,05*	0,30±0,03*	0,41±0,04*	0,39±0,05*

Примітка: \* –  $P \leq 0,05$  – відносно контролю.

У крові щурів за умов інтоксикації купром сульфатом зменшується: активність ГП на 22%, ГТ на 47% і вміст відновленого глутатіону на 23%; цинком сульфатом – активність ГП на 23%, ГТ на 50% і вміст відновленого глутатіону на 27%; кадмієм сульфатом – ГП на 38%, ГТ на 60% і вміст відновленого глутатіону на 34%; плюмбумом нітратом – ГП на 34%, ГТ на 57% і вміст відновленого глутатіону на 31% відповідно порівняно з контрольною групою тварин.

За умов інтоксикації купром сульфатом і цинку сульфатом активність ГП і ГТ у печінці щурів змінюється несуттєво. Активність ГП і ГТ у печінці за умов дії іонів

кадмію зменшується на 25% і 19% відповідно порівняно з контролем. При дії іонів плюмбуму активність ГП і ГТ у печінці щурів зменшилась на 19% і 15% відповідно порівняно з контрольними тваринами.

Слід відмітити, що більш інтенсивно зменшувався вміст відновленого глутатіону в печінці інтоксикованих щурів:  $CuSO_4$  – на 17%,  $ZnSO_4$  – на 23%,  $CdSO_4$  – на 61%,  $Pb(NO_3)_2$  – на 51%, відносно контрольної групи тварин. Таку зміну, на наш погляд, можна пояснити тим, що глутатіон бере участь у захисних реакціях клітинних органел.

Виявлені нами зміни вказують на доцільність вивчення антиоксидантної системи з метою інтегральної оцінки

стану організму при шкідливій дії важких металів та пошуку нових засобів, що направлені на корекцію встановлених порушень, а також для розроблення заходів епіменації та профілактики отруєнь важкими металами.

**Висновки.** 1. Виявлено активацію пероксидного окиснення ліпідів у крові та чисельних тканинах печінки щурів за умов інтоксикації, а саме: інтоксикація купрум сульфатом призводить до збільшення ТБК-активних продуктів на 40% у крові та на 31% у печінці; цинку сульфатом – на 42% в крові та на 31% в печінці, кадмію сульфатом – на 66% в крові та на 38% в печінці; плюмбум нітратом – на 61% в крові та на 36% в печінці, відносно контрольної групи тварин.

2. За умов інтоксикації важкими металами знижується активність СОД і КАТ, особливо при інтоксикації іонами кадмію (на 28% і 24% – у крові та 52% і 50% – у печінці, відповідно) та плюмбуму (на 25% і 20% – у крові та 40% – у печінці, відповідно) відносно контрольної групи щурів.

3. Встановлено, що у крові щурів за умов інтоксикації купрум сульфатом зменшується: активність ГП на 22%, ГТ на 47%; цинку сульфату – активність ГП на 23%, ГТ на 50%; кадмію сульфату – ГП на 38%, ГТ на 60%; плюмбум нітрату – ГП на 34%, ГТ на 57 відповідно порівняно з контрольною групою тварин. У печінці щурів за умов інтоксикації купрум сульфатом і цинку сульфатом активність ГП і ГТ змінюється несуттєво. Активність ГП і ГТ у печінці за умов дії іонів кадмію зменшується на 25% і 19% відповідно порівняно з контролем. При дії іонів плюмбуму активність ГП і ГТ у печінці щурів зменшилась на 19% і 15% відповідно порівняно з контрольними тваринами.

4. Виявлено зменшення вмісту відновленого глутатіону в крові ( $\text{CuSO}_4$  – на 23%,  $\text{ZnSO}_4$  – на 27%,  $\text{CdSO}_4$  – на 34%,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  – на 31%) та печінці ( $\text{CuSO}_4$  – на 17%,  $\text{ZnSO}_4$  – на 23%,  $\text{CdSO}_4$  – на 61%,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  – на 51%) щурів за умов інтоксикації важкими металами.

#### Список використаних джерел

- Цудзевич Б.О. Ксенобіотики: накопичення, детоксикація та виведення з живих організмів: [монографія] / Б.О. Цудзевич, О.Б. Столяр, І.В. Калінін, В.Г. Юкало. – Київ- Тернопіль: Видавництво ТНТУ ім. І. Пулюя, 2012. – 384 с.
- Антиоксидантна система захисту організму / І.Ф. Бєленічев, С.Л. Левицький, Ю.І. Губський та ін. // Современные проблемы токсикологии. – 2002. – №3. – С. 24–31.
- Wickens A.P. Ageing and the free radical theory / A.P. Wickens // Respiratory Physiology. – 2001. – Vol.128, №3. – P. 379-391.
- Функціонування антиоксидантної системи щурів за дії кадмію / С.В. Хижняк, А.О. Прохорова, В.А. Грищенко та ін. // Український біохімічний журнал. – 2010. – Т. 82. – № 4. – С. 105-111.
- Хижняк С.В. Клітинні механізми токсичності кадмію [монографія] / С.В. Хижняк. – К.: Видавництво "LAT&K", 2010. – 213 с.
- Коржов В. І. Роль системи глутатіону в процесах детоксикації та антиоксидантної захисту / В. І. Коржов, В. Н. Жадан, М. В. Коржов // Журнал АМН України. – 2007. – №1. – Т. 13. – С. 3-20.
- Камышников В.С. Справочник по клініко-біохіміческій лабораторній діагностиці / В.С. Камышников. – Т 1. – Мінськ.: Із-во "Беларусь", 2000. – С. 90-128.
- Стальна И.Д. Современные методы в биохимии / И.Д. Стальная, Т.Г. Гаришвили; под ред. В.Н. Ореховича. – М. Медицина, 1977. – С. 66-68.

І. Калинин, канд. біол. наук  
Національний педагогічний університет імені М.П. Драгоманова, Київ, Україна,  
Б. Цудзевич, д-р біол. наук  
Київський національний університет імені Тараса Шевченко, Київ, Україна

#### ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ ОТРАВЛЕНИИ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ

Исследовано влияние тяжелых металлов (меди сульфата, цинка сульфата, кадмия сульфата и свинца азотнокислого) на пероксидное окисление липидов и активность глутатионзависимых ферментов крови и печени крыс при интоксикации. Показано, что введение крысам тяжелых металлов приводит к повышению содержания в крови и печени ТБК-активных продуктов и диеновых коньюгатов. При действии тяжелых металлов снижается активность каталазы и супероксиддисмутазы. Установлено снижение активности глутатионпероксидазы и глутатионтрансферазы под влиянием повышенных доз тяжелых металлов. При действии тяжелых металлов уменьшается содержание восстановленного глутатиона в тканях крыс.

Ключевые слова: медь, цинк, кадмий, свинец, кровь, печень, крысы, антиоксидантная система.

9. Гаврилов В.Б. Измерение диеновых коньюгатов 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. Костюк В.А. Простой и чувствительный метод определения СОД, основанный на реакции окисления кверцетина / В.А. Костюк, А.И. Потапович, Ж.И. Ковалева // Вопросы медицинской химии. – 1990. – №2 . – С. 88-91.

11. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы в биологическом материале / М.А. Королюк // Лабораторное дело. – 1988. – №2 . – С. 31-34.

12. Mannervik B. Glutathione peroxidase / B. Mannervik // Methods in enzymology. Academic Press. – 1985. – Vol. 113. – P. 490-495.

13. Власова С.Н. Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей / С.Н. Власова, Е.И. Шабунина, А.И. Переслегина // Лабораторное дело. – 1990. – № 8. – С. 19-21.

14. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups / G.L. Ellman // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 1959. – V. 82, №1. – P. 70-77.

15. Lowry O.H. Protein measurement with folin phenol reagent / O.H. Lowry, H. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall // Journal of Biological Chemistry. – 1951. – Vol. 193. – № 1. – P. 265-275.

16. Кучеренко М.Є. Сучасні методи біохімічних досліджень / М.Є. Кучеренко, Ю.Д. Бабенюк, В.М. Войціцький. – К.: Фітосоціоцентр, 2001. – С. 109-152.

#### Reference

- Tsudzelych B.A. Ksenobiotiki: nakopichenna, detoksicatsia ta vividennia z zhivich organismiv [monografiya] / Tsudzelych B.A., Stolar O.B., Kalinin I.V., Yukalo V.G. – Kyiv-Ternopil: Vidavnitstvo TNTU imeni I. Pulyuya; 2012. 384 p.
- Antioksidantna sistema zachistu organizmu / I.F. Byelenichev, E.L. Levitsky, Y. I. Gubskiy and others // Sovremennye problemy Toksikologii. 2002:3:24-31.
- Wickens A.P. Ageing and the free radical theory / A.P. Wickens // Respiratory Physiology. 2001:3:379-391.
- Funktionsuvanna antioksidantnoy systemy shuriv za diy cadmiyu / S.V. Khuzhnyak, A.A. Prokhorova, V.A. Gryschchenko and others // The Ukrainian biochemical journal. 2010:4:105-111.
- Khuzhnyak S.V. Klitynni mekhaniizmy toksichnosti cadmiyu / S.V. Khuzhnyak. – Kyiv: Edition "LAT&K"; 2010. 213 p.
- Korzhov V.I. Rol sistemy glutathiona v protsessah detoksikatsii i antioksidantnoy zashchity / V.I. Korzhov, V.N. Zhadan, M.V. Korzhov // Zhurnal AMN Ukrayini. 2007:1:3-20.
- Kamyshnikov V.S. Spravochnik po kliniko-biohimicheskoy laboratornoy diagnostike / V.S. Kamyshnikov. Minsk: Belarus. 2000: 90-128.
- Stalnaya Y.D. Sovremennye metody v biokhimii / Y.D. Stalnaya, T.G. Haryshyly; edited V.N. Orekhovich. – M.: Medicine. 1977:66-68.
- Gavrilov V.B. Izmerenie dienovykh conyugatov v plasme krovi po UF poglosheniyu geptanovykh i izopropanolnykh ekstraktov / V.B. Gavrilov, A.R. Gavrilov, N.F. Khmara // Laboratornoe delo. 1988:2:60-63.
- Kostyuk V.A. prostoy i chuvstvitelnyy metod opredeleniya SOD, osnovannyy na reaktsii okisleniya kvertsetina / V.A. Kostyuk, A.I. Potapovich, Zh.I. Kovaleva // Voprosy medetsinskoy khimi. 1990:2:88-91.
- Koroliuk M.A. Metod opredeleniya aktivnosti katalazy v biologicheskom materiale / M.A. Koroliuk // Laboratornoe delo. 1988: 2:31-34.
- Mannervik B. Glutathione peroxidase / B. Mannervik // Methods in enzymology. Academic Press. 1985:113:490-495.
- Vlasova S.N. Aktivnost glutationzavisimych fermentov eritrocytov pri khronicheskikh zaboliveniyach pecheni u detey / S.N. Vlasova, E.I. Shabunina, A.I. Pereslegina // Laboratornoe Delo. 1990:8:19-21.
- Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups / G.L. Ellman // Archives of Biochemistry and Biophysics. 1959:1:70-77.
- Lowry O.H. Protein measurement with folin phenol reagent / O.H. Lowry, H. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall // Journal of Biological Chemistry. 1951:1:265-275.
- Kucherenko N.E. Suchasni metody biokhimichich doslidzhen / N.E. Kucherenko, Y.D. Babenyuk, V.M. Voitsitsky. – Kyiv: Edition Fitosotsiotsentr. 2001:109-152.

Надійшла до редколегії 06.09.16

I. Kalinin, PhD  
 National Pedagogical Dragomanov University, Kyiv, Ukraine,  
 B. Tsudzevich, DSc  
 Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

### THE FUNCTIONING OF ANTIOXIDANT SYSTEM OF THE TISSUE OF RATS, POISONED WITH HEAVY METALS

To investigate the functioning of antioxidant system in blood and liver of rats, poisoned of heavy metals (copper sulfate, zinc sulfate, cadmium sulfate and lead nitrate) on lipid peroxidation and on activity of glutathione-dependent enzymes of blood and liver of poisoned rats are shown in this article. It is shown that the introduction of heavy metals in rats leads to an increase in blood and liver TBARS-products and diene conjugates. Under the action of heavy metals decreases the activity of catalase and superoxide dismutase. A reduction in the activity of glutathione peroxidase and glutathione transferase under the influence of high doses of heavy metals. Under the action of heavy metals reduced glutathione content in rat tissues.

**Key words:** copper, zinc, cadmium, lead, blood, liver, rats, antioxidant system.

УДК 579.26+579.22

Т. Кондратюк, канд. біол. наук,  
 В. Собко, канд. біол. наук,  
 Т. Берегова, д-р біол. наук, проф.,  
 Л. Остапченко, д-р біол. наук, проф.  
 Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

### ОСОБЛИВОСТІ РОЗВИТКУ ПРОДУЦЕНТУ МЕЛАНІНУ *PSEUDONADSONIELLA BRUNNEA* В УМОВАХ ВПЛИВУ НІТРАТУ СВИНЦЮ

Досліджено особливості розвитку антарктичних чорних дріжджоподібних грибів *Pseudonadsoniella brunnea* (продукенту меланіну) в умовах впливу важких металів (солей свинцю). Встановлено, що *Ps. brunnea* не втрачає життєздатності та розвивається за умов вмісту у середовищі нітрату свинцю концентрацією 100, 200, 500, 750 та 1000 мг/л (у переважному на катіон металу). Для культивування *Ps. brunnea* використано щільні та рідкі живильні середовища. В роботі застосовували спектрофотометричні методи дослідження. Інтенсивність синтезу меланіну чорними грибами під впливом нітрату свинцю визначали як відсоток по відношенню до контрольного варіанту (без внесення металу). Зазначено, що під впливом важких металів *Ps. brunnea* зазнає морфологічних змін. За концентрації 500–1000 мг/л Pb<sup>2+</sup> спостерігають збільшення пігментації досліджуваних культур (біосинтезу меланіну). Показано, що за умов розвитку під впливом токсичних металів у антарктичних чорних дріжджоподібних грибів *Ps. brunnea* збільшується активність ендофосфатаз (кислої та нейтральної). Отримані характеристики можна вважати вагомими властивостями, що обумовлюють стійкість *Ps. brunnea* до впливу таких стресових факторів, як токсичні метали.

**Ключові слова:** антарктичні мікроорганізми, важкі метали, металорезистентність, інтенсифікація меланіногенезу, активність ендофосфатаз.

**Вступ.** Широкі амплітуди адаптивних реакцій мікроскопічних грибів на дію різноманітних факторів середовища сприяють їх поширенню у найрізноманітніших умовах та на різних субстратах. Мікроорганізми, які зберігають життєздатність та розвиваються за умов дії екстремальних факторів довкілля, зокрема Антарктики, досліджуються з метою з'ясування адаптаційних механізмів, що обумовлюють стійкість цих мікроорганізмів до умов середовища та продукування ними біологічно-активних сполук [1; 2]. Аналіз літератури дає підстави виділити у грибів три принципово різних типи адаптивних стратегій, кожен з яких призводить до формування адаптацій, які дозволяють ефективно освоювати несприятливі середовище, але різними шляхами: активна стратегія, підпорядкування умовам середовища і уникнення несприятливих умов [3]. Активна стратегія характеризується як набуття адаптацій в несприятливих умовах, що дозволяє не тільки зберігати життєздатність (для грибів – це перебування у вигляді спор), а здатність до розмноження та розвитку в умовах під впливом агресивних факторів. Проявом цієї стратегії є вдосконалення міцеліальної організації талому грибів, набуття модульної будови, меланізація клітин тощо.

Виникнення впорядкованої макроскопічної організації грибних систем пропонується розглядати як результат процесу самоорганізації, оскільки передбачає збільшення і ускладнення елементів, що входять до їх складу, зміну режимів функціонування і т.д. При такому підході, відомому в біофізиці складних систем, можна стверджувати, що грибна система здатна займати дискретне число макроскопічно стійких дискретних станів на рівні колонії, спектр яких визначений морфологічним потенціалом грибів. Перехід між цими станами обумов-

люється зовнішніми управляючими параметрами (наприклад, склад, товщина субстрату, температура культивування і т.д.) В рамках даного підходу грибна колонія являє собою єдине ціле, складну біофізичну систему, що адаптується в процесі розвитку до змінних умов існування за рахунок колективних взаємодій елементів, що її складають один з одним і з середовищем [4-6].

Дослідження щодо стійкості мікроскопічних грибів до найрізноманітніших несприятливих умов середовища показують, що за умов дії різноманітних чинників спостерігаються різні прояви адаптації до стресових факторів. Набуття пігmentації, в першу чергу, меланізація клітин – також один із проявів активної адаптивної стратегії грибів до освоєння наземних місцеіснувань. На теперішній час проблемі впливу екстремальних факторів на антарктичні мікроорганізми приділяється значна увага на світовому рівні. Синтез екзометаболітів дозволяє антарктичним мікроорганізмам здійснювати процеси вилугування токсичних металів ( $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ) із скельних порід, включати їх у біологічні цикли. Як наслідок, відбуваються відповідні адаптаційні зміни, які призводять до існування в Антарктиці мікроорганізмів, високо резистентних до токсичних металів. Особливе місце серед них займають чорні дріжджоподібні гриби, які синтезують меланін [7].

В наших попередніх дослідженнях було з'ясовано та описано культурально-морфологічні, фізіологічно-біотичні та генетичні особливості штаму антарктичних чорних дріжджоподібних грибів (продукенту меланіну), що дозволило встановити його таксономічну приналежність до нового роду *Pseudonadsoniella* та нового виду *Pseudonadsoniella brunnea*. Отримані дані молекулярно-генетичних досліджень депозитовано у всесвітньому

Генетичному банку (№ КТ456204) [8]. Вказані чорні дріжджоподібні гриби *Ps. brunnea* синтезують і екскретують у культуральне середовище темний пігмент – поліфенолкарбоновий комплекс (ПФК). Останнє є важливою особливістю *Ps. brunnea*. Встановлено антиоксидантну, антибактеріальну, дерматотропну, ранозагоювальну властивості ПФК *Ps. brunnea* [9]. З урахуванням даних літератури щодо здатності меланіну абсорбувати різні токсичні сполуки, у тому числі важкі метали, дослідження металорезистентності *Ps. brunnea* є актуальним. Металорезистентні мікроорганізми є перспективними для створення нових універсальних природоохоронних біотехнологій.

Метою роботи було охарактеризувати особливості розвитку антарктичних мікроорганізмів (чорних дріжджоподібних грибів) *Pseudonadsoniella brunnea* за умов впливу токсичних металів (солей свинцю).

**Матеріали та методи.** Матеріалом для досліджень слугували дріжджоподібні гриби *Pseudonadsoniella brunnea* T.O. Kondratyuk & S.Y. Kondr., ізольовані з антарктичних біотопів, а також чорні дріжджоподібні гриби *Exophiala alcalophila* Goto & Sugiy, ізольовані з пошкодженого герметика в умовах високої вологості приміщення (м. Київ) [10]. Культивування мікроорганізмів здійснювали на стандартних агаризованих живильних середовищах: Malt extract agar (MEA, Merck KGaA, Німеччина), Nutrient Agar (NA, Sigma), агар Сабуро. Для визначення металорезистентності досліджуваних культур використовували рідке живильне середовище Рідер [11, 12], для вивчення активності ферментів фосфатаз – неагаризоване сусло. Оцінку росту на агаризованих середовищах проводили візуально (констатували наявність або відсутність колоній мікроорганізмів). Для *Ps. brunnea* кислотність середовищ (pH) становила 3,0-3,5, для *E. alcalophila* – 5-5,5. Застосовували іонометр РН-150МП (Білорусь). Для отримання pH заданої величини

замість 1Н або 1М соляної або сірчаної кислоти використовували стерильну 80%-у молочну кислоту з метою запобігання утворення нерозчинних солей-осадів із нітратом свинцю ( $Pb(NO_3)_2$ ). Культивування на рідких живильних середовищах проводили впродовж 20 діб (в умовах качалок-струшувачів культивування здійснювали перші 4–10 діб, 220 обертів/хв). Температура культивування становила  $20^\circ\pm 1^\circ C$ . Щільність суспензії чорних дріжджеподібних мікроорганізмів, які вносили в живильні середовища складала  $10^7$  кл/мл (підрахунок здійснювали із використанням камери Горяєва). Оцінку росту на рідких середовищах проводили, визначаючи оптичну густину суспензії на денситометрі DEN-1 (виробництва Biomerieux SA, Франція). Стійкість до солей токсичних металів визначали шляхом висіву досліджуваних культур мікроорганізмів на рідкі та агаризовані поживні середовища. У середовища вносили нітрат свинцю в концентрації 100, 200, 500, 750 та 1000 мг  $Pb^{2+}$ /л (у перерахунку на катіон металу). Вміст меланіну в біомасі тест-культур чорних дріжджеподібних грибів визначали шляхом кислотного та лужного вилучення. Інтенсивність синтезу меланіну чорними грибами під впливом токсичних металів вираховували у відсотковому співвідношенні до контрольного варіанту (без внесення металу) [13, 14]. Активність фосфатаз тест-культур мікроорганізмів визначали із застосуванням відповідних методик [15].

**Результати та їх обговорення.** В результаті проведених досліджень встановлено, що антарктичні мікроорганізми (чорні дріжджоподібні гриби) *Pseudonadsoniella brunnea* не втрачають життєздатності та розвиваються за умов вмісту у середовищі солей свинцю концентрацією 100, 200, 500, 750 та 1000 мг  $Pb^{2+}$ /л. На відміну від *Ps. brunnea* росту чорних дріжджів *Exophiala alcalophila* на середовищі із вмістом  $Pb(NO_3)_2$  750 та 1000 мг  $Pb^{2+}$ /л не спостерігали (таблиця)

**Таблиця. Життєздатність чорних дріжджоподібних грибів на агаризованих живильних середовищах в присутності 100 – 1000 мг  $Pb^{2+}$ /л**

Концентрація $Pb^{2+}$ , мг/л	Середовище	<i>Pseudonadsoniella brunnea</i>		<i>Exophiala alcalophila</i>	
100	MEA	+	+	+	+
	NA	+	+	+	+
200	MEA	+	+	+	+
	NA	+	+	+	+
500	MEA	+	+	+*	+*
	NA	+	+	+*	++
750	MEA	+*	+*	–	–
	NA	+*	+*	–	–
1000	MEA	+*	+*	–	–
	NA	+*	+*	–	–
Контроль		MEA	+	+	+
		NA	+	+	+

Примітка: Наявність (+) або відсутність (–) росту. +\* – слабкий ріст в порівнянні із варіантом контролю.

Характер кривих росту даних мікроорганізмів за умов розвитку на рідких живильних середовищах (100 – 500 мг  $Pb^{2+}$ /л та контроль) суттєвої різниці не мав, за виключенням варіанту, коли в середовище вносили 500 мг  $Pb^{2+}$ /л (рис. 1).

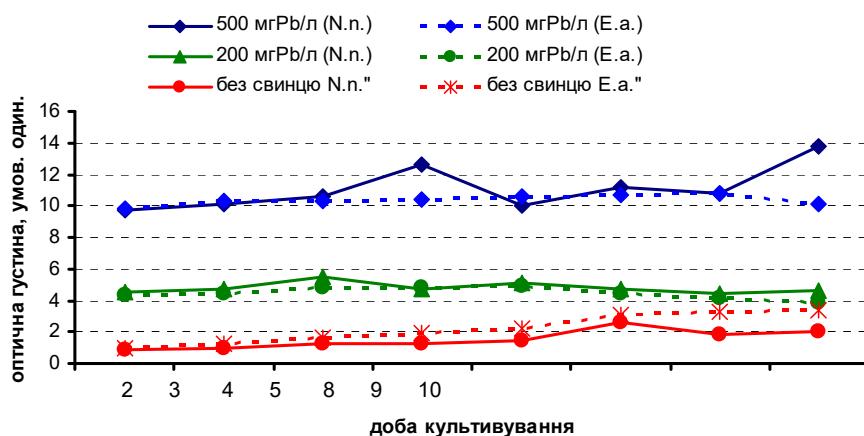


Рис. 1. Криві росту *Pseudonadsoniella brunnea* (N.n.) та *Exophiala alcalophila* (E. a.) в умовах впливу різних концентрацій нітрату свинцю

Найменший рівень приросту біомаси *Ps. brunnea* констатували що за умов наявності в середовищі солей свинцю в концентрації 750 та 1000 мг Pb<sup>2+</sup>/л (рис. 2).

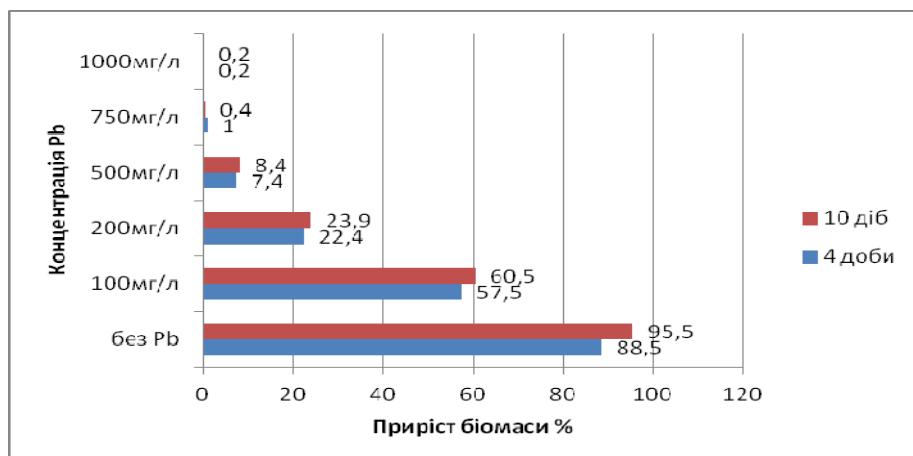


Рис. 2 Приріст біомаси *Pseudonadsoniella brunnea* в умовах впливу нітрату Pb<sup>2+</sup>

Однак криві росту *Ps. brunnea* характеризуються не тільки наявністю кількох піків, констатованих нами на 4-у та 10-у добу культивування у варіантах із внесенням 500 та 1000 мг Pb<sup>2+</sup>/л, а також збільшеними, в порівнянні із контрольними варіантами, показниками оптичної густини за умов росту в присутності нітрату свинцю (рис. 1, 3).

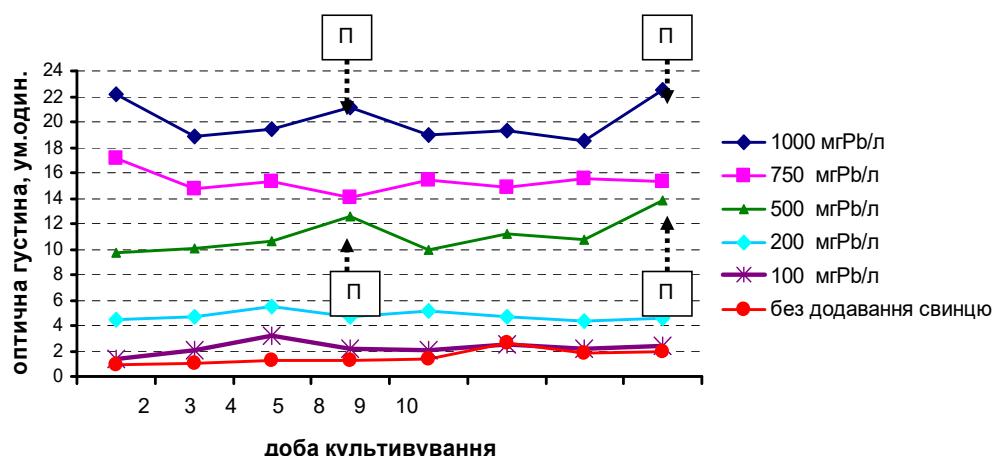


Рис. 3. Криві росту *Pseudonadsoniella brunnea* в умовах впливу різних концентрацій нітрату свинцю.  
П – пікове (різке) зростання показників оптичної густини.

Вважаємо, що цей факт може бути пов'язаний із виділенням в середовище темних екзопігментів (мела-

нінів), які синтезує *Ps. brunnea* в умовах впливу солей токсичних металів, як прояв захисної функції мікроорга-

нізму на дію стресового фактору. Підтвердженням нашої думки є дані літератури [13, 16], а також результати експериментів, отримані при вивченні дії біоцидів на мікроскопічні темнопігментовані гриби [17]. Оскільки здатність до синтезу таких метаболітів, як меланінові пігменти, та виділення їх тест-культурою *Ps. brunnea* у культуральне середовище, може зашкодити коректно інтерпретувати результати досліджень з використанням даних оптичної густини, нами було перевірено особливості росту культури *Ps. brunnea* після 10, 14 та 20 діб культивування в умовах впливу токсичних солей свинцю всіх досліджуваних концентрацій (висів на тверді живильні середовища, контроль росту та морфологічних особливостей *Ps. brunnea* в порівнянні з контролевими варіантами). Аналіз отриманих результатів підтверджує збереження життєздатності даної тест-культури в усіх варіантах експерименту. Нами встановлено, що чорні дріжджеподібні гриби *Ps. brunnea* та *Exophiala alcalophila* під впливом солей свинцю зазнають певних морфологічних змін після 10 діб культивування в рідкому середовищі (коли струшування на качалках було припинено): констатовано утворення поряд із дріжджовими клітинами значної кількості псевдоміцеліальних структур для *Ps. brunnea* та розвиток міцелію *E. alcalophila* (прояв диморфізму). В контрольних варіантах (середовища без додавання свинцю) утворення псевдоміцелію та міцелію не відбувалося, спостерігали тільки дріжджові клітини, що брунькуються. За концентрації в середовищі 750-1000 мг Pb<sup>2+</sup>/л в *Ps. brunnea* спостерігали також значну кількість темно-коричневих клітин збільшених розмірів, подібних до хламідоспор.

Дані наукової літератури свідчать, що закономірності формоутворення клітин мікроскопічних грибів (міцелій (M) ⇌ дріжджі (D)) можуть віддзеркалювати адаптаційні механізми цих організмів в умовах дії стресових факторів різної природи. Ці форми (міцелій, дріжджі) характеризуються своєю біосинтетичною активністю, різницею у будові та товщині клітинної стінки. Здатність переходити від однієї форми в іншу (M ⇌ D) вироблена в процесі еволюції як адаптивне пристосування, яке забезпечує гриbam найбільш успішну реакцію на зміни умов

середовища існування (температура, іони металів, освітлення тощо). Участь аденілатциклазної та фосфоінозитидної систем у грибів в цих процесах встановлено в дослідженнях з фармакологічними агентами. В роботах Л.К. Паніної [18] показано, що переходи M ⇌ D у патогенних чорних дріжджеподібних поліморфних грибів *Exophiala exophialae* (синоніми *Phaeosaccomyces exophialae*, *Exophiala dermatitidis*) можуть бути індуковані додаванням в живильне середовище іонів металів (цинку, міді та ін. більше 20 мг/л). Автор робить висновок, що під дією іонів металів в системі виникає нестабільність, яка порушує розвиток грибів у вигляді впорядкованої анізотропної міцеліальної структури та призводить систему до симетричної ізотропної дріжджової форми. При цьому час затримки відгуку біосистеми складає 5-10 діб, що співпадає із отриманими нами результатами (після 10 діб культивування спостерігали утворення псевдоміцелію та міцелію у *Ps. brunnea* та *Exophiala alcalophila*, відповідно). Здатність клітин грибів до переходу M ⇌ D за умов детермінованих зовнішніх впливів, зокрема іонів металів, можна співставити із звичайним для фізики фазовим переходом, в якому зміна температури замінюється створенням та посиленням таких умов, як зміна концентрації іонів металів в середовищі. Головна відмінна наших результатів від викладених вище даних літератури в тому, що під впливом іонів токсичних металів в досліджуваних нами концентраціях у *Pseudonadsoniella brunnea* та *Exophiala alcalophila* нами констатовано протилежний перехід, а саме D ⇌ M. Найяскравіше цей процес проявляється за умов впливу солей свинцю в концентрації 500 мг Pb<sup>2+</sup>/л. Отже, здатність досліджених тест-культур мікроорганізмів до поліморфних перебудов можна вважати однією із важливих властивостей, що обумовлює їхню стійкість до впливу таких стресових факторів, як токсичні метали.

В результаті проведених нами досліджень виявлено, що в залежності від концентрації нітрату свинцю, який вносили в середовище, підвищувалася інтенсивність пігментації чорних дріжджеподібних грибів *Ps. brunnea*, (рис. 4).

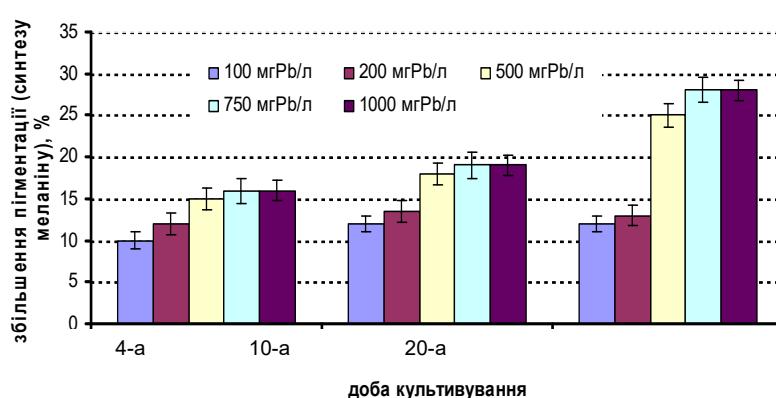


Рис. 4. Інтенсифікація пігентації чорних дріжджеподібних грибів *Pseudonadsoniella brunnea* під впливом нітрату свинцю в залежності від концентрації (у % в порівнянні з контролевим варіантом)

Як видно з рис. 4, внесення солей свинцю у середовище в концентрації 500–1000 мг Pb<sup>2+</sup>/л на 20-у добу культивування призводить до максимальної інтенсивності синтезу пігментів (меланіну) культурою чорних дріжджеподібних грибів *Ps. brunnea* (25 та 28% відповідно).

Отже, аналіз отриманих результатів підтверджує нашу думку про те, що збільшення значень та наявність характерних пікових показників оптичної густини в порівнянні із контролевими варіантами (рис. 1,3) пов'язано із виділенням в середовище пігментів меланінової природи, які синтезує *Ps. brunnea*.

В результаті проведених досліджень встановлено, що активність ендо- та екзофосфатаз *Ps. brunnea* різниеться від такої в *Exophiala alcalophila* в умовах впливу іонів нітрату свинцю. Так, у стійких до впливу 500 мг Pb<sup>2+</sup>/л антарктичних чорних дріжджів *Ps. brunnea* актив-

ність екзофосфатаз була нижчою, ніж у *Exophiala alcalophila*. Навпаки, активність ендофосфатаз (кислої

та нейтральної) в таких самих умовах булавищою у *Ps. brunnea* (рис. 5).

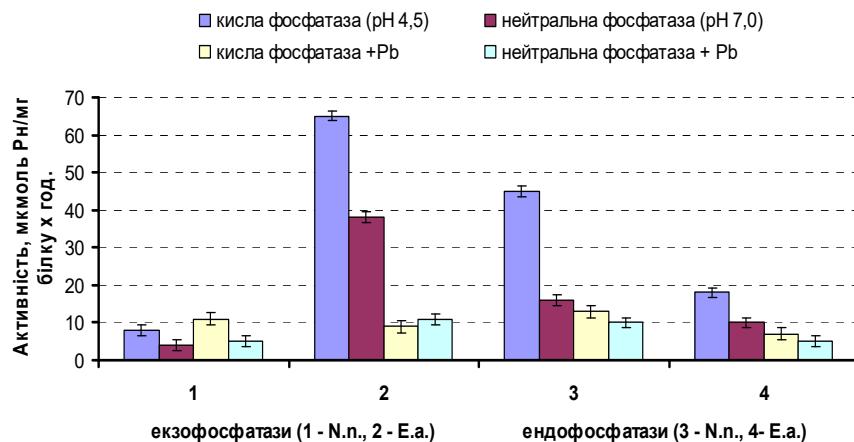


Рис. 5. Активність фосфатаз досліджуваних культур мікроорганізмів *Ps. brunnea* (N. n.) та *Exophiala alcalophila* (E. a.)

Отримані нами дані підтверджують існуючі дані наукової літератури щодо змін фосфатазної активності організмів в умовах впливу стресових факторів [15, 19]. Відомо, що екзофосфати приймають участь у безпосередньому забезпеченні клітин фосфором за рахунок гідролізу екзогенних субстратів, а однією із найважливіших функцій ендофосфатаз грибів є участь в процесі енергозабезпечення організму (участь в поліфосфатному обміні, підтримка рівноваги в системі аденилових нуклеотидів). Щодо поліфосфатів, то дослідження останніх років переконливо доводять, що в життєдіяльності живих організмів важливу роль грають не лише такі добре досліджені біополімери, як білки, нуклеїнові кислоти, полісахариди та деякі речовини ліпідної природи, але і такі порівняно малодосліджені сполуки, як високомолекулярні неорганічні поліфосфати. Встановлено, що високомолекулярні лінійні неорганічні ПФ значно поширені в живих організмах і присутні в клітинах прокаріот і еукаріот, в тому числі у вищих тварин і рослин. Поліфосфати є невід'ємними компонентами клітин всіх царств живих організмів, і макроергічними сполуками, які відіграють важливу роль в біоенергетиці живих клітин [20, 21], входять до складу комплексів з полі-β-оксімасляною кислотою, регулюючи транспорт іонів та водорозчинних речовин. У нижчих еукаріот, існування яких в значній мірі залежить від умов навколошнього середовища, високомолекулярні поліфосфати приймають участь у метаболічному структурному контролі обміну речовин. Проблема біохімічної адаптації живих організмів до умов існування є одною з головних в сучасних біологічних дослідженнях. Дія різноманітних стресових впливів на організм, викликає універсалну адаптивну відповідь, яка проявляється в різноманітних внутрішньоклітинних реакціях і пов'язана із змінами в системі енергозабезпечення організму. Отже, біохімічні механізми, які забезпечують стійкість до дії стресових факторів, енергозалежні. При розгляді фосфорного обміну еукаріот особлива увага приділяється реакціям, в яких у якості донорів неорганічного фосфату та енергії виступають нуклеозидтрифосфати. У мікроскопічних грибів має місце переважання високомолекулярних неорганічних поліфосфатів над системою аденилових нуклеотидів. Крім того, показана участь цих сполук не тільки в процесах накопичення та використання енергії, але і в підтриманні іонного балансу, в структурній організації клітинної стінки, в регуляції активності фермен-

тів, які беруть участь в метаболізмі ДНК та РНК, полісахаридів, в регуляції експресії генів, констатовано зміну активності даних ферментів за умов дії різних екстремальних факторів, зокрема під впливом олово- та ртутьорганічних сполук в концентраціях, близьких до сублетальних, збільшується активність ендофосфатаз [15, 19, 22, 23]. Все вище зазначене вказує на поліфункціональність неорганічних ПФ в клітині і можливу значну роль в формуванні механізму адаптації грибів до різноманітних екстремальних умов.

**Висновки.** Встановлено, що антарктичні мікроорганізми (чорні дріжджоподібні гриби) *Pseudonadsoniella brunnea* не втрачають життєздатності та розвиваються за умов вмісту у середовищі солей свинцю концентрацією 100–1000 мгPb<sup>2+</sup>/л (за катіоном металу).

Одним із механізмів металорезистентності антарктичних мікроорганізмів до впливу солей свинцю може бути включення компонентів фосфатного обміну клітини в процесі адаптації до цього стресового фактору.

Здатність меланінвмісних дріжджоподібних грибів до поліморфних перебудов, інтенсифікація пігментації культурального середовища (біосинтезу меланіну) та зміни у поліфосфатному обміні в бік збільшення активності ендофосфатаз є вагомими властивостями, що обумовлюють їхню металорезистентність (стійкість до впливу таких стресових факторів, як токсичні метали). Отримані дані щодо змін у формоутворенні *Ps. brunnea* потребують подальших детальних досліджень.

#### Список використаних джерел

- Kostadinova N., Isolation and Identification of Filamentous Fungi from Island Livingston, Antarctica /N. Kostadinova, E. Krumova, S. Tosi [et al.]/ // Biotechnology and Biotechnological Equipment, Special Issue: XI Anniversary scientific conference. – 2009. – V. 23, Supplement 1. – P. 267-270. dx.doi.org/10.1080/13102818.2009.10818416
- Margesin R. Characterization of cold-active pectate lyases from psychrophilic *Makia frigida*. / R. Margesin, V. Fauster, P.A. Fonteyne // Lett. Appl. Microbiol. – 2005. – 40 (6). – P. 453–459. http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01704.x
- Чернов И.Ю., Марфенина О.Е. Адаптивные стратегии грибов в связи с освоением наземных местообитаний / И.Ю.Чернов, О.Е. Марфенина // Палеопочвы и индикаторы континентального выветривания в истории биосферы. Серия "Гео-биологические системы в прошлом". – М.: ПИН РАН, 2010. – С. 95 – 111.
- Жданова Н.Н. Василевская А.И. Экстремальная экология грибов в природе и эксперименте. – К.: Наукова думка, 1982. – 168 с.
- Нотов А.А. О специфике функциональной организации и индивидуального развития модульных объектов // Журнал общей биологии. – 1999. – Т. 60, № 1. – С. 14 – 32.
- Moore D. Fungal Morphogenesis. – Cambridge University Press, 1998. – 469 p.

7. Таширев А.Б. Антарктические микроорганизмы, устойчивые к высоким концентрациям  $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  и  $CrO_4^{2-}$  / А.Б. Таширев, В.А. Романовская, И.Б. Сиома [и др.] // Доповідь НАН України. – 2008. – № 1. – С. 169-176.
8. Kondratyuk T.O. *Pseudonadsoniella brunnea* (Meripilaceae, Agaricomycotina), a new brown yeast-like fungus producing melanin from the Antarctic; with notes on nomenclature and type confusion of *Nadsoniella nigra* / T.O. Kondratyuk, S.Y. Kondratyuk, O.O. Morgaienko [et al.] //Acta Botanica Hungarica. – 2015, 57(3-4). – Р. 291-320. doi: 10.1556/034.57.2015.3-4.5
9. Taburets O.V. The effect of "Melanin-Gel" on the wound healing /O.V. Taburets, O.O. Morgaienko, T.O. Kondratyuk [et al.] // Res. J. Pharm., Biol. Chem. Sci. – 2016. – Vol. 7 (3). – Р. 2031-2038.
10. Кондратюк Т. Чорні дріжджеподібні гриби *Exophiala alcalophila* Goto et Sugiy из пошкодженого герметика в умовах високої вологості приміщення //Modern Phytomorphology. 2013. – № 3. – 225-229.
11. Лозовая О.Г. Токсичность свинца и влияние его на физиологическую активность дрожжей // Совр. пробл. токсикол. – 2004. – №2. – С. 60–64.
12. Білоіваненко С.О. Резистентність *Rhodotorula rubra* G2/1 до важких металів та їх адсорбція / С.О. Білоіваненко, А.Є. Бухтіяров //Мікробіологія і біотехнологія. – 2013. – №1. – С. 81–88.
13. Скорбина Е.А. Разработка технологии получения и исследования активности меланинсодержащих препаратов. Диссертация к.б.н., спец. 03.00.23 – біотехнологія., Ставрополь, 2005. – 139 с.
14. Фомина М.А. Влияние света на меланиногенез *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de Vries / М.А. Фомина, Е.Н. Громозова, В.С. Подгорский //Биополимеры и клетка. – 1996. – Т.12, № 1. – С. 58–63.
15. Смирнов В.Ф. Активность фосфатаз микроскопических грибов, устойчивых и неустойчивых к действию металлорганических соединений /В.Ф. Смирнов, О.Н. Смирнова, Е.Л. Захарова [и др.] // Вестник Нижегородского гос. ун-та. Серия Биология. – 2001. – № 1(2). – С.113–118.
16. Жданова Н.Н. Меланинсодержащие грибы в экстремальных условиях. / Н.Н. Жданова, А.И. Василевская – К.: Наукова думка, 1988. – 196 с.
17. Сухаревич В.И. Влияние биоцидов различной природы на синтез пигментов у целлюлозоразрушающих грибов / В.И. Сухаревич, Т.В. Зайцева, Н.Г. Медведева //Микол. и фитопатол. – 2000. – 34, Вып. 3. – С. 39 – 42.
18. Панина Л.К. Структурно-функциональная реорганизация микромицетов в процесах формообразования и роста на труднодоступных субстратах. Автореф. диссерт. Д.б.н. 03.00.02 – биофизика. – СПб, 2000. – 30 с.
19. Seufferheld Manfredo J. Role of Polyphosphates in Microbial Adaptation to Extreme Environments. /Manfredo J. Seufferheld, Héctor M. Alvarezand, Maria E. Farias //Appl. Environ. Microbiol. – 2008. – Vol. 74, no. 19. – Р. 5867-5874. doi: 10.1128/AEM.00501-08
20. Кулаев И.С. Высокомолекулярные неорганические полифосфаты: биохимия, клеточная биология, биотехнология. / И.С. Кулаев, В.Н. Вагабов, Т.В. Кулаковская – Москва: Науч. Мир, 2005. – 215 с.
21. Цейслер Ю. Неорганичні поліфосфати як незамінні структурні компоненти живих організмів. /Ю. Цейслер, В. Мартинюк, І. Лук'яненко // Вісник Київського нац. університету ім. Т. Шевченка. Біологія. – 2012. – №61. – С. 6 – 10.
22. Перцева А.Д. Влияние экстремальных воздействий на содержание полифосфатов и полифосфатную активность у микромицетов-деструкторов полимерных материалов /А.Д. Перцева, В.Ф. Смирнов, О.В. Воронина //Микол. и фитопатол. – 2005. – 39, № 1. – С. 53-58.
23. Кулаковская Е.В. Неорганические полифосфаты и чувствительность клеток *Saccharomyces cerevisiae* к мембраноповреждающим агентам / Е.В. Кулаковская, В.М. Вагабов, А.Ю. Иванов //Микробиология. – 2011. – Т 80, № 1. – С. 13 – 17.
- Reference**
- Kostadinova N., E. Krumova, S. Tosi [et al.] Isolation and Identification of Filamentous Fungi from Island Livingston, Antarctica // Biotechnology and Biotechnological Equipment, Special Issue: XI Anniversary scientific conference. – 2009. – V. 23, Supplement 1. – P. 267-270. doi.org/10.1080/13102818.2009.10818416
  - Margesin R. V., Fauster, P.A. Fonteyne Characterization of cold-active pectate lyases from psychrophilic *Mrakia frigida*.// Lett. Appl. Microbiol. – 2005. – 41, № 1. – С. 13–17.
  - Т. Кондратюк, канд. біол. наук, В. Собко, канд. біол. наук, Т. Береговська, д-р біол. наук, проф.,  
Л. Остапченко, д-р біол. наук, проф.,  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

## ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ ПРОДУЦЕНТА МЕЛАНИНА *PSEUDONADSONIELLA BRUNNEA* В УСЛОВИЯХ ВЛИЯНИЯ НИТРАТА СВИНЦА

Исследованы особенности развития антарктических черных дрожжеподобных грибов *Pseudonadsoniella brunnea* (продуцента меланина) в условиях влияния тяжелых металлов (солей свинца). Установлено, что *Ps. brunnea* сохраняет жизнеспособность и развивается в условиях содержания в питательной среде нитрата свинца в концентрации 100, 200, 500, 750 и 1000 мг/л (в пересчете на катион металла). Культивирование *Ps. brunnea* проводили на плотных (агаризованных) и жидких питательных средах. В работе использовали спектрофотометрические методы исследований. Интенсивность синтеза меланина черными грибами под влиянием нитрата свинца определяли в процентном соотношении, сравнивая с контрольным вариантом (без внесения металла). Показано, что под влиянием тяжелых металлов происходят морфологические изменения *Ps. brunnea*. При концентрации 500–1000 мг/л Pb<sup>2+</sup> наблюдалось увеличение пигментации исследованных культур (биосинтеза меланина). Установлено, что при условии развития под влиянием

Надійшла до редколегії 15.11.16

токсических металлов у антарктических черных дрожжеподобных грибов *Ps. brunnea* увеличивается активность эндофосфатаз (кислой и нейтральной). Полученные характеристики можно считать важными свойствами, которые обуславливают стойкость *Ps. brunnea* к воздействию таких стрессовых факторов, как токсические металлы.

**Ключевые слова:** антарктические микроорганизмы, тяжелые металлы, металлорезистентность, интенсификация меланиногенеза, активность эндофосфатаз.

T. Kondratuk, PhD., V. Sobko, PhD., T. Beregova, DSc., L. Ostapchenko, DSc  
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

## FEATURES OF MELANIN PRODUCER PSEUDONADSONIELLA BRUNNEA UNDER THE INFLUENCE OF NITRATE LEAD

The features of Antarctic black yeast fungus *Pseudonadsoniella brunnea* (melanin producer) under the influence of heavy metals (lead salts) are studied. It is found that *Ps. brunnea* does not lose viability and developing under the conditions of nitrate content of lead concentrations of 100, 200, 500, 750 and 1000 mg / l (in terms of metal cation) in the environment. Solid and liquid culture media were used for the cultivation of *Ps. brunnea*. Spectrophotometric research methods were used within this study. The intensity of the synthesis of melanin by black fungi under the influence of lead nitrate was determined as a percentage relative to the control variant (media without adding metal). Indicated that *Ps. brunnea* undergoes morphological changes under exposure to heavy metals. Increasing in pigmentation of cultures studied (melanin biosynthesis) was observed with the concentration of 500-1000 mg / l Pb<sup>2+</sup>. Increased activity endofosfataz (acidic and neutral) in Antarctic black yeast fungi *Ps. brunnea* in conditions of the development under the influence of toxic metals is also shown. The described parameters can be considered as significant properties that contribute to the stability of *Ps. brunnea* to the effects of stress factors such as toxic metals.

**Keywords:** Antarctic microorganisms, heavy metals, metal resistance, intensification of melanogenesis, the activity of endogenous phosphatases.

УДК 612.82/.83; 612.821

А. Охрій, асп., Т. Куценко, канд. біол. наук, М. Макарчук, д-р біол. наук  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

## ВПЛИВ ЗАНЯТЬ МУЗИКОЮ НА ВИКОНАННЯ ПРЯМОГО І ЗВОРОТНОГО ТЕСТІВ СТРУПА

Оцінено роботу системи уваги за виконанням прямого і зворотного тестів Струпа у музикантів і немузикантів. Обстежуваними були студенти Національної музичної академії ім. П.Чайковського (музиканти) та їх ровесники з ННЦ "Інститут біології та медицини" без музичного досвіду (немузиканти). Обстежувані проходили прямий та зворотний тести Струпа з наданням відповідей обома руками. При прямому тесті Струпа ефект інтерференції проявляється в обох групах для обох рук. За результатами аналізу конгруентних стимулів музиканти не мали моторної асиметрії, а їх відповіді були швидшими, ніж у немузикантів. Неконгруентні стимули збільшували кількість помилок обох рук у немузикантів, а у музикантів – лише лівої руки. При зворотному тесті Струпа ефект інтерференції у немузикантів виявляється для обох рук, у музикантів – тільки для лівої. Загальна кількість помилок не відрізнялася між групами. Музиканти і немузиканти мають однакову ефективність роботи системи уваги за загальною кількістю помилок. Неконгруентні стимули приводять до посилення когнітивного контролю лівої півкулі і появи моторної асиметрії у музикантів. У немузикантів прояв асиметрії виявлені під час аналізу і конгруентних, і неконгруентних стимулів.

**Ключові слова:** музиканти, немузиканти, прямий тест Струпа, зворотний тест Струпа.

**Вступ.** Накопичується все більше наукових даних, які свідчать про те, що вплив занять музикою на нервову систему людини є комплексним: він не обмежується лише змінами, які лежать в основі формування професійних навичок музиканта, а "передається" й на інші психо- і нейрофізіологічні функції, які можуть і не бути безпосередньо зв'язаними з музичними здібностями. Зокрема встановлено, що музиканти, у порівнянні з обстежуваними без музичного досвіду (немузикантами), мають переваги в когнітивних завданнях, демонструючи вищі результати в тестах на вербалну [1] та оперативну пам'ять [2, 3], у вирішенні математичних [4, 5, 6] і візуально-просторових задач [7], мають вищий показник IQ тощо [8, 9]. Зазначимо, що розуміння впливу занять музикою на когнітивну сферу людини (пам'ять, увагу) може стати перспективним напрямком з точки зору реабілітаційної і педагогічної практики [10], проте даний вплив є предметом дискусій і до кінця не вивчений.

У попередніх дослідженнях ми з'ясували, що музиканти не мали міжпівкульної різниці в часі появи компонентів N2, P3, N3 викликаних потенціалів головного мозку на тонові сигнали, у той час як у немузикантів зазначені піки у лівій півкулі мали довший латентний період (ЛП), ніж у правій [11], тобто виявлялася міжпівкульна асиметрія. Крім того, компонент P3 у лівій півкулі немузикантів виявлявся пізніше, ніж у музикантів, що, ймовірно, вказує на більш швидку оцінку стимулу у представників останньої групи. Подібні результати були також виявлені нами під час тестування ефекту Струпа з визначенням просторової локалізації стимулів – музиканти досягали значуще коротшого часу експозиції подразників, ніж немузиканти, що свідчить на користь бі-

льшої швидкості аналізу стимулів в обстежуваних з музичним досвідом [12]. Ми припускаємо, що під час виконання когнітивних завдань у музикантів прояв функціональної асиметрії є меншим, ніж у немузикантів, що, можливо, є основою кращого виконання тестів обстежуваними цієї групи. Для подальшого з'ясування нашого припущення у даному дослідженні ми вирішили застосувати прямий і зворотний тести Струпа [13], які вважаються одними із еталонних тестів для оцінки системи спрямованої уваги та ефекту інтерференції [14]. Методика, яка була застосована в даному дослідженні, є комп'ютеризованою модифікацією цього тесту і передбачає надання відповідей обома руками, що дозволяє прослідкувати прояв міжпівкульної асиметрії під час тестування.

Суть тесту Струпа полягає у поданні обстежуваним слів, що означають назви кольорів (наприклад, "ЗЕЛЕНИЙ"). Ці слова можуть бути висвітлені як "своїм" кольором (конгруентні подразники), так і мати інше забарвлення, яке не співпадає з семантичним значенням пред'явленого слова (неконгруентний подразник). Конгруентні подразники аналізуються швидше і з меншою кількістю помилок, ніж неконгруентні. Це явище називається ефектом Струпа, або ефектом інтерференції. Не дивлячись на свою простоту, механізми, що лежать в основі виникнення даного ефекту, є до кінця нез'ясованими. З психофізіологічної точки зору ефект Струпа може бути пояснений конкуренцією двох потоків інформації, які призводять до появи конфліктуючих відповідей [15]. Щоб невірна відповідь не надалася, необхідна активізація пригнічення нерелевантної інформації і посилення впливу інформації, необхідної в даний момент для виконання завдання [16, 17]. Поява конкуренції між

двою потоками інформації активує передню поясну звивину, що, в свою чергу, залучає ресурси дорзоплатеральної префронтальної кори (передня система уваги). Включення фронтальних нейронних мереж підвищує когнітивний контроль над завданням, результатом чого стає покращення виконання тесту [18].

Метою даного дослідження є оцінка ефективності системи уваги за виконанням прямого і зворотного тестів Струпа у музикантів і немузикантів.

#### Матеріали і методи

В обстеженні взяли участь 66 студентів обох статей. Група музикантів ( $n=28$ ) була представлена студентами Київської національної музичної академії ім. П. Чайковського, які мали від 10 до 14 років досвіду гри на певному музичному інструменті. До групи немузикантів ( $n=38$ ) увійшли студенти ННЦ "Інститут біології" Київського національного університету імені Тараса Шевченка без будь-якої попередньої музичної чи співочої практики. Усі обстежувані були праворукими, без психічних чи неврологічних порушень. Вік обстежуваних коливався від 18 до 25 років ( $M=22\pm2.5$ ).

У даному дослідженні було застосовано комп'ютеризовані прямий і зворотний тести Струпа, розроблені на кафедрі фізіології людини і тварин [19]. Обстежувані розташовувалися перед монітором комп'ютера, на який послідовно у псевдовипадковому порядку подавалися слова "ЗЕЛЕНИЙ" і "КРАСНЫЙ", написані зеленим або червоним кольором, незалежно від семантичного значення слів. Загальна кількість подразників – 240. У прямому тесті Струпа релевантною інформацією є колір, а семантичне значення слова має ігноруватися: обстежувані отримували інструкцію натискати правою рукою

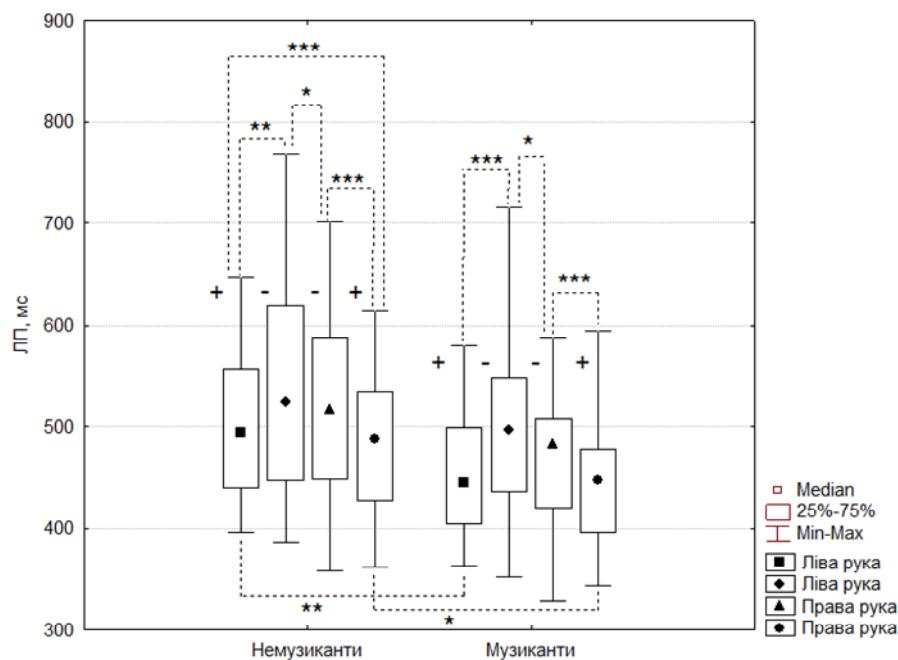
клавішу "P" на клавіатурі комп'ютера (англійська розкладка) в якості реакції на слова, висвітлені червоним кольором, та клавішу "Q" лівою рукою в якості реакції на слова, забарвлені зеленим кольором. В зворотному тесті Струпа релевантною інформацією є семантичне значення слова, у той час як інформація про колір слова має бути проігнорована. Обстежувані мали натискати правою рукою клавішу "P" на слово "КРАСНЫЙ" та клавішу "Q" лівою рукою на слово "ЗЕЛЕНИЙ".

У усіх субтестах реєструвався латентні періоди (ЛП) правильних реакцій з точністю до 10 мс та кількість помилкових відповідей кожною рукою, що слугувало критерієм ефективності функціонування системи уваги.

Статистичний аналіз даних проводився за допомогою пакету STATISTICA (StatSoft, USA, 2001). Нормальность розподілів перевіряли за тестом Шапіро-Вілка. Оскільки більша частина даних мала розподіл, відмінний від нормального ( $p<0,05$ ), то для опису випадкового розподілу використовували медіану ( $M_e$ ), а також верхній і нижній квартилі ([25; 75]). Для порівняння двох незалежних вибірок використовували критерій Манна-Вітні, залежних – критерій Вілкоксона. Критичний рівень значущості ( $p$ ) при перевірці статистичних гіпотез приймався рівним 0,05 і на графіках позначався як \*\* ( $p<0,01$  – \*\*\*,  $p<0,001$  – \*\*\*\*).

#### Результати і обговорення

Виявлено, що всі обстежувані, незалежно від наявності музичного досвіду, мали виражений ефект інтерференції під час виконання прямого тесту Струпа, що проявлявся у подовженні латентних періодів реакції обох рук у випадках пред'явлення неконгруентних стимулів (рис. 1).



**Рис. 1. Латентні періоди реакцій правої і лівої рук музикантів та немузикантів під час проходження прямого тесту Струпа.**  
"+" – конгруентний стимул, "-" – неконгруентний стимул.

У випадку подачі конгруентних стимулів музиканти надавали відповіді швидше, ніж немузиканти, що було виявлено як для правої, так і для лівої руки (див. рис. 1).

У межах групи немузикантів латентні періоди реакцій правої руки були коротшими, ніж лівої, у той час як у групі музикантів подібна закономірність виявлялася лише під час пред'явлення неконгруентних стимулів (див. рис. 1).

За загальною кількістю помилок не було знайдено відмінностей між музикантами та немузикантами під час проходження прямого тесту Струпа. Проте, виявлено, що немузиканти у випадках неспівпадіння кольору і значення слова помиллялися більше як правою, так і лівою рукою, у той час як музиканти – лише лівою рукою (рис. 2).

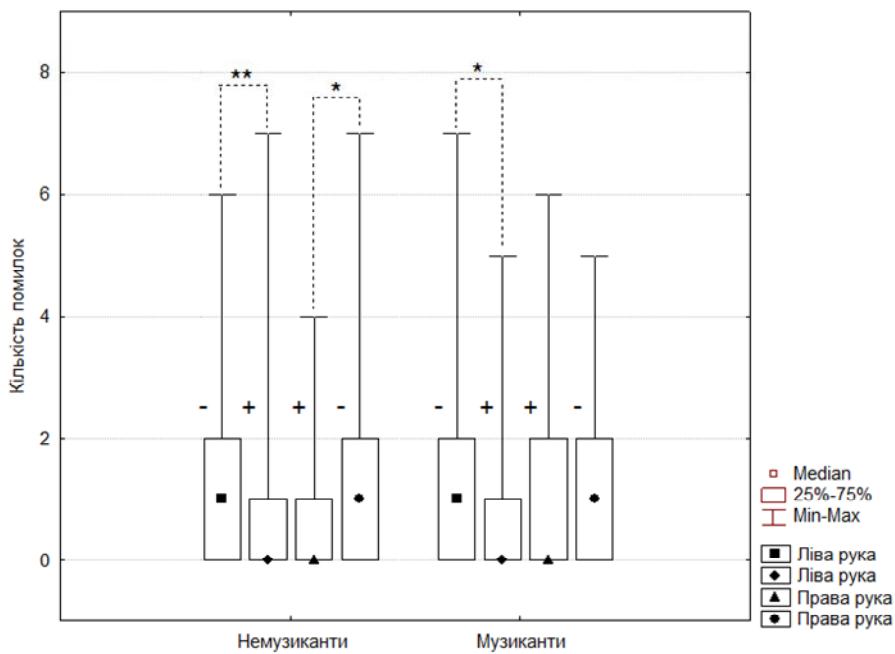


Рис. 2. Кількість помилок, допущених музикантами і немузикантами під час проходження прямого тесту Струпа.  
"+" – конгруентний стимул, "–" – неконгруентний стимул

Під час проходження зворотного тесту Струпа ефект Струпа у групі немузикантів виявляється як для правої, так і лівої руки, а у музикантів – лише для лівої (рис. 3).

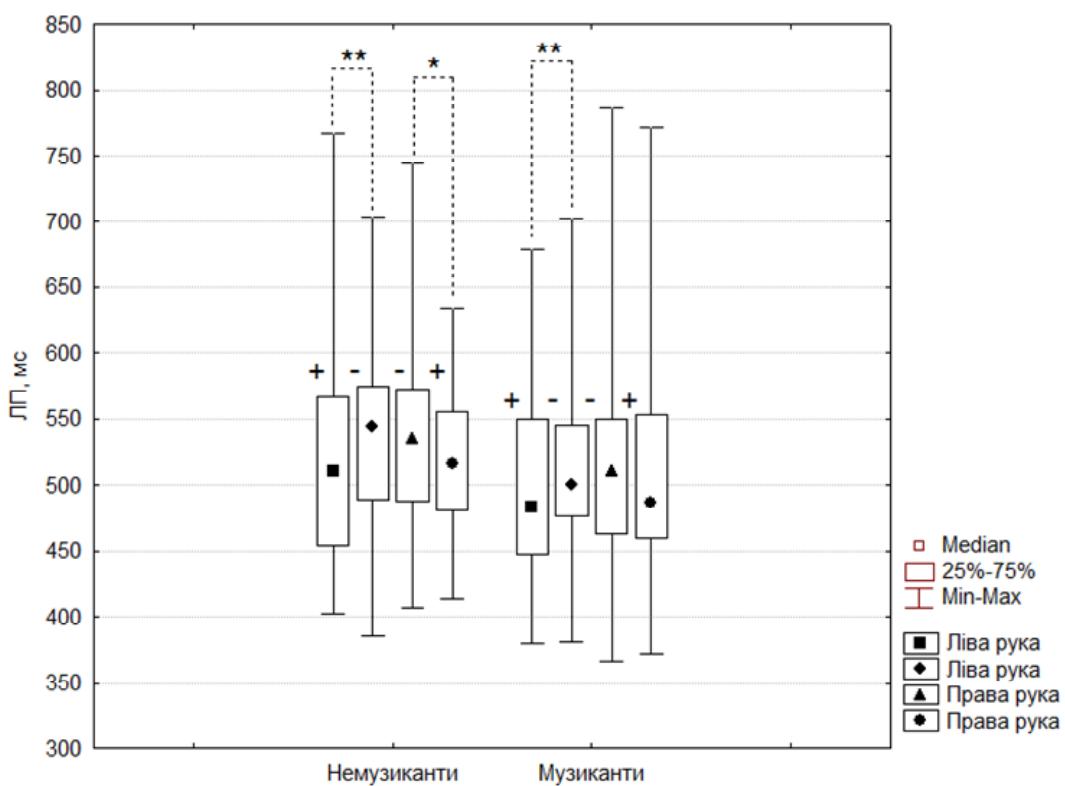


Рис. 3. Латентні періоди реакцій правої і лівої рук музикантів та немузикантів під час проходження зворотного тесту Струпа.  
"+" – конгруентний стимул, "–" – неконгруентний стимул

Відмітимо, що у цьому субтесті не було виявлено відмінностей між музикантами і немузикантами стосовно загальної кількості помилок. Крім того, у межах груп не виявлено відмінностей стосовно кількості помилок в

залежності від співпадіння чи неспівпадіння значення слова і його кольору.

Таким чином, результати даного дослідження вказують на наявність деяких відмінностей в організації когнітивних функцій у музикантів та немузикантів під час ви-

коання прямого та зворотного тесту Струпа. Виявлено, що ефект інтерференції під час прямого тесту Струпа проявляється однаково як у музикантів, так і у немузикантів для обох рук. При цьому нами не було виявлено відмінностей між латентними періодами реакцій музикантів і немузикантів у випадку подачі неконгруентних стимулів та відмінностей у кількості допущених помилок, що вказує на однаковий прояв інтерференції та однакову ефективність роботи системи уваги у представників обох груп. Однак, за результатами зворотного тесту Струпа нами було виявлено, що ефект інтерференції у групі немузикантів проявляється під час надання відповідей як правою, так лівою рукою, у той час як у музикантів – лише лівою. На нашу думку, цей факт можна пояснити сильнішим когнітивним контролем з боку лівої півкулі музикантів порівняно з правою. Примітно, що дана закономірність проявила саме під час зворотного тесту Струпа, у якому когнітивні вимоги до лівої півкулі підвищуються порівняно з прямим тестом Струпа, оскільки для успішного виконання завдання обстежувані мають проводити аналіз слів у вербальній системі лівої півкулі. Відмітимо, що нами не було знайдено відмінностей між кількістю помилок, допущених музикантами і немузикантами під час виконання зворотного тесту Струпа.

Однак зазначимо, що в одній із небагатьох публікацій, присвячених дослідженню ефекту Струпа у музикантів і немузикантів [15], було виявлено, що ефект інтерференції у професійних музикантів під час проходження прямого тесту Струпа є меншим порівняно з музикантами-любителями. Тобто, ці дані не повністю співпадають з нашими результатами, оскільки ми отримали менший ефект інтерференції у музикантів лише при проходженні ними зворотного тесту Струпа. На нашу думку, існує декілька причин, які обумовлюють подібне розходження. По-перше, у вибірці Travis F. et al. [15] не було немузикантів – дослідники працювали з вибіркою музикантів-любителів і професійних музикантів віком від 27 до 63 років. Отже, дана вибірка не співпадає з нашою за соціо-демографічними показниками. По-друге, у нашому дослідженні обстежувані проходили прямий тест Струпа лише один раз і при цьому відповіді надавалися миттєво шляхом натискання відповідних клавіш на клавіатурі комп'ютера, тоді як методика Travis F. et al. полягала у надаванні відповідей голосом і застосуванні триразового проходження тесту (для аналізу були взяті результати останньої проби). Повторні проходження прямого тесту Струпа могли ввімкнути механізми навчання в обстежуваних, що, разом із іншим методичним підходом до надання відповідей, і могло позначитися на кінцевому результаті. Менше з тим, загальний результат залишається схожим – у музикантів ефект інтерференції зменшується.

Крім того, нами було виявлено, що під час проходження прямого тесту Струпа немузиканти робили більше помилок на неконгруентні подразники порівняно з конгруентними як правою, так і лівою рукою. Музиканти за аналогічних умов помилиялися більше лише лівою рукою, а кількість помилок правої руки не відрізнялася для конгруентних і неконгруентних стимулів (див. рис. 2). Подібна закономірність уже була виявлена нами раніше за результатами попереднього дослідження, у якому обстежувані (музиканти та немузиканти) проходили тест Струпа з визначенням просторової локалізації стимулів [12]. Імовірно, ці дані також вказують на те, що музиканти мають більш сильний когнітивний контроль з боку лівої півкулі під час виконання такого роду завдань.

Крім того, було виявлено, що під час проходження прямого тесту Струпа музиканти мали коротші латентні періоди реакцій як правої, так і лівої руки порівняно з відповідними показниками немузикантів (див. рис. 1).

Однак дана закономірність спостерігалася лише під час подачі слів, колір яких співпадав із їх значенням. Імовірно, когнітивна оцінка таких конгруентних стимулів у музикантів відбувалася швидше, ніж у немузикантів. Проте, під час пред'явлення неконгруентних стимулів різниця в ЛП реакцій правої і лівою рук музикантів і немузикантів зникає, ймовірно, внаслідок ефекту інтерференції. Виявлену закономірність стосовно більш швидкої оцінки конгруентних стимулів музикантами можна було б пояснити також більш тренованим моторним компонентом в останніх, а не швидшою обробкою стимулу як такою. Однак, результати досліджень спростовують факт внеску розвиненої моторики музикантів у ЛП реакцій їх рук. Так, Brochard R. та співавт. виявили, що ЛП простих сенсомоторних реакцій не відрізняються між музикантами і немузикантами [20]. Проте, якщо в завдання внести когнітивний компонент, то ЛП відповідей музикантів стають швидшими, ніж у немузикантів. Більш швидкі ЛП реакцій рук під час когнітивних завдань у музикантів у порівнянні з немузикантами були описані і в роботі Patston et al. [7], а також у нашому дослідженні [12].

Важливо відмітити, що під час проходження прямого тесту Струпа у немузикантів виявлялася чітка моторна асиметрія – відповіді правою рукою надавалися швидше, ніж лівою. У групі музикантів така моторна асиметрія виявлялася лише під час пред'явлення неконгруентних стимулів, коли завдання ставало складнішим. Враховуючи наведені вище дані стосовно більш швидких ЛП відповідей музикантів у випадках співпадіння кольору слова і його значення, здається можливим, що під час обробки конгруентних стимулів півкулі мозку музикантів працюють симетрично, а оцінка стимулу проходить швидко. Поява неконгруентного стимулу і подальший його аналіз ніби змінюють організацію функціонування когнітивної системи – посилюється когнітивний контроль лівої півкулі, що приводить до появи асиметрії. У свою чергу, швидкість моторних реакцій не відрізняється від відповідних значень у немузикантів. Можливо, подібне "переключення" у музикантів має на меті підвищення ефективності виконання завдання і недопущення появи помилки у випадку конфліктного стану між двома потоками інформації (власне інтерференції). З іншого боку, у немузикантів організація когнітивної системи завжди знаходиться в "асиметричному" режимі, незалежно від того, конгруентний чи неконгруентний подразник в даний час сприймається і аналізується.

### Висновки

За результатами прямого і зворотного тестів Струпа музиканти і немузиканти мають однакову ефективність роботи системи уваги, критерієм якої є загальна кількість помилок. Однак музиканти аналізують конгруентні стимули швидше, ніж немузиканти, демонструючи при цьому більшу симетричність моторних реакцій. Аналіз неконгруентних стимулів у музикантів приводить до посилення когнітивного контролю лівої півкулі і появи моторної асиметрії. Для немузикантів прояв асиметрії характерний під час аналізу як конгруентних, так і неконгруентних стимулів.

### Список використаної літератури.

1. Ho Yim-Chi. Music training improves verbal but not visual memory: cross-sectional and longitudinal explorations in children / Ho Yim-Chi, Cheung Mei-Chun, Chan A.S. // Neuropsychology. – 2003. – Vol.17, №3. – P. 439.
2. Lee Y. Effects of skill training on working memory capacity / Lee Y., Lu M., Ko H. // Learning and Instruction. – 2007. – Vol. 17. – P.336-344.
3. George E.M., Coch D. Music training and working memory: An ERP study / George E.M., Coch D. // Neuropsychologia. – 2011. – Vol.49. – P.1083–1094.
4. Gardiner M. Learning improved by arts training / Gardiner M., Fox A., Knowles F. [et al.] // Nature. – 1996. – V. 381. – P. 284.
5. Cheek J.M. Music training and mathematics achievement / Cheek J.M., Smith L.R. // Adolescence. – 1999. – V.34, №136. – P. 759-761.

6. Graziano A. B. Enhanced learning of proportional math through music training and spatial-temporal training / Graziano A. B., Peterson M., Shaw G. L. // Neurological Research. – 1999. – V.21, № 2. – P. 139-152.
7. Patston L. Attention in musicians is more bilateral than in non-musicians / Patston L., Hogg S., Tippett L. // Laterality. – 2007. – V.12, №3. – P. 262-272.
8. Nering M. E. The effect of piano and music instruction on intelligence of monozygotic twins / Nering M. E. // Dissertation Abstracts International Section A: Humanities and Social Sciences. – 2002. – V.63, №3-A. – P. 812.
9. Schellenberg E.G. Music lessons enhance IQ / Schellenberg E.G. // Psychological Science. – 2004. – V.15, №8. – P.511-514.
10. Панюшева Т.Д. Музикальний мозг: обзор отечественных и зарубежных исследований / Панюшева Т.Д. // Асимметрия. – 2008. – Том 2, №2. – P.41-54.
11. Okhrei A.G. Specificity of Auditory Cognitive Evoked Potentials in Musicians. / Okhrei A.G., Kutsenko T.V., Makarchouk N.E. // Neurophysiology. – 2012. – Vol. 43, №6. – P.507-509.
12. Охрєй А.Г. Виконання тесту Струпа з визначенням просторової локалізації стимулів музикантами і немузикантами / Охрєй А.Г., Кученко Т.В., Макарчук М.Ю. // Вісник Черкаського Університету. – 2016. – №1. – P.82-89.
13. Stroop J.R. Studies of interference in serial verbal reactions / Stroop J.R. // Journal of Experimental Psychology. – 1935. – Vol.18. – P.643-662.
14. Bench C.J. Investigations of the functional anatomy of attention using the Stroop test. / Bench C.J., Frith C.D., Grasby P.M. [et al.] // Neuropsychologia. – 1993. – Vol.31, №9. – P.907-922.
15. Travis F. Moral development, executive functioning, peak experiences and brain patterns in professional and amateur classical musicians: Interpreted in light of a Unified Theory of Performance. / Travis F., Harung H.S., Lagroesen Y. // Consciousness and Cognition. – 2011. – Vol.20, №4. – P.1256-1264.
16. Cohen J.D. On the control of automatic processes: A parallel distributed processing account of the Stroop effect. / Cohen J.D., Dunbar K., McClelland J.L. // Psychological Review. – 1990. – Vol.97. – P.332-361.
17. Lindsay D.S. Stroop process dissociations: The relationship between facilitation and interference. / Lindsay D.S., Jacoby L.L. // Journal of Experimental Psychology: Human Perception and Performance. – 1994. – Vol. 20. – P.219–234.
18. Carter C.S. Anterior cingulate cortex and conflict detection: an update of theory and data. / Carter C.S., van Veen V. // Cognitive, Affective, & Behavioral Neuroscience. – 2007. – Vol.7, №4. – P.367–379.
19. Кученко Т.В. Проявлення та зворотного ефекту Струпа при відповідях обоими руками та кожною рукою окремо / Кученко Т.В., Філімонова Н.Б., Костенко С.С. // Вісник Черкаського університету (Серія біологічні науки). – 2009. – Том 156. – P.55-61.
20. Brochard R. Effect of musical expertise on visuospatial abilities: Evidence from reaction times and mental imagery. / Brochard R., Dufour A., Despres O. // Brain and Cognition. – 2004. – Vol.54. – P.103-109.
2. Lee Y, Lu M, Ko H. Effects of skill training on working memory capacity. Learning and Instruction. 2007;17:336-344.
3. George EM, Coch D. Music training and working memory: An ERP study. Neuropsychologia. 2011;49:1083–1094.
4. Gardiner MF, Fox A, Knowles F, Jeffrey D. Learning improved by arts training. Nature. 1996 May 23;381(6580):284.
5. Cheek JM, Smith LR. Music training and mathematics achievement. Adolescence. 1999;34(136):759-761.
6. Graziano AB, Peterson M, Shaw GL. Enhanced learning of proportional math through music training and spatial-temporal training. Neurological Research. 1999;21(2):139-152.
7. Patston LL, Hogg SL, Tippett LJ. Attention in musicians is more bilateral than in non-musicians. Laterality. 2007;12(3):262-272.
8. Nering ME. The effect of piano and music instruction on intelligence of monozygotic twins. Dissertation Abstracts International Section A: Humanities and Social Sciences. 2002; 63(3-A):812.
9. Schellenberg EG. Music lessons enhance IQ. Psychological Science. 2004;15(8):511-514.
10. Panyusheva TD. [Musical mind: a review of domestic and foreign researches]. Asymmetria. 2008; 2(2):41-54.
11. Okhrei AG, Kutsenko TV, Makarchouk NE. Specificity of Auditory Cognitive Evoked Potentials in Musicians. Neurophysiology. 2012;43(6):507-509.
12. Okhrei AG, Kutsenko TV, Makarchuk NE. [The fulfillment of Stroop test with identification of spatial localization of stimuli by musicians and non-musicians]. Vistnyk Cherkas'kogo Universytetu. 2016;1:82-89.
13. Stroop JR. Studies of interference in serial verbal reactions. Journal of Experimental Psychology. 1935; 18:643-662.
14. Bench CJ, Frith CD, Grasby PM, Friston KJ, Paulesu E, Frackowiak RSJ, et al. Investigations of the functional anatomy of attention using the Stroop test. Neuropsychologia. 1993;31(9):907-922.
15. Travis F, Harung HS, Lagroesen Y. Moral development, executive functioning, peak experiences and brain patterns in professional and amateur classical musicians: Interpreted in light of a Unified Theory of Performance. Consciousness and Cognition. 2011; 20(4):1256-1264.
16. Cohen JD, Dunbar K, McClelland JL. On the control of automatic processes: A parallel distributed processing account of the Stroop effect. Psychological Review. 1990; 97:332–361.
17. Lindsay DS, Jacoby LL. Stroop process dissociations: The relationship between facilitation and interference. Journal of Experimental Psychology: Human Perception and Performance. 1994;20:219–234.
18. Carter CS, van Veen V. Anterior cingulate cortex and conflict detection: an update of theory and data. Cognitive, Affective, & Behavioral Neuroscience. 2007; 7(4):367–379.
19. Kutsenko TV, Filimonova NB, Kostenko SS. [The direct and reverse Stroop effect during answering with both hands and with each hand separately]. Vistnyk Cherkas'kogo Universytetu (Biological Sciences Series). 2009;156:55-61.
20. Brochard R, Dufour A, Despres O. Effect of musical expertise on visuospatial abilities: Evidence from reaction times and mental imagery. Brain and Cognition. 2004;54:103-109.

Надійшла до редколегії 06.09.16

**References**

- Ho Y, Cheung M, Chan AS. Music training improves verbal but not visual memory: cross-sectional and longitudinal explorations in children. Neuropsychology. 2003;17(3):439-450.

А. Охрєй асп., Т. Кученко канд. біол. наук, М. Макарчук, д-р біол. наук  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

**ВЛІЯННЯ ЗАНЯТИЙ МУЗЫКОЙ НА ВЫПОЛНЕНИЕ ПРЯМЫХ И ОБРАТНЫХ ТЕСТОВ СТРУПА**

**Оценивали работу системы внимания по результатам выполнения прямого и обратного тестов Струпа у музыкантов и немузыкантов. Обследуемыми были студенты Национальной музыкальной академии им. П.Чайковского (музыканты) и их сверстники из ОНЦ "Институт биологии" без музыкального опыта (немузыканты). Обследуемые проходили прямой и обратный тесты Струпа с представлением ответов обеими руками. При прямом тесте Струпа эффект интерференции проявлялся в обеих группах для обеих рук. По результатам анализа конгруэнтных стимулов моторная асимметрия у музыкантов не проявлялась, а их ответы были быстрее, чем у немузыкантов. Неконгруэнтные стимулы увеличивали количество ошибок обеих рук у немузыкантов, а у музыкантов – только левой руки. При обратном тесте Струпа эффект интерференции наблюдался у немузыкантов для обеих рук, у музыкантов – только для левой. Общее количество ошибок не отличалось между группами. Музыканты и немузыканты имеют одинаковую эффективность работы системы внимания по общему количеству ошибок. Неконгруэнтные стимулы приводят к усилению когнитивного контроля левого полушария и появлению моторной асимметрии у музыкантов. У немузыкантов проявление асимметрии обнаружено при анализе и конгруэнтных, и неконгруэнтных стимулов.**

**Ключевые слова:** музыканты, немузыканты, прямой тест Струпа, обратный тест Струпа.

A. Okhrei Phd stud., T. Kutsenko Phd., M. Makarchuk, Dsc.  
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

**EFFECT OF MUSIC LESSONS ON THE IMPLEMENTATION OF THE DIRECT AND INVERSE TESTS SCAB**

**To estimate the functioning of attention system by results of direct and reverse Stroop tests in musicians and non-musicians. Participants were students of the National Academy of Music (musicians) and their peers from the ESC "Institute of Biology" without musical experience (non-musicians). Participants passed direct and reverse Stroop tests giving answers with both hands. During the direct Stroop test interference effect was revealed in both groups for both hands. Analysis of congruent stimuli revealed that musicians have no motor asymmetry and their responses were faster than non-musicians' ones. Incongruent stimuli increased the number of errors of both hands in the non-musicians and only of the left hand in musicians. During reverse Stroop test interference effect was observed in non-musicians for both hands and only for left hand in musicians. The total number of errors didn't differ between groups.**

**Musicians and non-musicians have the same efficiency of attention system by the total number of errors. Incongruent stimuli lead to increased cognitive control of the left hemisphere and to emergence of motor asymmetry in musicians. Non-musicians demonstrated motor asymmetry during analysis of both congruent and incongruent stimuli.**

**Keywords:** musicians, non-musicians, direct Stroop test, reverse Stroop test.

УДК 577.353.3

П. Вірич, асп., О. Шелюк, канд. біол. наук, В. Мартинюк, д-р біол. наук  
 Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ,  
 В. Павловський, д-р хім. наук  
 Фізико-хімічний інститут імені О.В. Богатського НАН України, Одеса

## ОСОБЛИВОСТІ БРАДИКІНІН-ІНДУКОВАНОГО СКОРОЧЕННЯ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ ШЛУНКУ ЗАЛЕЖНО ВІД КОНЦЕНТРАЦІЇ СПОЛУК НА ОСНОВІ 3-ЗАМІЩЕНИХ 1,4-БЕНЗДІАЗЕПІН-2-ОНІВ

**Досліджено вплив сполук на основі 3-заміщених-1,4-бенздіазепін-2-онів на скоротливу активність гладеньких м'язів шлунку щурів. Дія речовин MX-1626, MX-1775 схожа за патернами скорочення з конкурентними інгібітором брадикініну – des-Arg9-[Leu8]-Bradykinin acetate, що спостерігається у вигляді зростання нормованої швидкості скорочення по мірі зростання кількості брадикініну і характеризується помітним сповільненням першої фази скорочення. Найбільш ефективними 3-замінені 1,4-бенздіазепін-2-они виявилися за низьких концентрацій брадикініну, при збільшенні якого їх дія зменшується.**

**Ключові слова:** гладенькі м'язи, механокінетичні параметри, 3-заміщені 1,4-бенздіазепін-2-они.

### Вступ

Біль являє собою серйозну клінічну, соціальну та економічну проблеми. Практично всі травми та захворювання людини супроводжуються відчуттям болю. На сьогодні на передній план вийшла проблема нейропатично-го болю, як одного з ускладнень деяких захворювань. Такий стан часто виникає в результаті спазму судин та інших органів з гладенькими м'язами (ГМ) в своєму складі. Це може призводити до розвитку депресивних та три-вожніх станів, а також інших психічних розладів.

На цей час існує спектр знеболювальних препаратів, які широко використовуються в медицині, але переважна більшість з них не володіє повним набором знеболюючих властивостей та має ряд побічних ефектів.

Вважається, що однією з систем організму, яка відповідає за больову чутливість являється калікреїн-кінінова система, що також залучена до регуляції функцій гладеньких м'язів судин та шлунково-кишкового тракту [10]. Данна система є важливою ланкою при хронічному болю, запаленні, алергії, травмах, хворобі Альцгеймера та ін. Одним з основних складових даної системи являється брадикінін (БК), що представляє собою пептид, синтезований за ензиматичною дією калікреїнів на кініногенові попередники та складається з 9 амінокислотних залишків [9]. Клітинна відповідь на дію цього пептиду опосередковується активацією брадикінінових рецепторів двох підтипів –  $B_1$  та  $B_2$  [10], що належать до родини рецепторів спряжених з G-білками, та опосередковують свою дію через  $G_q$  білки. Це, в свою чергу, супроводжується синтезом вторинних посередників – інозитол-1,4,5-трифосфату та діацилгліцеролу.  $B_2$ -рецептори є конститутивними, а їх експресія тканинно-специфічно посилюється запальними цитокінами, зокрема, інтерлейкіном-1 і факторами некрозу пухлин а та  $\beta$ .  $B_1$ -рецептори переважно експресуються в умовах розвитку травми і запалення. В гладеньких м'язах дихальних шляхів, шлунково-кишкового тракту та міометрію активація рецепторів БК спричиняє скорочення. На противагу цьому, переважною реакцією ГМ судин на аплікування БК є розслаблення, внаслідок чого підвищується проникність судинної стінки і розвивається набряк оточуючих тканин; як наслідок, спостерігається фосфоліпаза  $A_2$ -опосередковане вивільнення простагландинів і лейкотріенів [2]. Як правило, такі клітинні відповіді на дію БК опосередковані  $Ca^{2+}$ -залежними механізмами внутрішньоклітинного сигналінгу.

Науковий колектив Фізико-хімічного інституту НАН України ім. О.В. Богатського запропонував новий клас перспективних сполук на основі 3-заміщених 1,4-бенздіазепінів, які демонструють анальгетичний ефект і, ймовірно, інгібують БК рецептори. В науковій літературі описано нові біологічні мішені, з якими можуть вза-

ємодіяти бенздіазепіни, і, відповідно, нові впливи похідних бенздіазепінів на фізіологічні й патологічні процеси в організмі, включаючи ефекти при з'язуванні з ГАМК<sub>A</sub> рецепторами, такі як анальгетичні (протизапальні й знеболюючі) і антигіперальгезивні (купірування надчутливості до болю) [1, 6, 11]. Експериментальні дані демонструють здатність деяких похідних бенздіазепінів проявляти чітку антигіперальгезивну активність відносно запального та невропатичного болю в моделях на тваринах. Деякі похідні бенздіазепінів можуть викликати глибоку анальгезію у тварин. Подальша селекція перспективних сполук потребує всебічної оцінки їх біологічної активності і ретельного дослідження молекулярних і системних механізмів дії.

Із врахуванням вищепередного з'ясування механізмів дії 3-заміщених 1,4-бенздіазепіонів на спряження збудження та скорочення в гладеньком'язовій тканині, є важливим як з фундаментальної, так і з практичної точки зору. Результати наших попередніх досліджень доводять, що гладенькі м'язи є чутливими мішеню дії різноманітних сполук, в тому числі і брадикініну та його антагоністів – похідних бенздіазепіну [1].

Метою роботи було вивчення закономірностей дії бенздіазепінів на механокінетичні параметри викликаних брадикініновою деполяризацією скорочень мультиклітинних препаратів ГМ шлунку щурів.

### Матеріали та методи

Дослідження скоротливої активності гладеньких м'язів шлунку щурів проводили в ізометричному режимі. Для цього самців щурів масою 240-260 г декапітували, вилучали шлунок та поміщали в розчин Кребса. Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з Міжнародною конвенцією роботи з тваринами та Законом України "Про захист тварин від жорстокого поводження". Смужки розміром 1,5-2x10 мм, які попередньо були очищені від серозної та слизової оболонок розміщували в робочій камері з проточним розчином Кребса (швидкість протікання 1,5 мл/хв), терmostатовані при 37°C. Препарат перебував під пасивним натягом силою 10 мН та інкубувався 1 год до появи спонтанних скорочень або сталих механо-кінетичних параметрів скорочення у відповідь на стимуляцію гіперкалієвим розчином. Реестрацію сигналів проводили за допомогою модулю збору даних m-DAQ12 (Holit Data Systems Ltd., Україна) та програмного забезпечення PowerGraph Professional 3.3.

Для дослідів використовували розчин Кребса (мМ): 120,4 NaCl ; 5,9 KCl; 15,5 NaHCO<sub>3</sub>; 1,2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; MgCl<sub>2</sub> -1,2; 2,5 CaCl<sub>2</sub>; 11,5 глукоза; pH розчину становив 7,4. Гіперкалієвий розчин (концентрація іонів K 80 мМ) готували шляхом ізотонічної заміни у вихідному розчині Кребса необхідної частини іонів Na на еквімолярну кількість іонів калію. Необхідну концентрацію брадикі-

ніну в інкубаційному розчині (від  $10^{-10}$  до  $10^{-5}$  М) одержували шляхом внесення аліквоти маточного розчину в інкубаційну камеру.

Бензіазепіни попередньо розчиняли в диметилсульфоксиді (DMSO) та вносили в розчин Кребса (остаточно вміст органічного розчинника складав 1% від загального об'єму розчину). Дію досліджуваних речовин вивчали за однаковим протоколом експерименту, сполучки вносили в розчин Кребса за 30 хв до реєстрації механічної активності препаратів. Кінцева концентрація похідних 3-заміщених 1,4-бензіазепіонів в інкубаційному середовищі складала  $10^{-10}$ ,  $10^{-8}$  і  $10^{-6}$  М. Синтез та властивості 3-заміщених 1,4-бензіазепіонів описані в роботах [8, 13, 14].

В якості контрольних використовували скоротливі відповіді гладеньком'язових смужок шлунку щурів, до інкубаційного середовища яких добавали аліквоту DMSO, яка не перевищувала 1% від загального об'єму інкубаційного середовища.

Для порівняльної оцінки біологічних ефектів похідних 3-заміщених 1,4-бензіазепіонів проводили також дослідження брадікінін-індукованого скорочення гладеньком'язових смужок на фоні аплікації конкурентного інгібітора рецепторів брадікініну des-Arg9-[Leu8]-Bradykinin acetate.

Вивчення механокінетики процесу скорочення м'язових препаратів здійснювали відповідно до методу [4]. Перевагою даного аналізу є його незалежність від амплітуди скоротливих відповідей. Це дає можливість коректно порівнювати дані, одержані на м'язових препаратах різного розміру.

Статистичну та математичну обробку результатів здійснювалась за загальноприйнятими методами варіаційної статистики за допомогою пакетів програм "Statistica, 8.0" та "Origin Lab 8.0".

## Результати та обговорення

За фізіологічних умов основним індуктором скорочень ГМ є позаклітинний  $\text{Ca}^{2+}$ . Зростання його концентрації в міоцитах може бути опосередковане через потенціал- та рецепторкеровані калієві канали.

Відповідно ми вивчали вплив похідних 3-заміщених 1,4-бензіазепіонів на скоротливі відповіді препаратів ГМ шлунку щурів у випадку активації проведення збуджуючого сигналу шляхами фармакомеханічного спряження збудження-скорочення. Але початково виникла потреба розглянути особливості дії брадікініну та його конкурентного інгібітора на гладенькі м'язи шлунку, оскільки в літературі описаний вплив даного пептиду на м'язовий тонус уретри [7], кровоносних судин [3, 5, 12], тоді як його дія на шлунок не відома. На рис.1 (крива 1) наведено лінеаризацію механограм першої фази скорочень викликаних брадікініном в концентраціях від  $10^{-10}$  до  $10^{-5}$  М. При цьому нормована максимальна швидкість скорочення  $V_n$  приймала значення від  $5,25 \pm 0,21$  ( $r = 0,98 - 0,99$ ) при  $10^{-10}$  М до  $3,74 \pm 0,13$  при  $10^{-5}$  М, зберігаючи лінійність.

Сила брадікінін-індукованого скорочення достовірно зменшується в присутності конкурентного інгібітора des-Arg9-[Leu8]-Bradykinin acetate. Крім того аплікація цієї речовини, як правило, зменшує тривалість процесу "скорочення-розслаблення", прискорюючи в основному першу фазу нарощання сили, що призводить до статистично достовірного зростання величини нормованої швидкості  $V_n$ . Так за концентарції антагоністу  $10^{-6}$  М та  $10^{-8}$  М швидкість скорочення зростає на 28,7% та 32,9%, відповідно, в діапазоні аплікації концентрацій БК  $10^{-10}$ - $10^{-5}$  М (рис.1; криві 2, 3). Схожа тенденція спостерігається і для низьких кількостей ( $10^{-10}$  М) des-Arg9-[Leu8]-Bradykinin acetate, але достовірного зростання  $V_n$  не спостерігається (рис.1; крива 4).

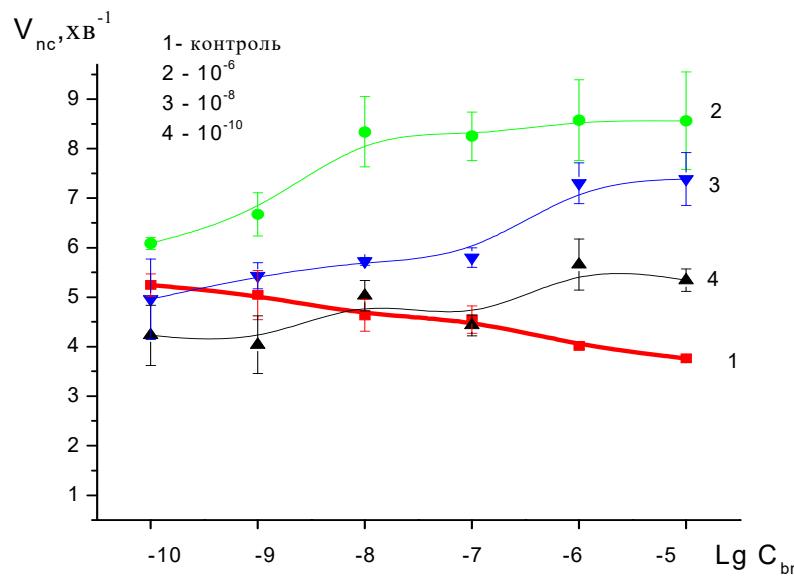


Рис.1. Вплив різних концентрацій конкурентного інгібітора des-Arg9-[Leu8]-Bradykinin acetate ( $10^{-10}$ ,  $10^{-8}$  і  $10^{-6}$  М) на нормовану максимальну швидкість скорочення гладеньких м'язів шлунку щурів  $V_n$ , викликану брадікініном в діапазоні концентрацій  $C_{br}$   $10^{-10}$  –  $10^{-5}$  М (крива 1)

Використовуючи отримані дані в присутності високоселективного конкурентного інгібітора брадікінінових рецепторів  $B_2$ -типу des-Arg9-[Leu8]-Bradykinin acetate в якості контрольних, ми провели дослідження впливу на скоротливу активність ГМ кільцевих м'язів шлунку щурів

наступних похідних 3-заміщених 1,4-бензіазепіонів: MX-1626, MX-1775, MX-2011, MX-1785 (рис.2).

Максимальна нормована швидкість скорочення ГМ в присутності MX-1626 в концентраціях  $10^{-10}$ ,  $10^{-8}$  та  $10^{-7}$  М зменшується порівняно з контрольними значеннями при аплікаціях БК  $10^{-10}$ - $10^{-7}$  М з  $5,25 \pm 0,21$  до

$3,47 \pm 0,18$  ( $10^{-6}$  M),  $2,77 \pm 0,65$  ( $10^{-8}$  M),  $3,52 \pm 0,08$  ( $10^{-10}$  M), відповідно ( $M \pm m$ ;  $p < 0,05$ ). Зростання кількості агоністу призводить до зменшення різниці в швидкостях скорочення, та за концентрації БК  $10^{-5}$  M і MX-1626  $10^{-10}$  M вона повністю зникає, причому по всьому діапазону концентрацій агоністу не змінюється  $V_n$ .

Таким чином, ефект бенздіазепінового похідного за концентрації  $10^{-8}$  M схожий з таким високоселективного конкурентного інгібітора B2-рецепторів, що проявляється у вигляді нелінійного зростання нормованої швидкості з  $2,77 \pm 0,65$  до  $4,92 \pm 0,71$  при збільшенні кількості індуктора скорочення.

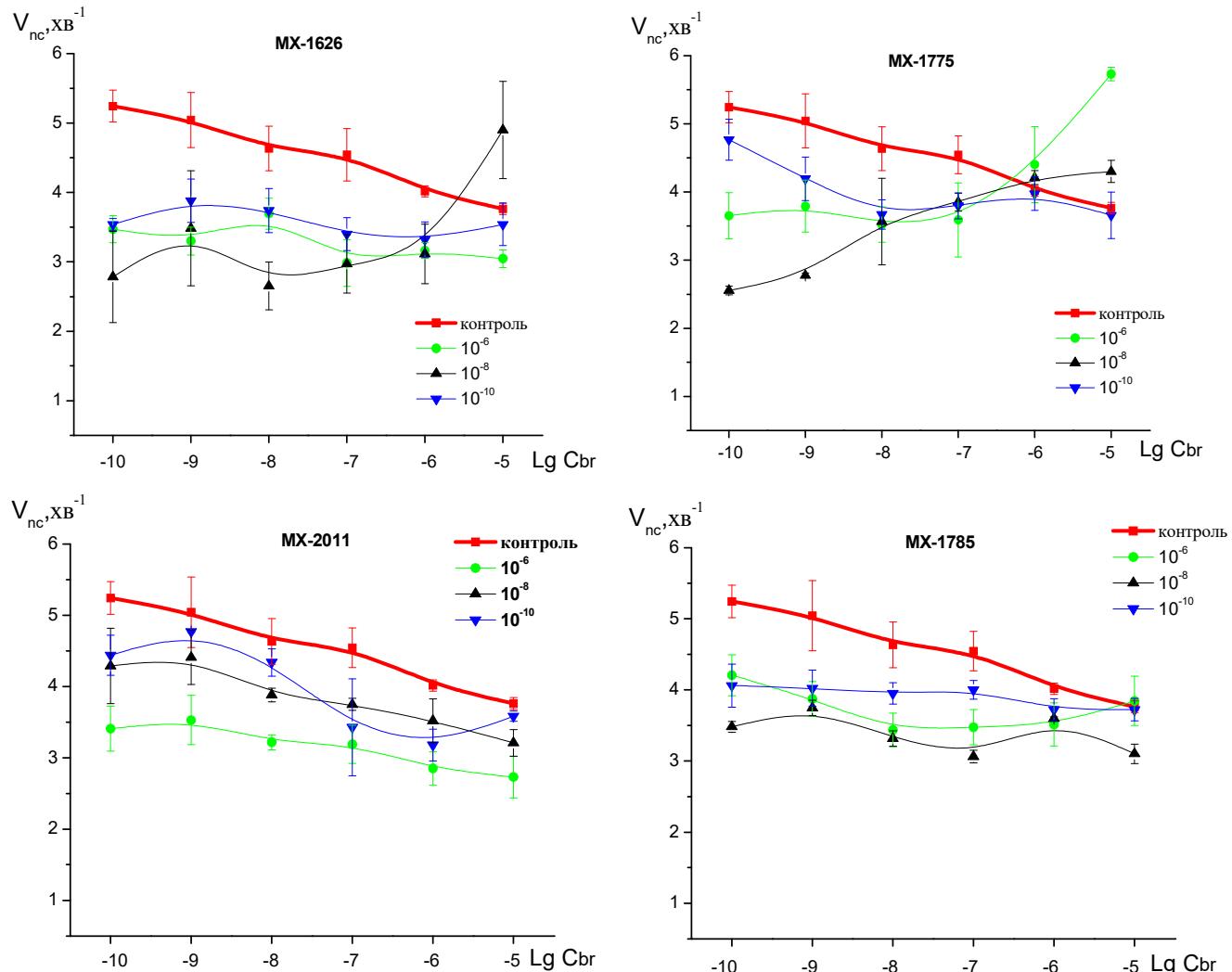


Рис.2. Вплив різних концентрацій 1,4-бенздіазепіонів ( $10^{-10}$ ,  $10^{-8}$  і  $10^{-6}$  M) на нормовану максимальну швидкість скорочення гладеньких м'язів шлунку щурів викликану брадікініном в діапазоні концентрацій  $C_{br} 10^{-10}$  –  $10^{-5}$  M, прийнятим за контроль

Аплікація БК ( $10^{-10}$  M) після 30 хв попередньої інкубації препаратів в розчині Кребса з MX-1775 ( $10^{-8}$  та  $10^{-6}$  M) супроводжувалась значимим сповільненням скорочення ГМ на 51,6% і 30,4% відповідно порівняно з контролем, прийнятим за 100%. Даний ефект знижується при зростанні кількості агоністу і повністю зникає за концентрації БК  $10^{-6}$  M. Виявилось, що в умовах дії активатора в концентрації  $10^{-5}$  M значення нормованої максимальної швидкості  $V_n$  першої фази скорочення зростало порівняно з контролем на 34,6% для  $10^{-6}$  M MX-1775 та на 12,8% для  $10^{-8}$  M (zmіни були вірогідними щодо контролю,  $p < 0,05$ ).

Як було встановлено, обидві досліджувані речовини спроявляють вірогідний ефект конкурентного інгібування B<sub>2</sub>-рецепторів брадікініну в концентраціях  $10^{-8}$  та  $10^{-6}$  M. Проте наднизькі кількості ( $10^{-10}$  M) MX-1775 не виявляють такої активності.

Також здійснювали перевірку можливої модифікації 3-заміщеним 1,4-бенздіазепіном MX-2011 скорочли-

вої активності гладеньких м'язів шлунку щурів. Як можна бачити з рис. 2 значення нормованої швидкості скорочення за аплікації брадікініну ( $10^{-10}$  M) вірогідно знижувались з  $5,25 \pm 0,21$  до  $3,42 \pm 0,33$  при  $10^{-6}$  M MX-2011, до  $4,27 \pm 0,55$  при  $10^{-8}$  M і до  $4,43 \pm 0,29$  при  $10^{-10}$  M. Так, за умов попередньої інкубації гладеньком'язових препаратів в розчині Кребса з MX-2011 ( $10^{-8}$  та  $10^{-6}$  M) спостерігалось подальше лінійне зменшення  $V_n$  при зростанні кількості агоністу. Аналіз механограм (рис. 2) показав, що за кінцевою концентрацією БК ( $10^{-5}$  M) розрахований параметр  $V_n$  приймав значення, відповідно,  $2,72 \pm 0,29$  для  $10^{-6}$  M та  $3,21 \pm 0,17$  для  $10^{-8}$  M MX-2011, що, на 27,2 % і 14,2 % вірогідно менше аналогічного показника контролю. Скоротлива активність ГМ в присутності  $10^{-10}$  M MX-2011 не виявляє лінійної залежності при змінах кількості агоністу.

Досліджуваний нами бенздіазепіон MX-1785 пригнічував  $V_n$  за його концентрації у омиваючому розчині  $10^{-6}$  M до  $4,19 \pm 0,3$ ,  $10^{-8}$  M –  $3,46 \pm 0,09$  та  $10^{-10}$  M –

$4.07 \pm 0.32$ . Спостерігається схожість дії даної речовини при наднізьких ( $10^{-10}$  M) і високих ( $10^{-6}$  M) концентрацій, про що свідчать аналогічні зміни нормованої швидкості скорочення ГМ при стимуляції різними концентраціями брадікініну, і в результаті, за кількості агоністу  $10^{-5}$  M, вибраний показник відповідає контрольним значенням. Найбільший ефект інгібування швидкості скорочення ГМ спостерігається за концентратії  $10^{-8}$  M MX-1785. Показники  $V_n$  за максимальної концентрації брадікініну знижуються на 17,6% відносно контролю.

При порівнянні отриманих даних брадікінін-індукуваного скорочення в присутності 3-заміщених 1,4-бензодіазепінових виявилось, що речовини MX-1626 та MX-1775 виявляють схожість патернів скорочення до кокурентного інгібітора  $B_2$ -рецепторів брадікініну. Отже, можна висловити припущення щодо їх конкурентної взаємодії з даним типом рецептора.

### Висновки

Таким чином, результати вищенаведених порівняльних експериментів із застосуванням бензодіазепінів вказують на наступне. Дія MX-1626, MX-1775 характеризується помітним сповільненням першої фази брадікінін-індукованого скорочення гладеньких м'язів шлунку. Найбільша ефективність спостерігається при дуже низьких (фізіологічних) концентраціях брадікініну ( $10^{-10}$  –  $10^{-8}$  M). У високих концентраціях наведені речовини частково виявляють схожість за патернами скорочення з конкурентними інгібітором брадікініну – des-Arg9-[Leu8]-Bradykinin acetate, що спостерігається у вигляді зростання нормованої швидкості скорочення по мірі зростання кількості агоністу (БК).

### Список використаних джерел.

- Analgesic Effects of 3-Substituted Derivatives of 1,4-Benzodiazepines and their Possible Mechanisms / [V. I. Pavlovsky, O. V. Tsymbalyuk, V. S. Martynuk et al.]. // Neurophysiology. – 2013. – N45. – P. 427–432.
- Bradykinin-activated transmembrane signals are coupled via No or Ni to production of inositol 1,4,5-trisphosphate, a second messenger in NG108-15 neuroblastoma-glioma hybrid cells / H. Higashida, R. A. Streaty, W. Klee, M. Nirenberg. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1986. – N83. – P. 942–946.
- Bradykinin induces vascular contraction after hemorrhagic shock in rats / [J. Zhang, G. M. Yang, Y. Zhu et al.]. // J. Surg. Res. – 2015. – N193. – C. 334–343.
- Burdyga T. V. Kinetic analysis of smooth muscle relaxation / T. V. Burdyga, S. A. Kosterin. // Gen. Physiol. Biophys. – 1991. – N10. – P. 589–598.
- Effect of diet-induced obesity on BK(Ca) function in contraction and dilation of rat isolated middle cerebral artery / L. Howitt, M. J. Morris, S. L. Sandow, T. V. Murphy. // Vascul Pharmacol. – 2014. – N61. – C. 10–15.
- Licata S. C. Abuse and Dependence Liability of Benzodiazepine-Type Drugs: GABA Receptor Modulation and Beyond / S. C. Licata, K. J. Rowlett. // Pharmacol. Biochem. Behav. – 2008. – N90. – P. 74–89.
- Pre- and post-junctional bradykinin B2 receptors regulate smooth muscle tension to the pig intravesical ureter / [A. S. Ribeiro, V. S. Fernandes, M. P. Martinez et al.]. // Neurourol Urodyn. – 2016. – N35. – C. 115–121.
- Structure and Affinity of 3-alkoxy-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-ones for Central Benzodiazepine Receptors / [S. Andronati, E. Semenishyna, V. Pavlovsky et al.]. // Eur. J. of Med. Chem. – 2010. – N4. – C. 1346–1351.
- Synthesis of bradykinin / [L. A. Shchukina, G. A. Ravdel, M. P. Filatova et al.]. // Chemistry of Natural Compounds. – 1966. – N2. – P. 97–101.
- The kinin system – bradykinin: biological effects and clinical implications. Multiple role of the kinin system – bradykinin / [C. Golias, A. Charalabopoulos, D. Stagikas et al.]. // Hippokratia. – 2007. – N11. – P. 124–128.
- Thermodynamics of 3-hydroxy-7-bromo-5-(2'-chlorophenyl)-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-ones esters complexation with the central benzodiazepine receptors / [S. P. Smulsky, N. O. Burenkova, S. A. Andronati et al.]. // Журнал органічної та фармацевтичної хімії. – 2012. – N4. – C. 65–70.
- Vasomotor effects of acetylcholine, bradykinin, noradrenaline, 5-hydroxytryptamine, histamine and angiotensin II on the mouse basilar artery / [M. Z. Islam, Y. Watanabe, H. T. Nguyen et al.]. // J. Vet. Med. Sci. – 2014. – N76. – C. 1339–1345.
- Лиганды брадикининовых рецепторов как потенциальные анальгетические и противовоспалительные средства / [С. А. Андронати, Т. А. Кабанова, В. И. Павловский и др.]. // Журнал орг. та фарм. хімії. – 2009. – №4. – С. 70–76.
- Синтез и анальгетическая активность 3-ариламино-1,2-дигидро-3Н-1,4-бензодиазепин-2-онов / [В. И. Павловский, И. Ю. Ушаков, Т. А. Кабанова та ін.]. // Хим.-фарм. журн. – 2015. – №9. – С. 22–27.

### References

- Pavlovsky VI, Tsymbalyuk OV, Martynuk VS, Kabanova TA, Semenishyna EA, Khalimova EI, Andronati SA. Analgesic Effects of 3-Substituted Derivatives of 1,4-Benzodiazepines and their Possible Mechanisms. Neurophysiology. 2013;45:427–432.
- Higashida H, Streaty RA, Klee W, Nirenberg M. Bradykinin-activated transmembrane signals are coupled via No or Ni to production of inositol 1,4,5-trisphosphate, a second messenger in NG108-15 neuroblastoma-glioma hybrid cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986;83:942–946.
- Zhang J, Yang GM, Zhu Y, Peng XY, Liu LM, Li T. Bradykinin induces vascular contraction after hemorrhagic shock in rats. J. Surg. Res. 2015;193:334–343.
- Burdyga TV, Kosterin SA. Kinetic analysis of smooth muscle relaxation. Gen. Physiol. Biophys. 1991;10: 589–598.
- Howitt L, Morris MJ, Sandow SL, Murphy TV. Effect of diet-induced obesity on BK(Ca) function in contraction and dilation of rat isolated middle cerebral artery Vascul Pharmacol. 2014;61:10–15.
- Licata SC, Rowlett KJ. Abuse and Dependence Liability of Benzodiazepine-Type Drugs: GABA Receptor Modulation and Beyond. Pharmacol. Biochem. Behav. 2008;90:74–89.
- Ribeiro AS, Fernandes VS, Martínez MP, López-Oliva ME, Barahona MV, Recio P, Martínez AC, Blaha I, Orensan LM, Bustamante S, García-Sacristán A, Prieto D, Hernández M. Pre- and post-junctional bradykinin B2 receptors regulate smooth muscle tension to the pig intravesical ureter. Neurourol Urodyn. 2016;35:115–121.
- Andronati S, Semenishyna E, Pavlovsky V, Simonov Y, Makan S, Boyko I, Burenkova N, Gdaniec M, Cardinael P, Bouillon J-P, Mazepa A. Structure and Affinity of 3-alkoxy-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-ones for Central Benzodiazepine Receptors. Eur. J. of Med. Chem. 2010;4:1346–1351.
- Shchukina LA, Ravdel GA, Filatova MP, Semkin EP, Krasnova SN. Synthesis of bradykinin. Chemistry of Natural Compounds. 1966;2:97–101.
- Golias Ch, Charalabopoulos A, Stagikas D, Charalabopoulos K, Batistatou A. The kinin system – bradykinin: biological effects and clinical implications. Multiple role of the kinin system – bradykinin. Hippokratia. 2007;11:124–128.
- Smulsky SP, Burenkova NO, Andronati SA, Pavlovsky VI, Polishchuk PG, Andronati KS. Thermodynamics of 3-hydroxy-7-bromo-5-(2'-chlorophenyl)-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-ones esters complexation with the central benzodiazepine receptors. J. of organic and pharmaceutical chemistry. 2012;4:65–70.
- Islam MZ, Watanabe Y, Nguyen THT, Yamazaki-Himeno E, Obi T, Shiraiishi M, Miyamoto A. Vasomotor effects of acetylcholine, bradykinin, noradrenaline, 5-hydroxytryptamine, histamine and angiotensin II on the mouse basilar artery. 2014;76:1339–1345.
- Andronati SA, Kabanova TA, Pavlovsky VI, Andronati KS, Bachynsky SY. [Ligands of bradykinin receptors as potential analgesic and anti-inflammatory medicines]. J. of organic and pharmaceutical chemistry. 2009;4:70–76.
- Pavlovsky VI, Ushakov IY, Kabanova TA, Khalimova EI, Kravtsov VH, Andronati SA. [Synthesis and analgesic activity 3-arylamino-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-ones]. Chem.Pharm. J. 2015;9:22–27.

Надійшла до редакції 08.09.16

П. Виріч, асп., О. Шелюк, канд. біол. наук, В. Мартынюк, д-р біол. наук  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,  
В. Павловський, д-р хим. наук  
Фізико-хімічний інститут ім. А.В. Богатского НАН України, Одеса, Україна

### ОСОБЕННОСТИ БРАДИКИНИН-ИНДУЦЫРОВАННОГО СОКРАЩЕНИЯ ГЛАДКИХ МЫШЦ ЖЕЛУДКА ЗАВИСИМО ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ СОЕДИНЕНИЙ НА БАЗЕ 3-ЗАМЕЩЕННЫХ-1,4-БЕНЗДИАЗЕПИН-2-ОНОВ

Исследовано влияние соединений на базе 3-замещенных-1,4-бенздиазепин-2-онов на сократительную активность гладких мыши желудка крысы. Действие веществ MX-1626, MX-1775 похожее по паттернам сокращения на конкурентный ингибитор брадикинина – des-Arg9-[Leu8]-Bradykinin acetate, что наблюдается в виде увеличения нормированной скорости сокращения по мере возрастания концентрации брадикинина и характеризуется заметным замедлением первой фазы сокращения. Наиболее эффективными 3-замещенные 1,4-бенздиазепин-2-оны были при низких концентрациях брадикинина, при возрастании которого их действие уменьшалось.

Ключевые слова: гладкие мышцы, механокинетические параметры, 3-замещенные 1,4-бенздиазепин-2-оны.

P. Virych, PhD Stud., O.Shelyuk, PhD., V.Martynyuk, Dr. of Sci.  
 Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine  
 V. Pavlovsky, Dr. of Sci.  
 A. V. Bogatsky Physico-Chemical Institute NAS of Ukraine, Odesa, Ukraine

## FEATURES BRADYKININ-INDUCED SMOOTH MUSCLE CONTRACTION OF STOMACH IN A CONCENTRATION DEPENDENT COMPOUNDS BASED ON 3-SUBSTITUTED 1,4-BENZODIAZEPIN-2-ONES

*The effect of compounds based on 3-substituted-1,4-benzodiazepine-2-ones on contractile activity of smooth muscles of the rat's stomach was analyzed. Action substances MX-1626, MX-1775 for the smooth muscle contraction of like competitive inhibitor of bradykinin – des-Arg9- [Leu8] - Bradykinin acetate, which is observed as increase normalized rate of contraction with increasing of bradykinin concentration and characterized by a slowdown in the first phase of contraction. The most effective 3-substituted 1,4-benzodiazepin-2-ones was at low concentrations of bradykinin, increasing it concentration their effect is reduced.*

**Key words:** smooth muscle, mechanokinetic parameters, 3-substituted-1,4-benzodiazepine-2-ones.

УДК 616-056:577.112

Є. Голобородько, асп.,  
 Т. Іщук, канд. біол. наук,  
 Т. Синельник, канд. біол. наук,  
 В. Конопельнюк, канд. біол. наук  
 Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

## ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ЕФЕКТІВ ЛІКУВАЛЬНОГО ВВЕДЕННЯ ОРЛІСТАТУ І БІОНАНОКОМПОЗИТУ НА ОСНОВІ ФЕНУГРЕКУ НА ПОКАЗНИКИ-МАРКЕРИ ЕНДОГЕННОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ В ЩУРІВ ІЗ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ ОЖИРІННЯМ

*Досліджено маркери ендогенної інтоксикації в щурів-самців за умов розвеитку ожиріння індукованого споживанням висококалорійної дієти. Проведено порівняльний аналіз лікувальних ефектів введення біонанокомпозиту та орлістату на основні показники ендотоксикації. В ході досліджень показано збільшення вмісту молекул середньої маси та олігопептидів в крові щурів із експериментальним ожирінням, а також нормалізацію вмісту даних показників за умов введення біонанокомпозиту тваринам з ожирінням.*

**Ключові слова:** ожиріння, біонанокомпозит, орлістат, інтоксикація.

**Вступ.** Ожиріння (ОЖ) – стан, що може бути визначений як аномальний ріст жирової тканини, за якого індекс маси тіла перевищує  $30 \text{ кг}/\text{м}^2$  – є найважливішим викликом для фундаментальної науки та клінічних досліджень сьогодення. Для вивчення механізмів ОЖ використовують тваринні моделі, в яких дана патологія може бути індукована зміною нервово-гуморальної регуляції, корекцією дієти або генетично.

Згідно концепції, розробленої українським дослідником Л.Л. Громашевською, при численних патологічних процесах у біологічних рідинах організму накопичуються патологічно високі концентрації продуктів ліпідного і вуглеводного обмінів, проміжних метаболітів і аномальних сполук, які виявляють токсичну дію на клітини печінки, нирок, головного мозку [1,2]. Більшість цих ендогенних токсинів належать до так званих молекул середньої маси (МСМ), а саме явище, що отримало назву синдрому ендогенної інтоксикації (СЕІ), характеризується низкою неспецифічних проявів інтоксикації організму, які мають місце при патологічних станах, що супроводжуються явищами запального характеру.

Всі МСМ у незначних кількостях наявні у біологічних рідинах організму і в нормі, але при патологіях, що супроводжуються розвитком СЕІ, вони накопичуються у великих кількостях залежно від типу хвороби, ступеня порушення функції органа або системи й природи ускладнень. Показник вмісту МСМ є достатньо чітким критерієм наявності "метаболічної інтоксикації" і використовується як маркер патологічних процесів різного походження.

Пептидні МСМ мають вазо-, кардіо-, нейро- та імуносупресивні властивості, інгібують такі метаболічні процеси як мітохондріальне дихання, синтез ДНК, синтез і утилізацію глукози, утворення гемоглобіну, активність ряду ферментів. Дія МСМ порушує транспорт амінокислот, спричиняє перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ) у тканинах мозку. Зростання рівня МСМ у 3-5 і б разів впливає на процеси метаболізму, мембра-

нотранспорту речовин, клітинний імунітет, фагоцитоз, глікопротеїн, глюконеогенез, еритропоез, тканинне дихання, мікроциркуляцію, лімфодинаміку, синтез нуклеїнових кислот, цитопротекцію, процеси антикоагуляції тощо [3].

Оскільки МСМ є маркером інтоксикації та її тяжкості, ступінь збільшення вмісту МСМ вказує на тяжкість захворювання та його ускладнень, а також відображає ефективність лікування.

Лікування ожиріння на сьогодні є досить важким завданням і здійснюється із використанням різноспрямованих фармакологічних стратегій, що включають обмеження поглинання калорій, підвищення фізичної активності, пригнічення кишкової абсорбції поживних речовин, модуляцію метаболізму жирів, регуляцію внутрішньоклітинної сигналізації у жировій тканині, модуляцію роботи центру голоду. Численні терапевтичні агенти, які роками використовувалися у клініці, на сьогодні обмежені у застосуванні чи навіть заборонені через їх серйозні побічні ефекти. Тому існує необхідність пошуку нових речовин і нових стратегій для ефективного лікування й профілактики ожиріння і супутніх йому захворювань.

Хімічні сполуки – складові натуруальні рослинні продукти – широко використовуються як діючі компоненти лікарських препаратів або харчових додатків. Внаслідок великого різноманіття цих складових і їх здатності діяти на численні біологічні мішенні, рослини можна вважати неоціненим джерелом для відкриття нових терапевтичних агентів для підтримки здоров'я, і, у тому числі, для протидії ожирінню [4].

*Trigonella foenum-graecum*, або фенугрек – це рослина, що здавна використовується у фітотерапії в різних країнах світу. Лікарські препарати на основі фенугреку виявляють гіполіпідемічну (відносно триацилгліцеролів (ТАГ), загального холестеролу, холестеролу ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНІЦ) і дуже низької щільності

© Голобородько Є., Іщук Т., Синельник Т., Конопельнюк В., 2016

му ця дія є повільною, але стійкою, що усуває ризик розвитку гіпоглікемії), мають антиоксидантні властивості. Їм властиві антибактеріальні і гепатопротективні впливи, здатністю стимулювати шлункову секрецію і лактацію, пригнічувати ріст пухлин [5]. Препаратори на основі фенуреку здатні знижувати масу тіла і масу жирової тканини, стимулюючи моторику кишечника та гальмуючи реабсорбцію із нього вуглеводів і жирних кислот [6,7].

**Методи дослідження.** Дослідження проводили на білих нелінійних щурах-самцях, яких з дотриманням положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, Франція, 1986), загальних етических принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), інших міжнародних угод і національного законодавства у цій галузі.

Тварин рандомізовано було розподілено на 6 групи по 10 у кожній. Тварини 1-ї групи - інтактний контроль (К); 2-ї групи – контрольні тварини, яким вводили біонанокомпозит в дозі 150 мг/кг протягом 21 доби [8]; 3-ї групи – контрольні тварини, яким вводили орлістат в дозі 10 мг/кг протягом 21 доби. 4-та група тварин – це щури у яких моделювали експериментальне ожиріння, протягом 14 тижнів (ВКД) [9]; 5-та група – тварини з ожирінням, яким вводили біонанокомпозит в дозі 150 г/кг протягом

21 доби; 6-та група – тварини з ожирінням, яким вводили орлістат в дозі 10 мг/кг протягом 21 доби.

Вміст МСМ та концентрацію олігопептидів визначали за модифікованим методом Габрілеян [10]. Метод базується на осадженні високомолекулярних пептидів і білків біологічних рідин з використанням трихлороцтвої кислоти і кількісним визначенням в отриманому центрифугуванням супернатанті середньомолекулярних пептидів за поглинанням в монохромному потоці світла при довжині хвилі 254 нм. Вміст білка визначали за методом Бредфорд [11].

Статистичний аналіз отриманих даних проводили з використанням загальноприйнятих методів варіаційної статистики із застосуванням One-Way ANOVA і t-test стандартного пакету прикладних програм Statistica 8.0. Для перевірки розподілу на нормальності було застосовано W тест Шапіро-Вілка. Порівняння вибірок проводилося за допомогою методу t критерія за Стьюдентом. Експериментальні дані представляли у вигляді  $M \pm m$  для кожної експериментальної групи. Різницю між показниками вважали статистично значущою при  $p < 0,05$ .

**Результати та обговорення.** Результати досліджень вказують на достовірне зростання рівнів МСМ у самців щурів, що отримували висококалорійну дієту, що відповідає розвитку СЕІ. При цьому потужні зміни виявляються у фракції олігопептидів.

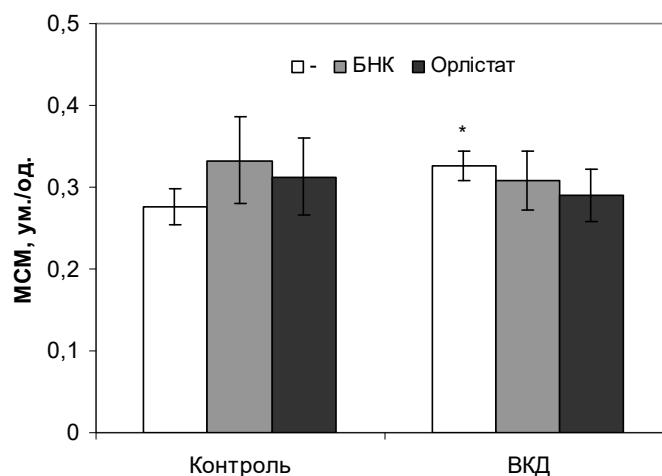


Рис. 1. Вміст молекул середніх мас в сироватці крові щурів (\*-  $p < 0,05$ )

Олігопептиди є основними представниками МСМ. До них належать продукти деградації сироваткових білків (альбуміну, фібриногену, макроглобуліну, глікопротеїнів, нуклеопротеїнів, гормонів, тромбіну) і фрагменти колагену. Вважають, що накопичення МСМ пептидної природи є результатом посиленої активності протеолітичних ферментів (зокрема, плазміну, матричних метапротеїназ, лейкоцитарних та лізосомальних протеолітичних ферментів, тощо) або недостатньої активності екзопептидаз, які у нормі відповідають за деградацію пептидів у крові [12-15].

За даними літератури, ожиріння і супутні йому захворювання асоціюються зі зростанням рівнів протеолізу [16]. Крім того, є багато вказівок на те, що у патоге-

незі ожиріння провідна роль належить окисному стресу. Він розвивається у різних тканинах (зокрема, в печінці, серці, нирках, тощо) і передбачає зниження вмісту глутатіону та активностей антиоксидантних ферментів із одночасним посиленням процесів ПОЛ і окисної модифікації білків, зокрема, їх карбонілювання [17]. Одним із наслідків окисної модифікації білків є підвищена чутливість модифікованих білків до протеолізу. За даними літератури, при ожирінні спостерігається підвищення карбонілювання білків, при цьому рівень модифікованих протеїнів позитивно корелює з індексом маси тіла. Активзація процесів вільнорадикального окиснення призводить до ендогенної інтоксикації та до збільшення вмісту молекул середньої маси [18,19].

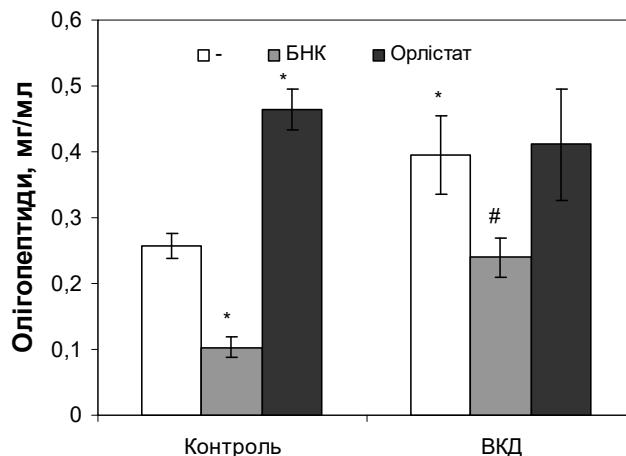


Рис. 2. Вміст олігопептидів в сироватці крові щурів (\*- p&lt; 0,05)

Механізм посилення окисного стресу за ожиріння на сьогодні недостатньо вивчений, але включає окиснення жирних кислот, мітохондріальну дисфункцію, активацію НАДФН-оксидази, акумуляцію іонів перехідних металів, які посилюють утворення вільних радикалів, у тому числі й гідроксильного радикала у реакції Фентона. Є також дані про підвищення експресії генів, що кодують субодиниці НАДФН-оксидази, і зниження експресії генів ферментів-антиоксидантів [20].

Нарешті, ще однією причиною зростання за умов розвитку ожиріння вмісту МСМ може бути порушення видільної здатності нирок [21].

Результати численних досліджень структури нирки та морфометричних параметрів нирок щурів, що отримували висококалорійну дієту, показують наявність змін у масі нирки, її розмірі, розмірах коркової, мозкової частини, клубочків, дегенерацію нефронів, зокрема гломерулосклероз і дефекти канальців, зростання вмісту сполучної тканини у нирках [22].

Одним із найважливіших чинників, які можуть спричинити ушкодження структури і функцій нирок та печінки за ожиріння, може бути розвиток окисного стресу в цих тканинах, який характеризується зниженням активностей ферментів антиоксидантного захисту й рівнів відновленого глутатіону, що корелює зі зростанням вмісту малонового діальдегіду й карбонільзованих білків у цих тканинах. Це може бути причиною подальшої прогресії ОЖ та його патологічних наслідків [23].

Результати проведених нами досліджень вказують на відсутність достовірних змін у вмісті МСМ за профілактичного введення орлістату, а також біонанокомпозиту на основі фенугреку: в щурів в умовах висококалорійної дієти при застосуванні обох сполук рівень МСМ достовірно не відрізняється від контрольних значень. У той же час, потужні зміни виявлено у фракції олігопептидів. Застосування орлістату не тільки не зменшує рівні продуктів деградації білків у щурів із висококалорійною дієтою, але й спричиняє їх потужне формування в контрольній групі. Поясненням цього можуть бути побічні ефекти, характерні для цього лікарського препарата. Окрім стеатореї – загальновідомого наслідку застосування орлістату – ряд досліджень вказує на порушення за його застосування редокс-балансу організму за рахунок зниження рівнів глутатіону і, відповідно, активності глутатіон-залежної системи антиоксидантного захисту. Крім того, внаслідок пригнічення реабсорбції у кишечнику жирів порушується надходження в організм таких важливих жиророзчинних антиоксидантів, як вітамін А і Е. Розвиток окисного стресу, сприяючи окисній

модифікації білків, може бути причетним до їх посиленого катаболізму.

Також у ряді робіт описані і інші побічні ефекти орлістату – у тому числі порушення роботи печінки і гостре ушкодження нирок. Орлістат може спричинити гостре ушкодження нирок шляхом стимуляції кишкової гіпероксалурії, яка також спостерігається в пацієнтів з малабсорбцією жирів. Неабсорбовані жири в тонкому кишечнику утворюють кальцієві міла, що знижує всмоктування із кишечнику вільного кальцію. В результаті кальцій вже не може зв'язувати оксалат в кишечнику, що викликає посилення реабсорбції оксалату нирками. Надмірне насичення оксалатами канальцевої рідини є ризик-фактором утворення кальцій-оксалатних преципітатів, які можуть спровокувати розвиток гострого ушкодження нирок. Низка доповідей вказують при цьому на зниження за дії орлістату швидкості клубочкової фільтрації, що теж уповільнює виділення олігопептидів із організму.

На відміну від орлістату, біонанокомпозит на основі фенугреку достовірно знижує рівні олігопептидів як у контрольній групі, так і в щурів із висококалорійною дієтою. При цьому в останньому випадку значення показника достовірно не відрізняється від норми. Поясненням такої дії можуть бути особливості дії речовин складових фенугреку на різні ланки метаболізму.

Найважливішими компонентами препаратів на основі фенугреку є три сполуки – діօсгенін (найважливіший сапонін цієї рослини), 4-гідроксизолейцин (4-OH-Ile) і компоненти розчинних волокон фенугреку – галактоманнані. Ці сполуки виявляють потужні впливи на метаболізм глукози і ліпідів, систему інсулінового сигналінгу, функціональний стан печінки і нирок, на розвиток процесів запалення.

Позитивні впливи біонанокомпозиту на основі фенугреку на рівні олігопептидів, а, отже, і на прояви СЕІ, таким чином пов'язані із загальною нормалізацією метаболізму щурів як контрольної групи, так і тварин, які отримували висококалорійну дієту. Ще однією причиною зниження вмісту пептидних маркерів СЕІ за профілактичного введення біонанокомпозиту є потужні антиоксидантні властивості фенугреку, зумовлені наявністю таких компонентів, як поліфеноли і біофлавоноїди, сапоніни, вітаміни, селен тощо. Дані численних досліджень вказують на те, що компоненти, які входять до складу фенугреку, володіють здатністю вловлювати активні форми кисню, пригнічувати процеси ПОЛ і сприяти функціям ферментативних антиоксидантів [5], [Ошика! Источник ссылки не найден.]. Профілактичне введення фенугреку також покращує функціональ-

ний стан нирок, значно знижуючи загальний вміст кальцію у нирковій тканині, пригнічуючи процеси кальціфікації, підвищуючи рівень антиоксидантного захисту, зменшуючи прояви окисного стресу, зокрема, гальмуючи процеси ПОЛ.

**Висновок.** Показано збільшення вмісту маркерів синдрому ендогенної інтоксикації – молекул середньої маси та олігопептидів – в плазмі крові щурів із експериментальним ожирінням, що може бути наслідком як посиленого протеолізу, в тому числі й окисномодифікованих білків, так і порушенням видільнної здатності нирок. Введення орлістату і біонанокомпозиту на основі фенугреку сприяє утриманню показника вмісту MCM у межах норми. У той же час застосування орлістату спричиняє збільшення рівнів олігопептидів як у контрольній групі, так і в щурів в умовах висококалорійної дієти, що може бути зумовлене вираженими побічними ефектами цього лікарського препарату на структуру і функціональну активність нирок, а також стимуляцією ним окисного стресу. Застосування біонанокомпозиту на основі фенугреку знижує рівні олігопептидів у щурів контрольної групи, а також нормалізує зазначений показник у щурів в умовах досліду. Поясненням цього може бути наявність у складі фенугреку діючих речовин – діосгеніну, галактоманнанів, вітамінів-антиоксидантів, селену, тощо, які здатні підвищувати антиоксидантний захист організму і, поряд з нормалізацією метаболізму ліпідів і вуглеводів, покращувати функції органу, що здійснює виділення ендогенних токсинів, які належать до групи олігопептидів.

У цілому, незважаючи на високу ефективність синтетичних інгібіторів дисахаридаз і ліпаз, зокрема, орлістату, щодо зниження вмісту глюкози і ліпідів у плазмі крові, ці препарати мають потужні побічні ефекти, які зумовлюють накопичення в організмі маркерів ендогенної інтоксикації – олігопептидів, а, отже, і розвиток відповідного синдрому. Інгібітори рослинного походження внаслідок наявності цілого спектру діючих речовин, здійснюють синергічні впливи на різні ланки метаболізму, що відбуваються у різних тканинах, і є в цьому плані більш ефективними.

#### Список використаних джерел

- Нетюхайло Л. [Молекули середньої маси – маркери ендогенної інтоксикації при експериментальній опіковій хворобі] / Л. Нетюхайло // Сучасні проблеми токсикології. – 2005. – №3. – С. 57-58.
- Коваль Т.В. [Вміст молекул середньої маси та олігопептидів у крові та тканинах щурів за умов розвитку кислотного опіку стравоходу] / Т.В. Коваль, Т.В. Іщук, Я.Б. Раєцька, О.М. Савчук, Л.І. Остапченко // Біологічні системи. – 2015. – Т.7, № 2. – С. 144-148.
- Mykolenko A. [Changes of concentration of middle mass molecules in blood serum in the early days of isolated orthopedic trauma complicated by blood loss] A. Mykolenko // Deutscher Wissenschaftsherold – German Science Herald. – 2016. – №2. – P. 16 – 18.
- Kumar P. [Common medicinal plants with antibesity potential: A special emphasis on fenugreek] / P. Kumar, U. Bhandari // Ancient Science of Life. – 2015. – Vol. 35, №1. – P. 58–63.
- Wani S.A. [Fenugreek: A review on its nutraceutical properties and utilization in various food products] / S.A. Wani, P. Kumar // Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences. – 2016. – Vol. 15. – P. 23-29.
- Akbari M. [Physiological and pharmaceutical effect of fenugreek: a review] / M. Akbari, H. Rasouli, T. Bahdor // IOSR Journal of Pharmacy (IOSRPHR). – 2012. – Vol. 2, №4. – P. 49-53.
- Geetha M. [Effect of Fenugreek on Total Body and Organ Weights: A Study on Mice] / M. Geetha, S. Reddy, A. Krupanidhi [et al.] // Pharmacologyonline. – 2011. – Vol. 3. – P. 747-752.
- Voronin EF. Effect of mechanical activation of highly dispersed silica on some of its properties / Voronin EF, Pakhlov EM, Sydorchuk VV, Chuiko AA // Ukrainian Chemical Journal. – 1995. – Vol. 61, №10. – P. 90-92.
- Hua Shen. Vitamin E regulates adipocytokine expression in a rat model of dietary-induced obesity / Hua Shen, Qing-Ya Tang, Juan Huang // Exp Biol Med. – 2010. – Vol. 235, №1. – P. 47-51.
- Габриелян Н.И. [Скринінговий метод определения средних молекул в биологических жидкостях: Методические рекомендации] / Н.И. Габриелян, Э.Р. Левицкий, Ф.Ф. Дмитриев [и др.]. – М., 1985. С. 11.
- Bradford M.M. [A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding] / M.M. Bradford // Analytical Biochemistry. – 1976. – Vol. 72, №1-2. – P. 248-254.
- Galaktionov S. ["Middle molecules" – Endotoxins of peptide nature] / S. Galaktionov, V. Nikolaichik, V. Tseitin, L. Mikhneva // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 1983. – Vol. 17, №11. – P. 759-765.
- Hua Y. [Proteases in cardiometabolic diseases: Pathophysiology, molecular mechanisms and clinical applications] / Y. Hua, S. Nair // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease. – 2015. – Vol. 1852, №2. – P. 195–208.
- Van Hul M. [A functional role of gelatinase A in the development of nutritionally induced obesity in mice] / M. Van Hul, R. Lijnen // Journal of Thrombosis and Haemostasis. – 2008. – Vol. 6, №7. – P. 1198-1206.
- Vincent H. [Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans] / H. Vincent, A. Taylor // International Journal of Obesity. – 2006. – Vol. 30. – P. 400-418.
- Jensen M. [Protein metabolism in obesity: effects of body fat distribution and hyperinsulinemia on leucine turnover] / M. Jensen, M. Haymond // The American Journal of Clinical Nutrition. – 1991. – Vol.53, №1. – P. 172-176.
- Noeman S. [Biochemical Study of Oxidative Stress Markers in the Liver, Kidney and Heart of High Fat Diet Induced Obesity in Rats] / S. Noeman, H. Hamooda, A. Baalash // Diabetology & Metabolic Syndrome. – 2011. – Р. 3 -17.
- Гордієнко Л.П. [Протеїназно-інгібіторний потенціал та вільно-радикальні процеси у тканинах спинних залоз щурів за умов глутамат-індукуваного ожиріння] / Л.П. Гордієнко // ВІСНИК ВДНЗУ "Українська медична стоматологічна академія". – Т. 13, Вип. 4 (44). – С. 82-84.
- Бондаренко В. [Молекули середньої маси в тканинах спинних залоз при експериментальній опіковій хворобі] / В. Бондаренко, Л. Нетюхайло, Д. Аветіков // Таврійский медико-биологический вестник. – 2012. – Т. 15, № 3 (ч. 1). – С. 49-50.
- Kesh S. [High-fat diet-induced oxidative stress and its impact on metabolic syndrome: a review] / S. Kesh, D. Sarkar, K. Manna // Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. – 2016. – Vol 9, №1. – P. 47-52.
- Hetman O. [Determination of amino acids and protein metabolism indices in patients with arterial hypertension] O. Hetman // Ліки України. – 2014. – Т. 21, №4. – С. 87-89.
- Wicks S. [Diet-induced obesity and kidney disease – In search of a susceptible mouse model] / S. Wicks, T. Nguyen, C. Breaux [et al.] // Biochimie. – 2016. – Vol.124. – P. 65-73.
- Wickman C. [Obesity and kidney disease: potential mechanisms] / C. Wickman, H. Kramer // Obesity and kidney disease: potential mechanisms // Seminars in Nephrology. – 2013. – Vol. 33, №1. – P. 14-22.

#### References

- Нетюхайло Л. Молекули середньої маси – маркери ендогенної інтоксикації при експериментальній опіковій хворобі. Сучасні проблеми токсикології. 2005; 3: 57-58.
- Коваль Т, Іщук Т, Раєцька Я, Савчук О, Остапченко Л. Вміст молекул середньої маси та олігопептидів у крові та тканинах щурів за умов розвитку кислотного опіку стравоходу. Біологічні системи. 2015; 7(2): 144-148.
- Mykolenko A. Changes of concentration of middle mass molecules in blood serum in the early days of isolated orthopedic trauma complicated by blood loss. Deutscher Wissenschaftsherold – German Science Herald. 2016; 2: 16 – 18.
- Kumar P, Bhandari U. Common medicinal plants with antibesity potential: a special emphasis on fenugreek. Anc Sci Life. 2015; 35(1):58-63.
- Wani S, Kumar P. Fenugreek: A review on its nutraceutical properties and utilization in various food products. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences. 2016; 15:23-29.
- Akbari M, Rasouli H, Bahdor T. Physiological and pharmaceutical effect of fenugreek: a review. IOSR Journal of Pharmacy (IOSRPHR). 2012; 2(4):49-53.
- Geetha M, Reddy S, Krupanidhi A, et al. Effect of Fenugreek on total body and organ weights: a study on mice. Pharmacologyonline. 2011; 3:747-752.
- Voronin EF, Pakhlov EM, Sydorchuk VV, Chuiko AA. Effect of mechanical activation of highly dispersed silica on some of its properties. Ukrainian Chemical Journal. 1995; 61(10):90-92.
- Hua Shen, Qing-Ya Tang, Juan Huang. Vitamin E regulates adipocytokine expression in a rat model of dietary-induced obesity. Exp Biol Med. 2010;235(1):47-51.
- Габриелян НИ, Левицкий ЭР, Дмитриев ФФ, и др. Скрининговый метод определения средних молекул в биологических жидкостях. Методические рекомендации. М., С.11. 1985.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 72: 248-254.
- Galaktionov S, Nikolaichik V, Tseitin V, Mikhneva L. "Middle molecules" – endotoxins of peptide nature. Pharm Chem J. 1983; 17(11): 759-765.
- Hua Y, Nair S. Proteases in cardiometabolic diseases: pathophysiology, molecular mechanisms and clinical applications. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease. 2015; 1852(2): 195–208.

14. Van Hul M, Lijnen R. A functional role of gelatinase A in the development of nutritionally induced obesity in mice. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2008; 6(7): 1198-1206.
15. Vincent H, Taylor A. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *International Journal of Obesity*. 2006; 30: 400-418.
16. Jensen M, Haymond M. Protein metabolism in obesity: effects of body fat distribution and hyperinsulinemia on leucine turnover. *Am J Clin Nutr*. 1991; 53(1): 172-176.
17. Noerman S, Hamooda H, Baalash A. Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 2011; 3(23): 3-17.
18. Гордієнко Л. Протеїназно-інгібіторний потенціал та вільновідмінні процеси у тканинах сливних залоз щурів за умов глутамат-індукованого ожиріння. ВІСНИК ВДНЗУ "Українська медична стоматологічна академія" 13(44):82 - 84.
19. Бондаренко В, Нетюхайло Л, Аветіков Д. Молекули середньої маси в тканинах сливних залоз при експериментальній опіковій хворобі. *Таврійський медико-біологічний вестник*. 2012; 15(3): 49-50.
20. Kesh S, Sarkar D, Manna K. High-fat diet-induced oxidative stress and its impact on metabolic syndrome: a review. *Asian J Pharm Clin Res*. 2016; 9(1): 47-52.
21. Hetman O. Determination of amino acids and protein metabolism indices in patients with arterial hypertension. *Ліки України*. 2014; 21(4): 87 - 89.
22. Wicks S, Nguyen T, Breaux C, et al. Diet-induced obesity and kidney disease – In search of a susceptible mouse model. *Biochimie*. 2016; 124: 65-73.
23. Wickman C, Kramer H. Obesity and kidney disease: potential mechanisms. *Semin Nephrol*. 2013; 33(1): 14-22.

**Надійшла до редакції 08.09.16**

Е. Голобородько, асп., Т. Іщук, канд. біол. наук, Т. Синельник, канд. біол. наук, В. Конопельнюк, канд. біол. наук  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

## **СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТОВ ЛЕЧЕБНОГО ВВЕДЕНИЯ ОРЛИСТАТА И БИОНАНОКОМПОЗИТА НА ОСНОВЕ ФЕНУГРЕКА НА ПОКАЗАТЕЛИ-МАРКЕРЫ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ОЖИРЕНИЕМ**

*Исследованы маркеры эндогенной интоксикации у крыс-самцов в условиях развития ожирения индуцированного потреблением высококалорийной диеты. Проведен сравнительный анализ лечебных эффектов введения бионанокомпозита и орлистат на основе показатели эндоинтоксикации. В ходе исследований показано увеличение содержания молекул средней массы и олигопептидов в крови крыс с экспериментальным ожирением, а также нормализацию содержания данных показателей в условиях введения бионанокомпозита животным с ожирением.*

**Ключевые слова:** ожирение, бионанокомпозит, орлистат, интоксикация.

I. Goloborodko, PhD stud., T. Ishchuk, PhD, T. Synelnyk, PhD, V. Konopelniuk, PhD  
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

## **COMPARATIVE ANALYSIS THERAPEUTIC EFFECTS INTRODUCTION BIONANOCOMPOSITE AND ORLISTAT WHICH BASED ON FENUGREEK ON INDICATORS – MARKERS OF ENDOGENOUS INTOXICATION IN RATS WITH EXPERIMENTAL OBESITY**

*It were studied the markers of endogenous intoxication in males rats under development of the obesity induced by consumption of high-calorie diet. The article presents comparative analysis of the therapeutic effects with introduction bionanocomposite and orlistat which basic on the indicators of endogenous intoxication. It was shown increase the level of middle-mass molecules and oligopeptides in serum rats with obesity during of the research and normalization of these indicators after introduction bionanocomposit animals with obesity.*

**Keywords:** obesity, bionanocomposite, orlistat, intoxication.

УДК 616.72-002-031.13:577.125.8

Є. Тіхова, асп., О. Берник, канд. біол. наук,  
О. Савчук, д-р біол. наук, К. Дворщенко, д-р біол. наук,  
Л. Остапченко, д-р біол. наук  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

## **ІНТЕНСИВНІСТЬ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ У ХРЯЩОВІЙ ТКАНИНІ ЩУРІВ З КОЛАГЕН-ІНДУКОВАНИМ АРТРИТОМ**

*Досліджено продукти вільновідмінного окиснення та ферменти антиоксидантного захисту у щурів з колаген-індукованим артритом. Встановлено, що у хрящовій тканині щурів за умов експериментальної моделі артриту збільшується вміст супероксид аніон-радикалу, пероксидів та ТБК-активних сполук та зростає активність антирадикальних ферментів супероксиддисмутази та каталази.*

**Ключові слова:** запалення суглобів, хрящи, окисний стрес, активні форми кисню, антиоксидантні ферменти.

**Вступ.** Остеоартріт або дегенеративне захворювання суглобів, є гетерогенною групою захворювань з фокальним руйнуванням суглобового хряща, змінами в субхондральній кістці (мікропереломи і утворення кіст) і утворенням остеофітів. Причиною розвитку хвороби вважають сукупність механічних та біологічних факторів, наприклад, зовнішній аномальний механічний стрес чи генетичні аномалії [1].

Остеоартріт є найрозвитковішим за формою ураженням суглобів і однією з причин недієздатності, особливо для літніх людей. В Україні поширеність остеоартріту складає 497,0 на 100 тис. населення. За статистикою цей показник нижчий, ніж в США, але вищий, ніж у Великобританії. Така поширеність зумовлена недостатніми профілактичними заходами та як наслідок, діагностикою вже на пізніх стадіях, повільним впровадженням сучасних методів діагностики та лікування. Перші помітні ознаки хвороби: біль, набряк та обмежена рухли-

вість можуть початися в будь-якому віці, але найчастіше люди звертаються за допомогою у 30 – 50 років. Останнім часом спостерігається зниження віку хворих. Встановлено, що у молодому віці більше страждають чоловіки, а в старшому – жінки [2].

Відомо, що запальні процеси при артритах супроводжуються деградацією компонентів синовіальної рідини та хряща: гіалуронової кислоти та хондроїтинсульфату. Остеокласти використовують активні форми кисню (АФК) для руйнування кістки в процесі її оновлення, але при запаленні процес деструкції іде швидше за процес синтезу, що призводить до переломів і утворення кіст. Таким чином, окисний стрес можна розглядати як один з факторів, що сприяє розвитку патології суглобів та оточуючих тканин [3, 4].

В зв'язку з цим метою нашої роботи було визначити інтенсивність вільновідмінних процесів, які

відбуваються в хрящовій тканині при експериментальному артриті у щурів.

**Об'єкт та методи досліджень.** Роботу було виконано на білих нелінійних щурах обох статей масою 180–240 г, що утримувались на стандартному рационі вівіарію. При роботі з тваринами дотримувались загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 р) та міжнародних угод у цій галузі. Перед початком експерименту було виділено колаген II типу з гіалінових хрящів телят за методами, описаними в літературі [5, 6]. Наявність колагену підтверджували електрофорезом за Laemmli у поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію [7].

Тварин розділяли на три експериментальні групи. Кожна група включала по 5 тварин кожної статі. Остеоартрит моделювали за схемою: I група – контрольні щури, яким в перший день підшкірно вводили воду для ін'єкцій, загальним об'ємом 1мл; II група – щури, яким в перший день вводили охолоджену емульсію: 0,5 М оцтової кислоти з повним ад'ювантом Фрейнда у співвідношенні 1:1, загальним об'ємом 1мл; III група – щури, яким в перший день експерименту вводили охолоджену емульсію: розчин колагену в 0,5 М СН<sub>3</sub>COOH з повним ад'ювантом Фрейнда у співвідношенні 1:1 загальним об'ємом 1 мл підшкірно у 10 точок по задній частині спини. Колаген вводили з розрахунку 3 мг/кг щурів. Емульсії готовили за добу до введення, залишаючи на ніч при 4°C на магнітній мішалці. Через тиждень проводили повторну імунізацію з використанням неповного ад'юванта Фрейнда. Декапітацію щурів проводили на 30 день після першої імунізації. Одразу видаляли гіалінові хрящі колінних суглобів і зберігали при -20°C до початку досліджень.

У гомогенаті хрящової тканини визначали наступні показники. Вміст білка вимірювали за методом Лоурі [8]. Вміст супероксидного аніон-радикалу визначали спектрофотометрично з використанням ХТТ (2,3-біс-(2-метокси-4-нітро-5-сульфофеніл)-2Н-тетразолій-5-карбоксанілід) як акцептора електронів [9, 10], вміст пероксиду водню встановлювали спектрофотометрично з використанням барвника ксіленол оранж [11]. Вміст ТБК-активних продуктів визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) [12]. Активність супероксиддисмутази визначали спектрофотометрично з використанням нітросинього тетразолію [13]. Активність каталази визначали спектрофотометричним методом по утворенню комплексів при взаємодії пероксиду водню з солями молібдену [14]. Статистичну обробку результатів дослідження проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Вірогідність різниці між контрольними та дослідними вимірами оцінювали за t-критерієм Стьюдента [15].

**Результати та обговорення.** В ході проведених експериментальних досліджень встановлено, що у щурів при колаген-індукованому артриті та при введенні ад'юванту у гомогенатах хряща вміст АФК збільшується. У гомогенатах хрящів самок із запаленням, викликаним ад'ювантом, виявлено достовірне зростання вмісту супероксидного аніон-радикалу в 1,2 раза, у тварин з колаген-індукованим артритом – у 2 рази для самок і в 1,4 раза для самців порівняно з контролем. Відповідні зміни характерні і для вмісту пероксидів: у самок з колаген-індукованим запаленням кількість пероксидів в гомогенатах хрящів зросла в 1,6 раза; у самців з ад'юvantним запаленням – в 1,3 раза, з колагеновим – в 1,9 раза порівняно з відповідними контрольними групами (табл. 1).

**Таблиця 1. Вміст активних форм кисню у гомогенаті хрящів колінних суглобів щурів при остеоартриті (М±m, n=5)**

Стать	Групи тварин	Вміст супероксидного аніон-радикалу, мкмоль × мг протеїну <sup>-1</sup>	Вміст пероксидів, мкмоль × мг протеїну <sup>-1</sup>
♀	Контроль	6,71 ± 0,54	7,09 ± 0,58
	Ад'ювант	7,79 ± 0,63	6,93 ± 0,56
	Колаген	13,38 ± 1,08	11,52 ± 0,94
♂	Контроль	6,79 ± 0,54	6,48 ± 0,62
	Ад'ювант	7,18 ± 0,57	8,34 ± 0,81
	Колаген	9,39 ± 0,75	12,21 ± 1,17*

\* – p < 0,05 відносно контрольних показників відповідних груп

Подібні результати були отримані Koike M. та Pathak N. N., які показали, що у щурів з експериментальною моделлю остеоартриту в тканинах хряща зростала концентрація супероксидного аніон-радикалу внаслідок розвитку запалення, опосередкованого інтерлейкіном-1 $\beta$  [16, 17].

Виявлене нами при експериментальному остеоартриті збільшення рівня АФК у запаленому суглобі може відбуватись внаслідок синтезу прооксидантів активованими макрофагами синовіальної мембрани, хондроцитами, активованими нейтрофілами синовіальної порожнини. Крім того, вважається, що при русі в порожнині запаленого суглоба створюється надмірний тиск, що викликає короткочасну ішемію поверхневої мембрани. У здоровій синовіальній порожнині створюється нижчий тиск, при рухах в суглобі це зберігає судинну проникність, яка дозволяє поживним речовинам досягати клітин безсудинного хряща через синовіальну рідину. При запаленні тиск в порожнині зростає, при рухах він перевищує тиск капілярної перфузії, викликаючи колапс кровоносних судин. Це призводить до гіпоксичного ре-перфузійного ураження, за якого генеруються вільні радикали. АФК окислюють: імуноглобулін G, викликаючи синтез ревматоїдного фактора; гіалуронову кислоту,

призводячи до утворення фрагментів гіалуронату зі зміненими імунними властивостями; ліпіди, генеруючи токсичні альдегіди, які можуть змінювати взаємодію Т-клітин / макрофагів; ліпопротеїди, що викликає синтез хемотаксисних пептидів моноцитів [18].

У відповідь на пошкодження тканин при травмі чи ато-імунному порушенні поліморфоядерні фагоцити синовіальної оболонки суглобів синтезують супероксид аніон-радикал шляхом одноелектронної редукції молекулярного кисню за фізіологічних умов та оксид азоту. Оксид азоту здатен реагувати з супероксид аніон-радикалом з утворенням пероксинітрат аніону – сильного окисника з бактерицидною дією. В організмі пероксинітрат аніон протонується до пероксинітритної кислоти – довго існуючого окисника. Надалі кислота розкладається з утворенням окисника з властивостями, подібними до гідроксил радикалу, який ініціює перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ) [19].

Помічено, що супероксид аніон-радикал викликає деполімеризацію гіалуронової кислоти та деградацію синовіальної рідини. В нормі при додаванні до синовіальної рідини розведеної оцтової кислоти вона утворює щільний білий муцинозний згусток, а при окисному стресі в запалених суглобах згусток стає пухким і роз-

падається при струшуванні. Синовіальна рідина змащує поверхні суглобів для попередження стирання контактуючих поверхонь, забезпечує живлення хондроцитів та слугує амортизатором при рухах, тому зміни в її структурі безпосередньо впливають на весь суглоб та оточуючі тканини [20].

АФК ( $H_2O_2$ ,  $OH^-$  та  $O_2^-$ ) у реакціях з ненасиченими ліпідами мембрани здатні утворювати дієнові кон'югати (первинні продукти ПОЛ) та малоновий діальдегід (МДА,

вторинний продукт ПОЛ), що призводить до руйнування мембраних структур клітини [21]. У проведених експериментальних дослідженнях встановлено, що у тварин з колагеновим запаленням зростав рівень вторинних продуктів ПОЛ – ТБК-активних продуктів (ТБК-АП) – у 3,1 раза для самок і у 2 рази для самців порівняно з контролем. У самців з ад'ювантним артритом також зафіковано статистично достовірне збільшення рівня ТБК-АП – в 1,7 раза відносно контролю (табл. 2).

**Таблиця 2.** Вміст ТБК-активних продуктів у гомогенаті хрящів колінних суглобів щурів при остеоартриті (M±m, n=5)

Стать	Групи тварин	нмоль × мг протеїну <sup>-1</sup>
♀	Контроль	58,74 ± 5,08
	Ад'ювант	67,32 ± 5,82
	Колаген	181,09 ± 15,66
♂	Контроль	67,61 ± 4,72
	Ад'ювант	114,65 ± 8,01
	Колаген	133,24 ± 9,32

\* – p < 0,05 відносно контрольних показників відповідних груп

Отримані результати свідчать про розвиток окисного стресу в хрящовій тканині щурів з остеоартритом. Згідно даних інших дослідників – Umar S. та Campo G. M. – також виявлено, що на моделі колаген-індукованого артриту щурів посилюються процеси ліпідної пероксідації в тканинах колінних суглобів, а саме, накопичується МДА [22, 23].

Утворений МДА взаємодіє з макромолекулами, що містять первинні аміногрупи, наприклад, білків, фосфоліпідів і нуклеїнових кислот, що призводить до утворення поперечних зшивок між макромолекулами, що робить їх токсичними, а також наділяє властивостями мутагенів і канцерогенів [24].

В організмі є механізми захисту від ПОЛ ще на етапі ініціації. Так, супероксиддисмутаза (СОД) інактивує су-

пероксид аніон-радикал у реакції дисмутації, а каталаза знешкоджує пероксид водню.

Встановлено, що за умов хронічного ад'ювантного запалення суглобів щурів активності антиоксидантних ферментів супероксиддисмутази і каталази достовірно знижуються: супероксиддисмутазна активність – в 1,4 раза для самок і самців, каталазна активність – в 1,6 раза в групі самок. У групі тварин з колаген-індукованим артритом активності ферментів зростали: супероксиддисмутазна активність – в 2,4 раза у самиць і в 1,9 раза у самців, каталазна активність – в 10,1 раза у самиць і в 5,4 раза у самців, що може свідчити про активацію антиоксидантного захисту в хрящових тканинах тварин (табл. 3).

**Таблиця 3.** Активність антирадикальних ферментів у гомогенаті хрящів колінних суглобів щурів при остеоартриті (M±m, n=5)

Стать	Групи тварин	Супероксиддисмутазна активність, ум. од. × хв <sup>-1</sup> × мг протеїну <sup>-1</sup>	Кatalазна активність, нмоль × хв <sup>-1</sup> × мг протеїну <sup>-1</sup>
♀	Контроль	0,285 ± 0,025	8,15 ± 0,71
	Ад'ювант	0,114 ± 0,10*	5,00 ± 0,43*
	Колаген	0,672 ± 0,061*	82,35 ± 7,09*
♂	Контроль	0,386 ± 0,037	10,91 ± 0,76
	Ад'ювант	0,147 ± 0,014	12,69 ± 0,89
	Колаген	0,718 ± 0,069	58,82 ± 4,11

\* – p < 0,05, відносно контрольних показників відповідних груп

Отримані результати погоджуються з даними Roy та Jeyadevi R., які показали зниження активностей СОД та каталази на фоні збільшеного рівня ПОЛ у хрящових тканинах щурів з ад'ювантним артритом [25, 26]. Zhuang та ін. описали зростання ферментативних активностей СОД та каталази в культурах хондроцитів щурів з остеоартритом як відповідь на збільшення концентрації пероксидів [27].

Каталаза не має високої спорідненості до перекису водню і не може ефективно знешкоджувати його в низьких концентраціях за межами пероксисом, отже накопичені в синовіальній рідині пероксиди викликають окиснення мембраних ліпідів хондроцитів гіалінового хряща і порушення їх життєдіяльності і, як наслідок, патологію суглобів.

**Висновок.** Таким чином, при хронічному запаленні в суглобах, індукованому введенням ад'юванту Фрейнда та колагену, у гомогенатах хрящів колінних суглобів щурів зростає вміст активних форм кисню, пероксидів і продуктів перекисного окиснення ліпідів, та спостерігається

порушення роботи ферментів антирадикального захисту, що свідчить про зміщення редокс-гомеостазу клітин у прооксидантний бік та розвиток окисного стресу.

#### Список використаних джерел

1. Реман К., Лейн Н. // Межд. Мед. Ж. – 2000. – 1. – С. 22-28.
2. Корж Н. А., Филиппенко В. А., Дедух Н. В. // Вісник ортопедії та травматології та протезування. – 2004. – 3. – С. 75–79.
3. Kean W. F., Kean R., Buchanan W. W. // Inflammopharmacology. – 2004. – 12. – Р. 3-31.
4. Кулинський В. И. // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – 1, №. 38. – С. 2.
5. Zhang F. et al. // Food and Nutrition Sciences. – 2011. – 2, №. 8. – Р. 818.
6. Singh P. et al. // Food Chemistry. – 2011. – 124, №. 1. – Р. 97-105.
7. Laemmli U. K. // Nature. – 1970. – 227–Р. 680-685.
8. Hartree E. F. // Analytical biochemistry. – 1972. – 48, №. 2. – Р. 422-427.
9. Sutherland M. W., Learmonth B. A. // Free radical research. – 1997. – 27, №. 3. – Р. 283-289.
10. Able A. J., Guest D. I., Sutherland M. W. // Plant Physiology. – 1998. – 117, №. 2. – Р. 491-499.
11. Gay C. A., Gebicki J. M. // Analytical biochemistry. – 2003. – 315, №. 1. – Р. 29-35.

12. Современные методы в биохимии // Под ред. Ореховича В. Н. – М: Медицина – 1977. – С. 62-68.
13. Чевари С., Чаба И., Секей Й. // Лабораторное дело. – 1985. – 11. – С. 678-681.
14. Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г. и др. // Лабораторное дело. – 1988. – 1. – С. 16-18.
15. Філімонова Н. Б., Філь І. О., Михайлова Т. С. // Медицина залізничного транспорту України – 2004. – 4. – С. 85-93.
16. Koike M, Nojiri H, Ozawa Y, et al. // Scientific Reports. – 2015. – 5. – P. 11722.
17. Pathak N. N. et al. // Inflammation Research. – 2015. – 64, № 3-4. – Р. 161-169.
18. Bauerova K., Bezek S. // General physiology and biophysics. – 2000. – 18. – Р. 15-20.
19. Ródenas J., Mitjavila M. T., Carbonell T. // Free Radical Biology and Medicine. – 1995. – 18, № 5. – Р. 869-875.
20. Внуков В. В. и др. // Валеология. – 2012. – 4. – С. 38.
21. Чеснокова Н. П., Понукалина Е. В., Бизенкова М. Н. // Успехи современного естествознания. – 2006. – 7. – С. 21-26.
22. Umar S. et al. // Chemico-biological interactions. – 2012. – 197, № 1. – Р. 40-46.
23. Campo G. M. et al. // Arthritis Res Ther. – 2003. – 5, № 3. – Р. 1.
24. Маханова Р. С. // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2011. – 1, № 29. – С. 24-25.
25. Roy S. et al. // European journal of pharmacology. – 2013. – 698, № 1. – Р. 444-454.
26. Jeyadevi R. et al. // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2013. – 112. – Р. 255-263.
27. Zhuang C. et al. // International journal of biological macromolecules. – 2016. – 87. – Р. 322-328.
10. Able AJ, Guest DI, Sutherland MW. Use of a New Tetrazolium-Based Assay to Study the Production of Superoxide Radicals by Tobacco Cell Cultures Challenged with Avirulent Zoospores of Phytophthora parasitica varnicotianae. Plant Physiology 1998;117(2):491-499.
11. Gay CA, Gebicki JM. Measurement of protein and lipid hydroperoxides in biological systems by the ferric-xylenol orange method. Analytical biochemistry 2003;315(1):29-35.
12. Современные методы в биохимии. Под ред. Ореховича В. Н. М: Медицина 1977:62-68.
13. Чевари С., Чаба И., Секей Й. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах. Лабораторное дело 1985;11:678-681.
14. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И. Г. и др. Метод определения активности катализы. Лабораторное дело 1988;1:16-18.
15. Філімонова Н.Б., Філь І.О., Михайлова Т.С. Статистичний аналіз даних відповідно до засад науково обґрунтованої медицини. Первінний аналіз кількісних даних, подання результатів експерименту. Медицина залізничного транспорту України 2004;№4:85-93.
16. Koike M, Nojiri H, Ozawa Y, et al. Mechanical overloading causes mitochondrial superoxide and SOD2 imbalance in chondrocytes resulting in cartilage degeneration. Scientific Reports 2015;5:11722.
17. Pathak NN, et al. Anti-inflammatory and chondroprotective effects of atorvastatin in a cartilage explant model of osteoarthritis. Inflammation Research 2015;64(3-4):161-169.
18. Bauerova K, Bezek S. Role of reactive oxygen and nitrogen species in etiopathogenesis of rheumatoid arthritis. General physiology and biophysics 2000;18:15-20.
19. Ródenas J, Mitjavila MT, Carbonell T. Simultaneous generation of nitric oxide and superoxide by inflammatory cells in rats. Free Radical Biology and Medicine 1995;18(5):869-875.
20. Внуков В. В. и др. Свободнорадикальное окисление в синовиальной жидкости и апоптоз хондроцитов при гонартрозе 2012;4:38.
21. Чеснокова Н. П., Понукалина Е. В., Бизенкова М. Н. Молекулярно-клеточные механизмы инактивации свободных радикалов в биологических системах. Успехи современного естествознания 2006;7:21-26.
22. Umar S, et al. Modulation of the oxidative stress and inflammatory cytokine response by thymoquinone in the collagen induced arthritis in Wistar rats. Chemico-biological interactions 2012;197(1):40-46.
23. Campo GM, et al. Efficacy of treatment with glycosaminoglycans on experimental collagen-induced arthritis in rats. Arthritis Res Ther 2003;5(3):1.
24. Маханова Р. С. К вопросу изучения перекисного окисления липидов. Известия Оренбургского государственного аграрного университета 2011;1(29):24-25.
25. Roy S, et al. Combination therapy of dexamethasone with epigallocatechin enhances tibiotarsal bone articulation and modulates oxidative status correlates with cartilage cytokines expression in the early phase of experimental arthritis. European journal of pharmacology 2013;698(1):444-454.
26. Jeyadevi R, et al. Enhancement of anti-arthritis effect of quercetin using thioglycolic acid-capped cadmium telluride quantum dots as nanocarrier in adjuvant induced arthritic Wistar rats. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2013;112:255-263.
27. Zhuang C, et al. Polysaccharide from Angelica sinensis protects chondrocytes from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis through its antioxidant effects in vitro. International journal of biological macromolecules 2016;87:322-328.

Надійшла до редакції 10.11.16

Е. Тихова асп., О. Берник канд. бiol. наук, А. Савчук, д-р бiol. наук,  
К. Дворщенко, д-р бiol. наук, Л. Остапченко, д-р бiol. наук  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

## ИНТЕНСИВНОСТЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ КРЫС С КОЛЛАГЕН-ИНДУЦИРОВАННЫМ АРТРИТОМ

*Исследованы продукты свободнорадикального окисления и ферменты антиоксидантной защиты у крыс с коллаген-индукционным артритом. Установлено, что в хрящевой ткани крыс в условиях экспериментальной модели артрита увеличивается содержание супероксид анион-радикала, пероксидов и ТБК-активных продуктов и возрастает активность антирадикальных ферментов супероксиддисмутазы и катализы.*

*Ключевые слова: воспаление суставов, хрящи, окислительный стресс, активные формы кислорода, антиоксидантные ферменты.*

E. Tihova, PhD stud., O. Bernuk, PhD., O. Savchuk, DSc.,  
K. Dvorshenko, DSc., L. Ostapchenko, DSc.  
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

## INTENSITY OF FREE RADICAL PROCESSES IN CARTILAGE IN RATS WITH COLLAGEN-INDUCED ARTHRITIS

*Products of free radical oxidation and antioxidant enzymes in rats with collagen-induced arthritis were studied. It was established, that under experimental model of arthritis in rat cartilage the content of superoxide anion radical, peroxide and TBA-active compounds and the activity of antiradical enzymes superoxide dismutase and catalase increased.*

*Key words: inflammation of the joints, cartilage, oxidative stress, reactive oxygen species, antioxidant enzymes.*

УДК 577.123:577.121.6:577.2.04.

М. Лилик, асп., О. Сорочинська, асп., О. Манюх, асп., М. Байляк, канд. біол. наук  
Державний Вищий Навчальний Заклад "Прикарпатський національний університет  
імені Василя Стефаника" Івано-Франківськ

## СТАТЕВІ ОСОБЛИВОСТІ АМІНОКИСЛОТНОГО ОБМІNU У *DROSOPHILA MELANOGASTER* ЗА СПОЖИВАННЯ АЛЬФА-КЕТОГЛУТАРАТУ

**Досліджено вплив альфа-кетоглутарату на амінокислотний обмін у плодової мушки. Харчовий АКГ не впливав на масу тіла, вміст сечовини, активність глутаматдегідрогенази, аланін- та аспартатамінотрансфераз у двоедених мух. Двоedенні самки, а не самці, вирощені на АКГ, мали вищий вміст загального білка та вільних амінокислот. Водночас, АКГ призводив до зростання вмісту загального білка в обох статей 24-денного віку. Утримування на середовищі з АКГ знижувало загальну плодючість мух.**

**Ключові слова:** альфа-кетоглутарат, *Drosophila melanogaster*, амінокислоти, загальний білок, плодючість.

**Вступ.** Альфа-кетоглутарова кислота (АКГ) є важливим інтермедиатором циклу трикарбонових кислот, а також бере участь у метаболізмі амінокислот. На даний час АКГ активно вивчається як харчова добавка, яка може мати багатосторонній позитивний вплив на організм [9; 31]. Зокрема показано, що додавання солей альфа-кетоглутарової кислоти до харчового раціону ссавців стимулює обмінні процеси та відновлення організму при ушкодженнях шлунково-кишкового тракту, травмах м'язів та кісток [7; 9; 10; 20]. Встановлено, що стимулювання синтезу білка при станах білкового дефіциту зумовлене тим, що АКГ активно використовується для біосинтезу амінокислот, зокрема проліну [26], глутамату, глутаміну, лейцину та аспартату [12; 18; 14]. У здорових людей з віком концентрація АКГ в плазмі крові суттєво знижується і при цьому уповільнюються процеси біосинтезу білка, тому було запропоновано розглядати АКГ як потенційно антивіковий фактор [9; 31]. На сьогодні наявні лише окремі дослідження з використання харчового АКГ для запобігання зниження функціональної активності та метаболічних процесів з віком. Так, виявлено, що харчовий АКГ здатен підтримувати редокс-гомеостаз у старих мишей [19]. На моделі нематоди *Caenorhabditis elegans* показана здатність екзогенного АКГ збільшувати тривалість життя шляхом індукції стану близького до дієтичного обмеження [5]. Популярним об'єктом у геронтологічних та дієтологічних дослідженнях останніх років стала плодова мушка *Drosophila melanogaster*. Зокрема на *D. melanogaster* активно вивчається вплив вуглеводної та білкової дієт на показники метаболізму і функціональне старіння організмів [21; 22]. У даній роботі з використанням *D. melanogaster* ми прагнули з'ясувати, чи існують статеві відмінності у впливі харчового АКГ на білковий обмін особин молодого та старшого віку. Оскільки вміст білка у плодової мушки тісно пов'язаний із плодючістю та тривалістю життя [25], нами також визначено яйценосність самок на контрольному та АКГ-вмісному середовищах.

**Метою даної роботи** було порівняти деякі показники амінокислотного та білкового обміну самців та самок *D. melanogaster* молодого та старшого віку та дослідити взаємозв'язок між плодючістю та вмістом білка у самок за вирощування на контрольному середовищі та середовищі з АКГ.

**Матеріали і методи.** У роботі використовували лабораторну діку лінію Canton S *D. melanogaster*, яка була надана Блюмінтонським Стоковим Центром університету Індіані (США). Батьківську культуру мух утримували на середовищі [14], яке містило (на 100 мл): 7,5 мл меляси; 5 г сухих пекарських дріжджів; 6,1 г кукурудзяної крупи; 1,2 г агару; 1 мл 18%-го розчину ніпагіну (для інгібування росту цвілевих грибів). Експериментальні культури мух вирощували на середовищі, яке містило 5% сухих пекарських дріжджів, 5% сахарози, 1% агару та 0,18% ніпагіну. Дане середовище приймали за конт-

рольне. У дослідні середовища додатково вносили 1 М розчин натрієвої солі альфа-кетоглутарової кислоти до кінцевої концентрації 10 мМ. Культивування проводили при 25 °C, постійній вологості (50-60%) та світловому режимі день:ніч – 16:8. За цих умов розвиток мух тривав 9-10 днів. Після досягнення двоеденного віку мух або переносили на свіжі середовища того самого складу для отримання 24-денних особин, або використовували для біохімічних та фізіологічних тестів. Заміну середовищ проводили кожного другого дня.

У тесті на плодючість, одна особина чоловічої і одна особина жіночої статі утримувались в маленьких пробірках (15 × 60 мм) з 0,7 мл контрольного або АКГ-вмісного середовища. На свіже середовище мушок пересаджували кожен другий день. Через 24 год після пересадки на свіже середовище підраховували кількість яєць, які відклала самка. Для контрольної та дослідної груп було протестована плодючість для 20 пар мух.

Для біохімічних експериментів мух розділяли за статю шляхом анестезування за допомогою вуглекислого газу. Маки однієї муhi визначали як середнє арифметичне десяти, зважених на торсійній вазі, особин. Вміст води визначали за різницю маси тіла плодової мушки до і після висушування у сушильній шафі при 60 °C.

Для отримання безклітинних екстрактів мух однієї статі зважували і гомогенізували у співвідношенні 1:10 (маса/об'єм) в охолодженні 50 мМ калій-fosfatному буфері (КФБ) (рН 7,0), який містив 0,5 мМ ЕДТА та 1 мМ фенілметилсульфонілфториду. Для визначення активності глутамінсінази гомогенізацію мух проводили в 50 мМ Tris-HCl буфері (рН 7,0). Гомогенати центрифугували протягом 15 хв при 13000 g на центрифузі Eppendorf 5415R при 4 °C. Одержані супернатанти використовували для визначення біохімічних показників. Визначення активностей аспартатамінотрансферази (АСТ) та аланінамінотрансферази (АЛТ) проводили з використанням відповідних діагностичних наборів фірми "Cormay" (Ломянкі, Польща) згідно з інструкціями виробника. Активність глутаматдегідрогенази (ГДГ) визначали за методом Догерті [8], реєструючи зміну оптичного поглинання НАДН при 340 нм. Реакційна суміш в об'ємі 1 мл містила 50 мМ КФБ (рН 7,0), 20 мМ АКГ, 50 мМ NH<sub>4</sub>Cl, 0,12 мМ НАДН та 10 мкл супернатанту. У бланки замість супернатанту вносили середовище гомогенізації. Для розрахунків використовували коефіцієнт молярної екстинції для НАДН – 6,22 мМ<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>. Активність глутамінсінази визначали непрямим колориметричним методом за кількістю утвореного фосфату при гідролізі АТФ у ході реакції синтезу глутаміну з глутамату та аміаку [28]. Реакційна суміш містила 50 мМ Tris-HCl (рН 7,0), 7,5 мМ АТФ, 100 мМ L-глутамату, 50 мМ NH<sub>4</sub>Cl, 50 мМ MgCl<sub>2</sub> та 20 мкл супернатанту у кінцевому об'ємі проби 0,2 мл. Okremо готували бланки, які не містили супернатанту. Реакцію починали додаванням супернатанту. Проби інкубували протягом 20 хв

при 25 °C. Зупиняли реакцію додаванням 1,3 мл 0,8% FeSO<sub>4</sub> (свіжоприготовлений розчин у 0,015 н H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). До проб додавали 0,3 мл 6,6% (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> у 7,5 н H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> для визначення вивільненого фосфату; при цьому утворювався комплекс блакитного кольору, оптичну густину якого визначали при 700 нм. Для розрахунків будували калібрувальну криву на основі K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (5 ммол/л). Вміст сечовини визначали з використанням діагностичного набору фірми "Cormay" (Ломянкі, Польща) згідно з інструкцією виробника. Для побудови калібрувальної кривої використовували стандартний розчин сечовини (7,13 ммол/л). Концентрацію білка визначали за методом Бредфорда [3], який ґрунтуються на здатності білків утворювати забарвлени сполуки з барвником Кумасі яскраво-голубим G-250. Як стандарт використовували бічачий сироватковий альбумін.

Для визначення вмісту вільних амінокислот супернатанти змішували з трихлороцтвою кислотою (кінцева концентрація 10%) для осадження білків та повторно центрифугували. В надосадовій рідині визначали пул амінокислот нінгідриновим методом за утворенням блакитного комплексу з максимумом поглинання при

570 нм [15]. Як стандарт використовували глутамінову кислоту (2 нмоль/л).

Дані представлено як середнє ± похибка середнього (M ± m). Статистичну обробку здійснювали за допомогою комп'ютерної програми "Муноча", використовуючи критерій Стьюдента.

**Результати та обговорення.** У роботі мух вирощували, починаючи зі стадії яйця, на дріжджово-сахарозному середовищі з оптимальним для мух співвідношенням компонентів (5%/5%). У дослідне середовище додавали 10 мМ альфа-кетоглутарат натрію. Раніше нами було показано, що дана концентрація АКГ не впливає на розвиток мух [24], збільшує вміст білка та активує антиоксидантний захист молодих мух [2].

Дводенні особини *D. melanogaster*, вирощені на контролльному та експериментальному середовищах, не відрізнялися за масою тіла (рис. 1A), при цьому маса самок була вищою, ніж у самців, що є характерно для цього виду комах [1]. Вміст води у тілі особин обох статей також не відрізнявся за вирощування на контролльному та дослідному середовищах (рис. 1B).

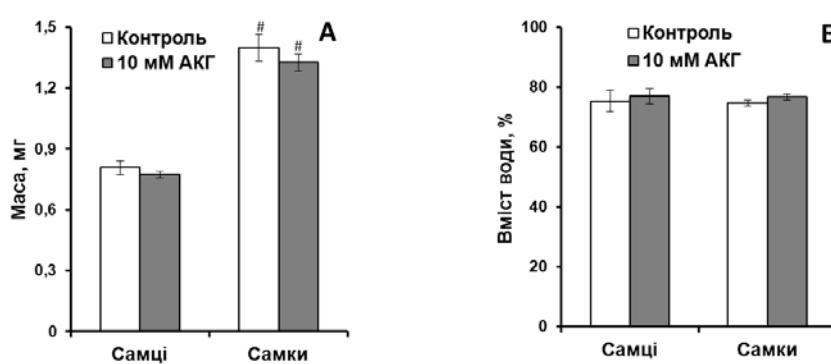


Рис. 1. Маса тіла (А) та вміст води (Б) у тілі дводенніх особин *D. melanogaster* Canton S, вирощених на контролльному середовищі та середовищі, яке містило 10 мМ АКГ

Примітки: <sup>#</sup>Достовірно відрізняється від відповідного значення у самців з P < 0,05, n = 15

Водночас, вміст водорозчинного білка та вільних амінокислот був відповідно у 1,2 і 1,5 рази вищим у тілі самок, вирощених на середовищі з 10 мМ АКГ, порівняно із контрольними особинами (рис. 2). У контрольних і дослідних самців відмінностей за цими показниками не виявлено. Таким чином, харчовий АКГ може бути по-різному задіяний у білковий метаболізм молодих самців та самок плодової мушки. Слід зазначити, що у контрольних самок вміст амінокислот був у 1,7 рази нижчим, ніж у контрольних самців. Зростання вмісту амінокислот

та білка у дослідних самок може свідчити про те, що АКГ використовується для їхнього синтезу, як це було показано раніше [12; 14]. Проте не виключено, що АКГ може знижувати швидкість розпаду амінокислот та білків, таким чином підвищуючи загальний вміст білка у тілі. Щоб перевірити це припущення, ми визначили вміст сечовини у тілі мух, які розвивалися на контролльному та дослідному середовищах. Сечовина є одним з продуктів продукту розпаду білків та амінокислот у плодової мушки та інших тварин.

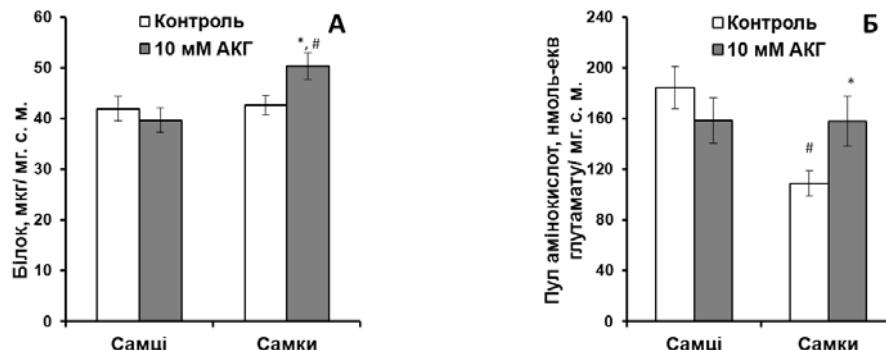


Рис. 2. Вміст водорозчинного білка (А) та вміст вільних амінокислот (Б) у тілі дводенніх особин *D. melanogaster* Canton S, вирощених на контролльному середовищі та середовищі, яке містило 10 мМ АКГ

Примітки: <sup>\*</sup>Достовірно відрізняється від відповідного контролального значення та <sup>#</sup> від відповідного значення у самців з P < 0,05, n = 5-8

Як бачимо з табл. 1, вміст сечовини суттєво не відрізняється у контрольних та дослідних особин. Таким чином, харчовий АКГ не впливав на швидкість катаболізму білків/амінокислот у плодової мушки.

Відомо, що у метabolізмі амінокислот АКГ бере участь як субстрат ферментів обміну амінокислот, зок-

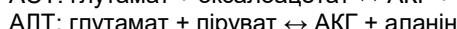
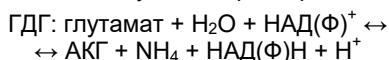
рема глутаматдегідрогенази та амінотрансфераз [9; 12]. Тому нами визначено активність глутаматдегідрогенази (ГДГ), аспартатамінотрансферази (АСТ), аланінамінотрансферази (АЛТ) та глутамінсигнати (ГС) у самців та самок *D. melanogaster*, вирощених на АКГ (Табл. 1).

**Таблиця 2. Вміст сечовини та активність ферментів білкового обміну (мОд/мг білка) у двох видів особин *D. melanogaster Canton S*, вирощених на контролльному та АКГ-вмісному середовищах**

Показник	Самці		Самки		Кількість повторів
	Контроль	10 мМ АКГ	Контроль	10 мМ АКГ	
Вміст сечовини, нмоль/мг с.м.	1,59±0,25	1,04±0,22	1,06±0,08	1,31±0,25	5
ГДГ, мО/мг білка	8,31±1,0	8,40±2,82	9,19±1,92	10,2±0,9	5
АСТ, мО/мг білка	75,2±5,7	67,6±4,39	67,4±4,17	61,6±4,4	5
АЛТ, мО/мг білка	124±13	123±8	118±3	100±10	4
ГС, мО/мг білка	328±13	283±11	264±20#	269±8	7

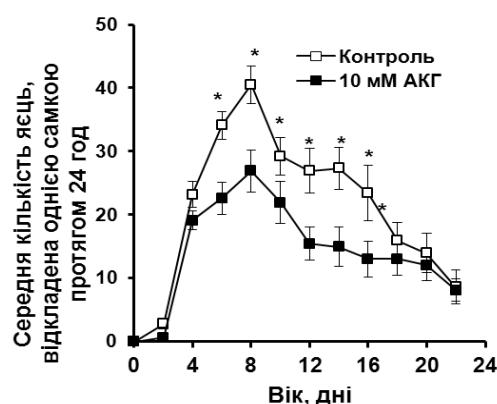
Примітка. \*Достовірно відрізняється від відповідного контролального значення та # від відповідного значення у самців з  $P<0,05$ ,  $n=4-7$ .

Як бачимо, активність ГДГ, АСТ та АЛТ була подібною у дослідних та контрольних особин обох статей. Дані ферменти каталізують оборотні реакції:



Можемо припустити, що у нашому випадку у самок плодової мушки, за додавання АКГ, реакції можуть бути зсунутими у сторону синтезу відповідних амінокислот. ГДГ може забезпечувати синтез глутамату, який, у свою чергу, може використовуватися трансаміназами для синтезу аспартату та аланіну. При цьому слід зауважити, що амінувальна та дезамінувальна активності ГДГ визначаються ще і використанням різних відновлювачів – НАДН і НАДФН відповідно [27]. Активність ГС, яка здійснює АТФ-залежний синтез глутаміну з глутамату, була на 14% нижчою у дослідних самців, порівняно з контролальними самцями. У дослідних самок активність ГС не відрізнялась від значень у контрольних самок. Отримані результати можуть свідчити про те, що зростання вмісту амінокислот у самок, очевидно, не пов'язано із зростанням синтезу глутаміну. Раніше нами було показано, що вирощування на АКГ збільшує синтез проліну у самок плодової мушки [2]. Тому можемо

припустити, що вищий вміст амінокислот у дослідних самок може бути пов'язаний з посиленням синтезу проліну, а також глутамату, аланіну, аспартату та лейцину, як це було показано раніше в інших тварин [14]. Цікавим фактом є зниження активності ГС у дослідних самців; водночас у самців відмічається тенденція до зниження вмісту вільних АК у тілі. Ймовірно, що харчовий АКГ у самців не активно задіяний в синтезі амінокислот у самців, а включається в інші процеси. Зокрема, це може бути цикл Кребса для отримання енергії. Енергія самцям потребна для активного руху, зокрема для зваблювання самок [13]. Водночас основна біологічна роль самок – це продукування здорового потомства. Ми можемо припустити, що інтенсифікація білкового синтезу у самок за споживання АКГ може сприяти забезпеченням необхідними ресурсами для продукування та відкладення достатньої кількості яєць. Для перевірки даного припущення нами була визначена плодючість самок на контролльному середовищі та середовищі з альфакетоглутаратом. Як бачимо з рис. 3, самки, вирощені і утримувані на АКГ-вмісному середовищі, мали нижчу плодючість починаючи з 6 до 16 доби, ніж контролльні самки. Okрім того, загальна кількість відкладених яєць була на 28% нижчою у самок на середовищі з 10 мМ АКГ, порівняно з контролальними самками.



**Рис. 3. Плодючість самок *D. melanogaster Canton S* за утримування на контролльному середовищі та середовищі, яке містило 10 мМ АКГ,  $n = 20$**

Примітка \*Достовірно відрізняється від відповідного контролального значення

Таким чином, на противагу очікуванням, харчовий АКГ призводив до зниження плодючості мух. Щоб з'ясувати, чи мала вплив АКГ-вмісна дієта на білковий обмін

мух у старшого віку, нами було визначено вміст загального білка у 24-денних самців та самок, утримуваних на середовищі з та без АКГ. З рис. 4 видно, що самці та

самки, утримувані на середовищі з 10 мМ АКГ, мали на 38% і 46% вищий вміст білка, ніж відповідні контрольні особини. Варто зазначити, що вміст білка у 24-денних самців та самок у контрольній групі був на 34% та 13% нижчим, ніж у відповідних молодих особин (рис. 1 та рис. 4). Проте між старшими та молодими особинами, утримуваними на середовищі з АКГ, суттєвих відмінностей у вмісті білка не було виявлено. Таким чином, АКГ запобігає зниженню вмісті білка у особин старшого віку. Водночас, вищий вміст білка у дослідних 24-денних самок, ніж у контрольних, може бути також частково зумовлений їх зниженою плодючістю: самки відкладають менше яєць і відповідно менше білкових ресурсів витрачається. З іншого боку, у дрозофіли, як і у багатьох інших

тварин, плодючість, зазвичай, обернено корелює з тривалістю життя, а саме знижена плодючість часто супроводжується збільшеною тривалістю життя та є характерною ознакою довгоживучих особин [6; 17]. Разом з тим, зниження білкового синтезу з віком є відмінною ознакою старіючих організмів у багатьох видів, в тому числі людини [23]. Таким чином, ми вважаємо, що зниження плодючості та збільшення вмісту загального білка у 24-денних особин плодової мушки слід розглядати як антивікові ефекти харчового АКГ. З іншого боку, наші результати свідчать, що *Drosophila melanogaster* може слугувати дешевим та надійним об'єктом для більш поглиблого вивчення антивікових механізмів АКГ.

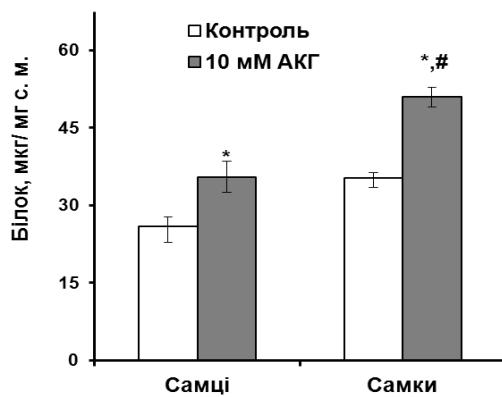


Рис. 4. Вміст водорозчинного білка у тілі 24-денних особин *D. melanogaster* Canton S, утримуваних на контролльному середовищі та середовищі, яке містило 10 мМ АКГ

Примітки \*Достовірно відрізняється від відповідного контролюного значення та # від відповідного значення у самців з  $P < 0,05$ ,  $n = 4-7$

**Висновки:** Таким чином, додавання АКГ до харчово-го раціону плодової мушки *D. melanogaster* посилює синтез білків та амінокислот у старших особин обох статей та у молодих самок, але не у молодих самців. При цьому, активності важливих ферментів обміну амінокислот, а саме ГДГ, АЛТ, АСТ та ГС, залишаються незмінними у молодих мух. Утримування на АКГ-вмісному середовищі призводило до зниження загальної плодючості мух. Отримані результати свідчать про потенційні антивікові ефекти АКГ та наявність деяких відмінностей у шляхах утилізації екзогенного АКГ у самців та самок різного віку. Також результати свідчать про важливість використання обох статей модельних організмів у вивчені біологічних ефектів харчових добавок.

**Подяка.** Автори висловлюють подяку Блюмінстонському Стоковому Центру за надану культуру мух та професору В.І. Лущаку за фінансову підтримку роботи, яка виконана у рамках держбюджетної теми "Вивчення молекулярних механізмів адаптації живих організмів до несприятливих чинників і розробка способів підвищення адаптаційного потенціалу" (№ держреєстрації 0115U002304).

#### Список використаних джерел

- Arias A. *Drosophila melanogaster* and the development of biology in the 20th century / A. Arias // Methods Mol. Biol. – 2008. – Vol. 420. – P. 1-25.
- Bayliak M.M. Dietary alpha-ketoglutarate increases cold tolerance in *Drosophila melanogaster* and enhances protein pool and antioxidant defense in sex-specific manner / M.P. Lyllyk, H.V. Shmihel, O.M. Sorochynska [et al.] // J. Therm Biol. – 2016. – Vol. 60. – P. 1-11.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding / M. Bradford //Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 248-254.
- Burrin D. Metabolic fates of dietary glutamate in the intestine / D. Burrin, B. Stoll // Am. J. Clin. Nutr. – 2009. – Vol. 9. – P. 850-856.
- Chin R.M. The metabolite α-ketoglutarate extends lifespan by inhibiting ATP synthase and TOR / R.M. Chin, X. Fu, M.Y. Pai [et al.] // Nature. – 2014. – Vol. 510, N 7505. – P. 397-401.
- Djawdan M. Metabolic aspects of the trade-off between fecundity and longevity in *Drosophila melanogaster* / M. Djawdan, T.T. Sugiyama, L.K. Schlaeger [et al.] // Physiological Zoology. – 1996. – Vol. 69, N 4. – P. 1176-1195.
- Dobrowolski P. The effect of dietary administration of 2-oxoglutaric acid on the cartilage and bone of growing rats / P. Dobrowolski, E. Tomaszewska, M. Bienko [et al.] // Br. J. Nutr. – 2013. – Vol. 110, N 4. – P. 651-658.
- Doherty D. L-Glutamate dehydrogenases (yeast) / D. Doherty // Methods in Enzymol.. – 1970. – Vol. 17. – P. 850-856.
- Harrison A.P. Biological effects of 2-oxoglutarate with particular emphasis on the regulation of protein, mineral and lipid absorption/metabolism, muscle performance, kidney function, bone formation and cancerogenesis, all viewed from a healthy ageing perspective state of the art-review article / A.P. Harrison, S.G. Pierzynowski // J. Physiol. Pharmacol. – 2008. – Vol. 59, N 1. P. 91-106.
- Hou Y. Effects of α-ketoglutarate on energy status in the intestinal mucosa of weaned piglets chronically challenged with lipopolysaccharide / Y. Hou, K. Yao, L. Wang [et al.] // Br. J. Nutr. – 2011. – Vol. 106, N 3. – P. 357-363.
- Hudson R.C. L-Glutamate dehydrogenases: distribution, properties and mechanism / R.C. Hudson, R.M. Daniel // Comp. Biochem. Physiol. – 1993. – Vol. 106. – P. 767-792.
- Yao K. Alpha-ketoglutarate inhibits glutamine degradation and enhances protein synthesis in intestinal porcine epithelial cells / K. Yao, Y. Yin, X. Li [et al.] // Amino Acids. – 2012. – Vol. 42, N 6. – P. 2491-2500.
- Kowalski P. Courtship song in *Drosophila melanogaster*: a differential effect on male-female locomotor activity / P. Kowalski, S. Aubin, T. Martin Can // J. Zool. – 2004. – Vol. 82. – P. 1258-1266.
- Lambert B.D. First-pass metabolism limits the intestinal absorption of enteral alpha-ketoglutarate in young pigs / B.D. Lambert, R. Filip, B. Stoll [et al.] // J. Nutr. – 2006. – Vol. 136. – P. 2779-2784.
- Lee Y. An improved colorimetric determination of amino acids with the use of ninhydrin / Y. Lee, T. Takahashi // Analytical Biochemistry. – 1966. – Vol. 14, Issue 1. – P. 71-77.
- Lozinsky O. Sodium nitroprusside toxicity in *Drosophila melanogaster*: delayed pupation, reduced adult emergence, and induced oxidative/nitrosative stress in eclosed flies / O. Lozinsky, O. Lushchak, J. Storey [et al.] // Arch. Insect Biochem. Physiol.. – 2012. – Vol. 80. – P. 166-185.

17. Lushchak O.V. Balance between macronutrients affects life span and functional senescence in fruit fly *Drosophila melanogaster* / O.V. Lushchak, D.V. Gospodaryov, B.M. Rovenko [et al.] // J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. – 2012. – Vol. 67, N 2. – P. 118–125.
18. Mühlung J. Effects of alpha-ketoglutarate on neutrophil intracellular amino and alpha-keto acid profiles and ROS production / J. Mühlung, F. Tussing, K.A. Nickolaus [et al.] // Amino Acids. – 2010. – Vol. 38. – P. 167–177.
19. Niemiec, T. Alpha-ketoglutarate stabilizes redox homeostasis and improves arterial elasticity in aged mice / T. Niemiec, J. Sikorska, A. Harrison, [et al.] // J. Physiol. Pharmacol. – 2011. – Vol. 62, N 1. – P. 37–43.
20. Radzki R.P. Anti-osteopenic effect of alpha-ketoglutarate sodium salt in ovariectomized rats / R.P. Radzki, M. Bienko, S.G. Pierzynowski // J. Bone Miner. Metab. – 2012. – Vol. 30, N 6. – P.651-659.
21. Reis T. Effects of synthetic diets enriched in specific nutrients on *Drosophila* development, body fat, and lifespan / T. Reis // PLoS One. – 2016. – Vol 11, N 1. e0146758. doi: 10.1371/journal.pone.0146758.
22. Rovenko B.M. High sucrose consumption promotes obesity whereas its low consumption induces oxidative stress in *Drosophila melanogaster* / B.M. Rovenko, O.I. Kubrak, D.V. Gospodaryov [et al.] // J. Insect. Physiol. – 2015. – Vol. 79. – P. 42–54.
23. Salminen A., Kauppinen, A., Kaarniranta, K., 2015. 2-Oxoglutarate-dependent dioxygenases are sensors of energy metabolism, oxygen availability, and iron homeostasis: potential role in the regulation of aging process / A. Salminen, A. Kauppinen, K. Kaarniranta // Cell. Mol. Life Sci. – Vol. 72, N 20. – P. 3897–3914.
24. Shmihel H. Effect of alpha-ketoglutarate on pupation, feeding intensity and levels of some metabolites in larvae of *Drosophila melanogaster* / H.V. Shmihel, M.P. Lylyk, M.M. Bayliak // Visnyk of the Lviv university, Series biology. – 2014. – Vol. 66. – P. 91–99.
25. Skorupa D.A. Dietary composition specifies consumption, obesity, and lifespan in *Drosophila melanogaster* / D.A. Skorupa, A. Dervisevic, J. Zwierer [et al.] // Aging Cell. – 2008. – Vol.7, N 4. – P.478-490. doi: 10.1111/j.1474-9726.2008.00400.x.
26. Son E. Alpha-ketoglutarate stimulates procollagen production in cultured human dermal fibroblasts, and decreases UVB-induced wrinkle formation following topical application on the dorsal skin of hairless mice / E. Son, G. Choi, H. Kim [et al.] // Biol. Pham. Bull. – 2007. Vol. 30, N 8. – P. 1395-1399.
27. Tiwari A.K. Evaluation of sub-cellular distribution of glutamate dehydrogenase (GDH) in *Drosophila melanogaster* larvae / A.K. Tiwari, P. Panda, J.S. Purohit // Acta Histochem. – 2014. – Vol. 116, N 2. P.297-303.
28. Woolfolk C.A. Regulation of glutamine synthetase. I. Purification and properties of glutamine synthetase from *Escherichia coli* / C.A. Woolfolk, B. Shapiro, E.R. Stadtman // Arch. Biochem. Biophys. – 1966. – Vol. 116. – P. 177–192.
29. Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition / G. Wu // Amino Acids. – 2009. – Vol. 37. – P. 1–17.
30. Wu N. Alpha-Ketoglutarate: physiological functions and applications / N. Wu, M. Yang, U. Gaur [et al.] // Biomol. Ther. – 2016. – Vol. 24, N 1. – P.1-8.
31. Zdzisinska B. Alpha-Ketoglutarate as a molecule with pleiotropic activity: well-known and novel possibilities of therapeutic use / B. Zdzisinska, A. Zurek, M. Kandefer-Szerszen // Arch. Immunol. Ther. Exp. – 2016. (in press) DOI 10.1007/s00005-016-0406-x.
- References**
- Arias A. *Drosophila melanogaster* and the development of biology in the 20th century / A. Arias // Methods Mol. Biol. – 2008. – Vol. 420. – P. 1–25.
  - Bayliak M.M. Dietary alpha-ketoglutarate increases cold tolerance in *Drosophila melanogaster* and enhances protein pool and antioxidant defense in sex-specific manner / M.P. Lylyk, H.V. Shmihel, O.M. Sorochynska [et al.] // J. Therm. Biol. – 2016. – Vol. 60. – P. 1-11.
  - Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding / M. Bradford //Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 248-254.
  - Burrin D. Metabolic fates of dietary glutamate in the intestine / D. Burrin, B. Stoll // Am. J. Clin. Nutr. – 2009. – Vol. 9. – P. 850–856.
  - Chin R.M. The metabolite  $\alpha$ -ketoglutarate extends lifespan by inhibiting ATP synthase and TOR / R.M. Chin, X. Fu, M.Y. Pai [et al.] // Nature. – 2014. – Vol. 510, N 7505. – P. 397-401.
  - Djawdaw M. Metabolic aspects of the trade-off between fecundity and longevity in *Drosophila melanogaster* / M. Djawdaw, T.T. Sugiyama, L.K. Schlaeger [et al.] // Physiological Zoology. – 1996. – Vol. 69, N 5. – P. 1176–1195.
  - Dobrowolski P. The effect of dietary administration of 2-oxoglutaric acid on the cartilage and bone of growing rats / P. Dobrowolski, E. Tomaszevska, M. Bienko [et al.] // Br. J. Nutr. – 2013. – Vol.110, N 4. – P.651-658.
  - Doherty D. L-Glutamate dehydrogenases (yeast) / D. Doherty // Methods in Enzymol. – 1970. – Vol. 17. – P. 850-856.
  - Harrison A.P. Biological effects of 2-oxoglutarate with particular emphasis on the regulation of protein, mineral and lipid absorption/metabolism, muscle performance, kidney function, bone formation and cancerogenesis, all viewed from a healthy ageing perspective state of the art-review article / A.P. Harrison, S.G. Pierzynowski // J. Physiol. Pharmacol. – 2008. – Vol. 59, N 1. P. 91-106.
  - Hou Y. Effects of  $\alpha$ -ketoglutarate on energy status in the intestinal mucosa of weaned piglets chronically challenged with lipopolysaccharide / Y. Hou, K. Yao, L. Wang [et al.] // Br. J. Nutr. – 2011. – Vol. 106, N 3. – P. 357-363.
  - Hudson R.C. L-Glutamate dehydrogenases: distribution, properties and mechanism / R.C. Hudson, R.M. Daniel // Comp. Biochem. Physiol. – 1993. – Vol. 106. – P. 767–792.
  - Yao K. Alpha-ketoglutarate inhibits glutamine degradation and enhances protein synthesis in intestinal porcine epithelial cells / K. Yao, Y. Yin, X. Li [et al.] // Amino Acids. – 2012. – Vol. 42, N 6. – P.2491-2500.
  - Kowalski P. Courtship song in *Drosophila melanogaster*: a differential effect on male–female locomotor activity / P. Kowalski, S. Aubin, T. Martin Can // J. Zool. – 2004. – Vol. 82. – P. 1258-1266.
  - Lambert B.D. First-pass metabolism limits the intestinal absorption of enteral alpha-ketoglutarate in young pigs / B.D. Lambert, R. Filip, B. Stoll [et al.] // – J. Nutr. – 2006. – Vol.136. – P. 2779–2784.
  - Lee Y. An improved colorimetric determination of amino acids with the use of ninhydrin / Y. Lee, T. Takahashi // Analytical Biochemistry. – 1966. – Vol. 14, Issue 1. – P. 71-77.
  - Lozinsky O. Sodium nitroprusside toxicity in *Drosophila melanogaster*: delayed pupation, reduced adult emergence, and induced oxidative / nitrosative stress in enclosed flies / O. Lozinsky, O. Lushchak, J. Storey [et al.] // Arch. Insect Biochem. Physiol.. – 2012. – Vol. 80. – P.166-185.
  - Lushchak O.V. Balance between macronutrients affects life span and functional senescence in fruit fly *Drosophila melanogaster* / O.V. Lushchak, D.V. Gospodaryov, B.M. Rovenko [et al.] // J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. – 2012. – Vol. 67, N 2. – P. 118–125.
  - Mühlung J. Effects of alpha-ketoglutarate on neutrophil intracellular amino and alpha-keto acid profiles and ROS production / J. Mühlung, F. Tussing, K.A. Nickolaus [et al.] // Amino Acids. – 2010. – Vol. 38. – P. 167-177.
  - Niemiec, T. Alpha-ketoglutarate stabilizes redox homeostasis and improves arterial elasticity in aged mice / T. Niemiec, J. Sikorska, A. Harrison, [et al.] // J. Physiol. Pharmacol. – 2011. – Vol. 62, N 1. – P. 37–43.
  - Radzki R.P. Anti-osteopenic effect of alpha-ketoglutarate sodium salt in ovariectomized rats / R.P. Radzki, M. Bienko, S.G. Pierzynowski // J. Bone Miner. Metab. – 2012. – Vol. 30, N 6. – P.651-659.
  - Reis T. Effects of synthetic diets enriched in specific nutrients on *Drosophila* development, body fat, and lifespan / T. Reis // PLoS One. – 2016 – Vol 11, N 1. e0146758. doi: 10.1371/journal.pone.0146758.
  - Rovenko B.M. High sucrose consumption promotes obesity whereas its low consumption induces oxidative stress in *Drosophila melanogaster* / B.M. Rovenko, O.I. Kubrak, D.V. Gospodaryov [et al.] // J. Insect. Physiol. – 2015. – Vol. 79. – P. 42–54.
  - Salminen A., Kauppinen, A., Kaarniranta, K., 2015. 2-Oxoglutarate-dependent dioxygenases are sensors of energy metabolism, oxygen availability, and iron homeostasis: potential role in the regulation of aging process / A. Salminen, A. Kauppinen, K. Kaarniranta // Cell. Mol. Life Sci. – Vol. 72, N 20. – P. 3897–3914.
  - Shmihel H. Effect of alpha-ketoglutarate on pupation, feeding intensity and levels of some metabolites in larvae of *Drosophila melanogaster* / H.V. Shmihel, M.P. Lylyk, M.M. Bayliak // Visnyk of the Lviv university, Series biology. – 2014. – Vol. 66. – P. 91–99.
  - Skorupa D.A. Dietary composition specifies consumption, obesity, and lifespan in *Drosophila melanogaster* / D.A. Skorupa, A. Dervisevic, J. Zwierer [et al.] // Aging Cell. – 2008. – Vol.7, N 4. – P.478-490. doi: 10.1111/j.1474-9726.2008.00400.x.
  - Son E. Alpha-ketoglutarate stimulates procollagen production in cultured human dermal fibroblasts, and decreases UVB-induced wrinkle formation following topical application on the dorsal skin of hairless mice / E. Son, G. Choi, H. Kim [et al.] // Biol. Pham. Bull. – 2007. Vol. 30, N 8. – P. 1395-1399.
  - Tiwari A.K. Evaluation of sub-cellular distribution of glutamate dehydrogenase (GDH) in *Drosophila melanogaster* larvae / A.K. Tiwari, P. Panda, J.S. Purohit // Acta Histochem. – 2014. – Vol. 116, N 2. P.297-303.
  - Woolfolk C.A. Regulation of glutamine synthetase. I. Purification and properties of glutamine synthetase from *Escherichia coli* / C.A. Woolfolk, B. Shapiro, E.R. Stadtman // Arch. Biochem. Biophys. – 1966. – Vol. 116. – P. 177–192.
  - Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition / G. Wu // Amino Acids. – 2009. – Vol. 37. – P. 1–17.
  - Wu N. Alpha-Ketoglutarate: physiological functions and applications / N. Wu, M. Yang, U. Gaur [et al.] // Biomol. Ther. – 2016. – Vol. 24, N 1. – P.1-8.
  - Zdzisinska B. Alpha-Ketoglutarate as a molecule with pleiotropic activity: well-known and novel possibilities of therapeutic use / B. Zdzisinska, A. Zurek, M. Kandefer-Szerszen // Arch. Immunol. Ther. Exp. – 2016. (in press) DOI 10.1007/s00005-016-0406-x.

Надійшла до редколегії 12.09.16

М. Лилик, асп., О. Сорочинская, асп., О. Манюх, асп., М. Байляк, канд. біол. наук

Государственное Высшее Учебное Заведение

"Прикарпатский национальный университет имени Васыля Стефаныка", Ивано-Франковск, Украина

## ПОЛОВЫЕ ОСОБЕННОСТИ АМИНОКИСЛОТНОГО ОБМЕНА В *DROSOPHILA MELANOGASTER* ЗА УПОТРЕБЛЕНИЯ АЛЬФА-КЕТОГЛУТАРАТА

Исследовано влияние альфа-кетоглутаратата (АКГ) на аминокислотный обмен у плодовой мушки. Пищевой АКГ не влиял на массу тела, содержание мочевины, активность глутаматдегидрогеназы, аланин- и аспартатаминотрансфераз в двухдневных мухах. Двухдневные самки, а не самцы, выращенные на 10 mM АКГ, имели высшее содержание общего белка и свободных аминокислот, а подопытные самцы – низкую активность глутаминсингтазы по сравнению с контрольными особями. В то же время, АКГ приводил к увеличению содержания общего белка в обоих полах 24-дневного возраста. Содержание на среде с АКГ снижало общую плодовитость мух.

Ключевые слова: альфа-кетоглутарат, *Drosophila melanogaster*, аминокислоты, общий белок, плодовитость.

M. Lylyk, PhD stud., O. Sorochynska, PhD stud., O. Maniukh, PhD stud., M. Bayliak, PhD.

Department of Biochemistry and Biotechnology, Vasyl Stefanyk Precarpathian National University, Ivano-Frankivsk, Ukraine

## GENDER DIFFERENCES OF AMINO ACID METABOLISM IN *DROSOPHILA MELANOGASTER* ON ALPHA-KETOGLUTARATE-SUPPLEMENTED FOOD

The influence of alpha-ketoglutarate (AKG) on amino acid metabolism in the fruit fly was investigated. Dietary AKG did not affect body mass, urea content, activity of glutamate dehydrogenase, alanin- and aspartataminotransferase in two-day-old flies. Two-day-old females, but not males, grown on 10 mM AKG, had higher levels of total protein and free amino acids. However, AKG led to an increase in total protein in 24-day-old flies of both sexes. Maintenance on AKG-containing medium reduced overall fecundity of flies.

Keywords: alpha-ketoglutarate, *Drosophila melanogaster*, amino acids, total protein, fecundity.

УДК 581.711.712:581.132:504.055

Н. Нужина, канд. біол. наук, О. Ткачук, канд. біол. наук, А. Фукаляк, біолог II категорії  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

## ДИНАМІКА ПІГМЕНТНОГО КОМПЛЕКСУ ТРЬОХ ВІДІВ ШИПШИНИ ЗА УМОВ ГІПЕРТЕРМІЇ

Наведено дані про зміну вмісту фотосинтезуючих пігментів у листках рослин *Rosa donetzica*, *Rosa spinosissima*, *Rosa reversa* після короткотривалого впливу високої температури (+40°C). Встановлено, що рослини виду *Rosa donetzica* є найменш жаростійкими з досліджених видів.

Ключові слова: *Rosa*, фотосинтезуючі пігменти, гіпертермія.

**Вступ.** Дикорослі представники роду *Rosa* L. здавна були і залишаються дотепер цінними господарськими рослинами. Їх біохімічні властивості стали основою застосування шипшин у фармакології, біологічні особливості і декоративні якості використовують у садово-парковому будівництві. Успішність культивування шипшин залежить від багатьох факторів середовища. Одним з важливих факторів, що впливає на ріст і розвиток рослинного організму, як відомо, є температурний режим. Різкі коливання температури особливо негативно впливають на метаболізм рослин. За літературними даними, пігментний комплекс є дуже чутливим до змін температури середовища [3, 8, 10]. Зокрема встановлено, що адаптація фотосинтезуючої системи до температурного стресу полягає, у першу чергу, у зміні співвідношення хлорофілів a/b (chl a/chl b) і хлорофілів a+b/каротиноїди (chl a+chl b/car) [1, 3]. Зустрічаються дані про відмінний вплив гіпертермії на флавоноїди залежно від їхнього типу та місцезнаходження в рослині [13].

Метою нашої роботи було детальне вивчення динаміки пігментного комплексу відібраних для досліду видів роду *Rosa* при вирощуванні в умовах оптимальних температур та після короткотривалої дії високотемпературного стресу.

**Об'єкт та методи досліджень.** Об'єктами дослідження слугували види роду *Rosa* з колекції Ботанічного саду ім. акад. О. В. Фоміна: *Rosa donetzica* Dubovik, *Rosa spinosissima* L., *Rosa reversa* Waldst. et Kit. Для досліду відбирали види з різних природних ареалів, а отже з відмінною пристосованістю до високих температур.

У експерименті використовували листя трьохрічних рослин, отриманих вегетативно від шипшин, котрі зростають у колекційних експозиціях Ботанічного саду. До сплідження проводили в першій декаді червня, у період коли денна температура повітря становила +23...+25°C, на рослинах, які раніше не піддавалися дії гіпертермії.

Дослідні рослини, у горшках з землею, прогрівали у повітряному термостаті за температуру +40°C протягом трьох годин [5]. Температуру в термостаті контролювали термометром, розміщеним на рівні рослин. Передня стінка термостата була скляною і рослини перебували в умовах природного освітлення. Ми не використовували додаткового до природного освітлення при термообробці, оскільки відомі факти, про посилення інгібуючої дії високих температур при яскравому освітленні на фотосинтезуючу систему [2]. Контрольні рослини протягом трьох годин перебували в виключеному термостаті, для створення ідентичних умов освітлення,

Контрольна група рослин витримувалась при температурі +25°C. Всі досліди проводили в чотирикратній повторюваності. Вміст пігментів визначали за допомогою спектрофотометра СФ-2000. Пігменти екстрагували з рослинного матеріалу 80 % ацетоном і визначали спектрофотометричним методом при  $\lambda=663$ , 646, 470 нм [12]. Вміст пігментів обчислювали з розрахунку на масу сирої речовини.

Сумарний вміст флавоноїдів в перерахуванні на рутин і абсолютно суху масу у відсотках визначали за методикою [9] при  $\lambda=410$  нм.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою програми Statistica 8, достовірність результатів визначали за t-критерієм Стьюдента.

**Результати та їх обговорення.** Короткотривала дія високої температури на *R. donetzica* спричинила зменшення кількості хлорофілів a і b, ймовірно за рахунок їх руйнування. Особливо нестійкий до температурного стресу виявився хлорофіл b (рис. 1). Збільшення внаслідок стресу кількості каротиноїдів, а також зменшення показника (chl a + chl b)/car вказують на формування адаптивної реакції за участю цих пігментів. Різке збільшення співвідношення chl a / chl b після прогрівання

пояснюються, в першу чергу, сильною руйнацією хлорофілу *b*. Пригнічення фотосинтетичної активності (в першу чергу за рахунок хлорофілів) внаслідок стресу відмічають і інші дослідники, зокрема при гіпертермі та гіпотермії [7, 8, 10]. Серед наслідків впливу високої температури

відмічають деструктивні зміни у фотосинтетичному апараті, котрі зумовлюють зменшення фотохімічної ефективності фотосистеми II як чутливого компонента фотосинтезу [11].

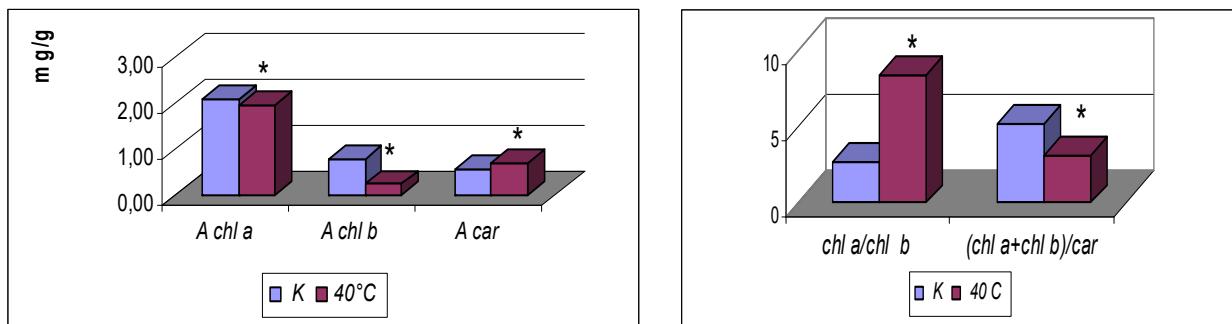


Рис. 1. Гістограма зміни пігментного складу та співвідношення пігментів у рослинах *R. donetzica* після впливу високих температур, де \*-P<0,05 відносно контрольної групи

Дані рис.2 свідчать, що достовірних відмінностей вмісту хлорофілів та каротиноїдів після стресу порівняно з контрольною групою у рослин виду *R. spinosissima* не виявлено. Тобто, значного пошкодження світлозбираючих пігментів при різкому прогріванні до +40°C не відбувається, спостерігається лише

тенденція до зменшення кількості пігментів. Однак, поряд з тенденцією до зменшення кількості хлорофілів *a* і *b*, та каротиноїдів спостерігається достовірне збільшення показника *(chl a + chl b)/car*, тобто гіпертермія має сильніший негативний вплив на каротиноїди, ніж на хлорофіли даного виду.

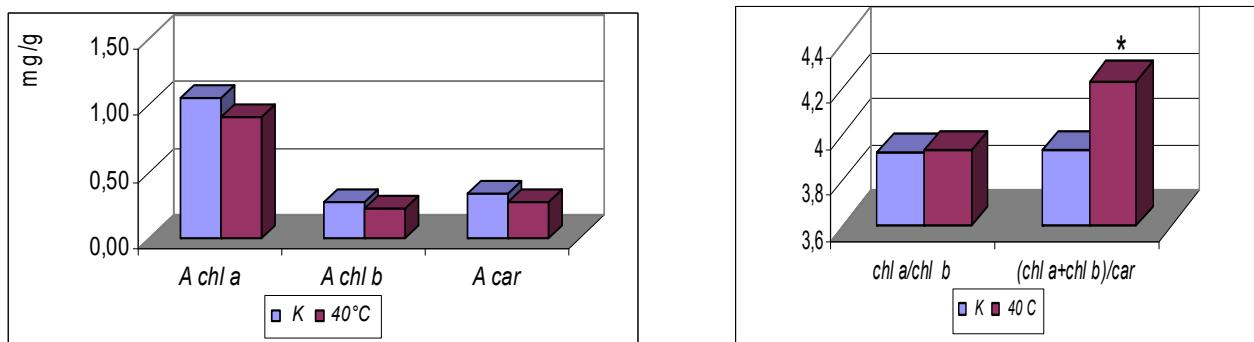


Рис. 2. Гістограма зміни пігментного складу та співвідношення пігментів у рослинах *R. spinosissima* після впливу високих температур, де \*-P<0,05 відносно контрольної групи

Кількість хлорофілів та каротиноїдів після прогрівання порівняно з контрольною групою у *R. reversa* не відрізнялась достовірно (рис. 3). Однак, поряд з характерною і закономірною тенденцією до зменшення кількості хлоро-

філу *b*, спостерігається тенденція до збільшення кількості хлорофілу *a*. Таким чином, зростання внаслідок стресу показника співвідношення *chl a / chl b* викликане різноспрямованою зміною кількості обох типів хлорофілів.

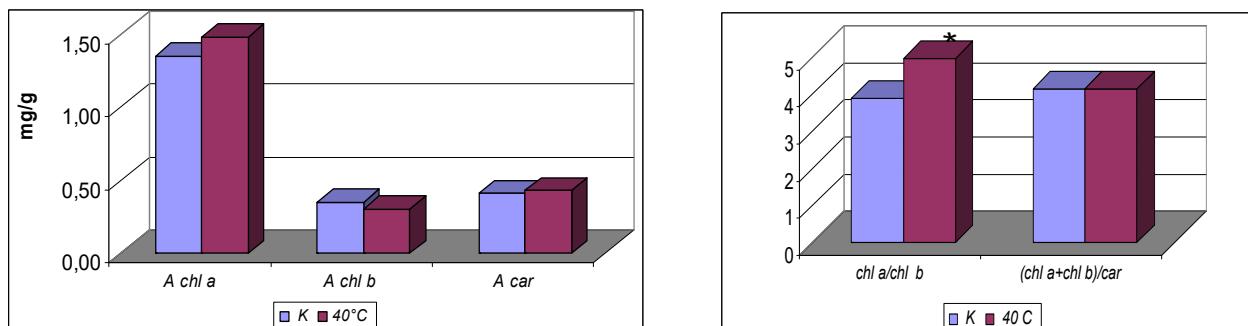


Рис. 3. Гістограма зміни пігментного складу та співвідношення пігментів у рослинах *R. reversa* після впливу високих температур, де \*-P<0,05 відносно контрольної групи

У нормі концентрація хлорофілу *a* і *b* та каротиноїдів між трьома видами дещо відрізняється. Відомо, що

вміст хлорофілів у листку відображає пристосованість рослини до певної інтенсивності освітлення [4]. Віднос-

но менші показники вмісту хлорофілів у *R. spinosissima* вказують на те, що вона є більш світлолюбною серед досліджених видів. Тоді як, найвищі показники вмісту хлорофілів у *R. donetzica*, свідчать про найбільшу тіневитривалість серед досліджених шипшин. Результати наших досліджень підтверджують дані інших дослідників: термостабільність фотосинтезуючого апарату більша за меншого вмісту світлозбираючих пігментів [6]. Так, вміст пігментів у *R. donetzica* вдвічі більший ніж у інших двох видів, при цьому фотосинтезуюча система

даніх рослин виявилась найбільш нестійкою до температурного стресу. Як свідчать дані на рис. 2 і рис. 3, достовірних змін кількісних параметрів пігментної системи не виявлено в *R. spinosissima* та *R. reversa*. Також після стресу стабільним залишилось співвідношення *chl a / chl b* у та *R. spinosissima* та (*chl a + chl b*) / *car* у *R. reversa*. Дані співвідношення є критеріями фотосинтетичної активності і використовуються маркерами стійкості в стресових умовах [2, 8].

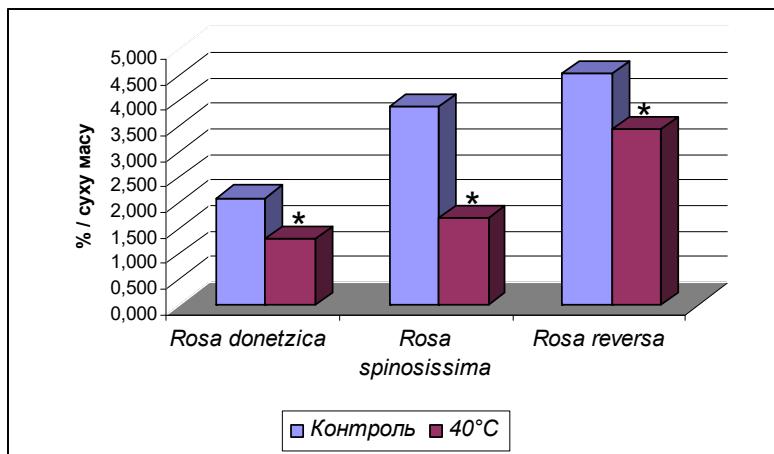


Рис. 4. Гістограма зміни вмісту флавоноїдів видів роду *Rosa* після впливу високих температур  
де \*-P<0,05 відносно контрольної групи

Відомо, що флавоноїди беруть участь в фотосинтезі, утворенні лігніну і суберину, за рахунок поглинання ультрафіолетового проміння вони захищають тканини від надмірної радіації, є антиоксидантами [14]. За нашими даними, найбільше флавоноїдів в нормі накопичується у *R. reversa* (рис. 4), що забезпечує цим рослинам певний антиоксидантний захист особливо на перших етапах температурного стресу. Найменша кількість флавоноїдів в нормі відмічена у рослин *R. donetzica*, що свідчить про меншу роль даних пігментів в антиоксидантній відповіді на стрес, порівняно з іншими видами. При прогріванні до +40°C, спостерігається лише зниження кількості флавоноїдів в усіх досліджуваних видів, можливо за рахунок руйнування.

**Висновки.** Встановлено, що рослини *R. spinosissima* є більш світлолюбними серед досліджених видів, тоді як *R. donetzica* є найбільш тіневитривалими. При гіпертермії у рослин усіх досліджених видів спостерігається зниження кількості флавоноїдів. Короткотривала дія високих температур (+40°C) негативно вплинула на фотосинтезуючу систему *R. donetzica* і майже не мала пошкоджуючого впливу на *R. reversa* та *R. spinosissima*. Отже, рослини виду *R. donetzica* є менш жаростійкими. Отримані дані слід враховувати задля успішного культивування шипшин даних видів.

#### Список використаних джерел

- Андріanova Ю.Е. Хлорофілл и продуктивность растений / Ю.Е.Андріanova, И.А. Тарчевский М., 2000.
- Бубло Л.С. Защитное и повреждающее действие видимого света на фотосинтетический аппарат пшеницы при гипертермии / Л.С. Бубло; О.Д. Быков; И.Е. Каменцева; И.М. Кислюк // Физиология растений. – 2008. – № 5. – С. 681-689.
- Иванов Л. А. Изменение содержания хлорофиллов и каротиноидов в листьях степных растений вдоль широтного градиента на Южном Урале / Л. А. Иванов, Л. А. Иванова, Д. А. Ронжина и др.// Физиология растений. – 2013. – Т. 60, № 6. – С. 856–864.
- Лебедева Т.С. Пигменты растительного мира / Т.С. Лебедева, К.М. Сытник – К., 1986.

5. Мусієнко М.М. Протекторна роль цитокініну за дії теплового стресу на рослини пшениці / М.М. Мусієнко, В.В. Жук, Л.М. Бацманова // Ukr. Bot. J. – 2014. – № 71(2). – С. 244–249.

6. Пшибытко Н.Л. Влияние гипертермии на структурно-функциональное состояние фотосинтетических мембран ячменя с модифицированным пигментным аппаратом / Н.Л. Пшибытко, Н.Б. Жаворонкова, Л.Ф. Кабашникова // Биологические мембранны. – 2005. – Т. 22, № 6. – С. 444–449.

7. Середнєва Я.В. Влияние условий хронической и острой гипертермии и низкоинтенсивного переменного магнитного поля на функциональное состояние фотосинтетического аппарата растений *Pisum sativum* L. / Я.В. Середнєва, А.С. Патуніна, Ю.В. Синиціна, А.П. Веселов // Вестник Нижегородского университета имени Н.И. Лобачевского. – 2014. – №1(2). – С. 224–228.

8. Станецька Д. М. Вплив високотемпературного стресу на пігментний комплекс видів роду *Solidago* L. в репродуктивний період / Д. М. Станецька, І. В. Коваль, Н. І. Джуренко та ін. // Науковий вісник Ужгородського університету. Серія Біологія. – 2011. – Вип. 30. – С. 192–196.

9. Тринеєва О. В. Разработка и валидация методики количественного определения флавоноидов в листьях крапивы двудомной / О. В. Тринеєва, А. И. Сливкин, С. С. Воропаєва // Вестник ВГУ, серия: Химия. Биология. Фармация. – 2014. – №1. – С.138-144.

10. Babenko L. M. Effect of temperature stresses on pigment content, lipoxygenase activity and cell ultrastructure of winter wheat seedlings / L. M. Babenko, I. V. Kosakivska, Yu. A. Akimov, D. O. Klymchuk, T. D. Skaternya // Genetics and Plant Physiology – 2014 – Vol. 4, №(1-2). – P. 117–125.

11. Barnabas B. Effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals/ B. Barnabas, K. Jager, A. Feher // Plant Cell Environ. – 2008. – V. 31. – P. 11–38.

12. Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids, pigments of photosynthetic biomembranes / H.K. Lichtenthaler // Methods in enzymology. – 1987. –V. 148. – P. 350–382.

13. Raghuwanshi A. Effect of temperature on flavonoid production in pigenpea [Cajanus cajan (L.) Millsp] in relation to nodulation / A. Raghuwanshi, S. Dudeja, A. Khurana // Biology and Fertility of Soils. – 1994. – V. 17, № 4. – P. 314–316.

14. Wang G. Role of Temperature and Soil Moisture Conditions on Flavonoid Production and Biosynthesis-Related Genes in Ginkgo (Ginkgo biloba L.) Leaves / G. Wang, F. Cao, G. Wang and Y. A. El-Kassaby // Open Natural Products Chemistry & Research. –01. 2015 – DOI: 10.4172/2329-6836.1000162.

#### Reference

- Andrianova YuE, Tarchevskiy IA. Hlorofill i produktivnost rasteniy. Moscow, 2000. Russian
- Babenko LM, Kosakivska IV, Akimov YuA, Klymchuk DO, Skaternya TD. Effect of temperature stresses on pigment content,

lipoxigenase activity and cell ultrastructure of winter wheat seedlings. *Genetics and Plant Physiology.* 2014; 4(1–2): 117–125.

3. Barnabas B, Jager K, Feher A. Effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant Cell Environ.* 2008; 31: 11–38.

4. Bubolo LS; Bylikov OD; Kamentseva IE; Kislyuk IM. Zaschitnoe i povrezhdayuschee deystvie vidimogo sveta na fotosinteticheskiy apparat pshenitsyi pri gipertermii. *Fiziologiya rasteniy.* 2008; 5: 681–9. Russian

5. Ivanov LA, Ivanova LA, Ronzhina DA. i dr. Izmenenie soderzhaniya hlorofilov i karotinoidov v listyah stepnyih rasteniy vdl shirotnogo gradiента na Yuzhnom Urale. *Fiziologiya rasteniy.* 2013; 60 (6): 856–864. Russian

6. Lebedeva TS, Sytnik KM. Pigmenty rastitelnogo mira Kiev, 1986. Russian

7. Lichtenthaler HK. Chlorophylls and carotenoids, pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in enzymology.* 1987; 148: 350–382.

8. Musiyenko MM, Zhuk VV, Batsmanova LM. Protektorna rol tsytokinina za diyi teplovoho stresu na roslyny pshenitsyi. *Ukr. Bot. J.* 2014; 71(2): 244–9. Ukrainian.

9. Pshibytko NL, Zhavoronkova NB, Kabashnikova LF. Vliyanie gipertermii na strukturno-funktionalnoe sostoyanie fotosinteticheskikh membran yachmenya s modifitsirovannym pigmentnymi apparatom. *Biologicheskie membrany.* 2005; 22 (6): 444–9. Russian

10. Raghuwanshi A, Dudeja S, Khurana A. Effect of temperature on flavonoid production in pigeonpea [Cajanus cajan (L) Millsp] in relation to nodulation. *Biology and Fertility of Soils.* 1994; 17(4): 314–6.

11. Seredneva YaV, Patunina AS, Sinitsyna YuV, Veselov AP. Vliyanie usloviy hroniceskoy i ostrogo gipertermii i nizkointensivnogo peremennennogo magnitnogo polya na funktsionalnoe sostoyanie fotosinteticheskogo apparata rasteniy Pisum sativum L. *Vestnik Nizhegorodskogo universiteta imeni N.I. Lobachevskogo.* 2014; 1(2): 224–8. Russian

12. Stanets'ka DM, Koval' IV, Dzhurenko NI ta in. Vplyv vysokotemperaturnoho stresu na pihmentnyy kompleks vydov rodu Solidago L. v reproduktivnyy period. *Naukovyy visnyk Uzhhorods'koho universitetu. Seriya Biologiya.* 2011; 3: 192–6. Ukrainian.

13. Trineeva OV, Slivkin AI, Voropaeva SS. Razrabotka i validatsiya metodiki kolichestvennogo opredeleniya flavonoidov v listyah krapivy dvudomnoy. *Vestnik VGU, seriya: Himiya. Biologiya. Farmatsiya.* 2014; 1: 138–144. Russian

14. Wang G, Cao F, Wang G, El-Kassaby YA. Role of Temperature and Soil Moisture Conditions on Flavonoid Production and Biosynthesis-Related Genes in Ginkgo (Ginkgo biloba L.) Leaves. *Open Natural Products Chemistry & Research.* 2015 – DOI: 10.4172/2329-6836.1000162.

Надійшла до редколегії 12.09.16

Н. Нужина, канд. биол. наук, О. Ткачук, канд. биол. наук, А. Фукаляк, биолог II категорії  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

## ДИНАМІКА ПІГМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА ТРЕХ ВІДОВ ШІПОВНИКА ПРИ УСЛОВІЙ ГІПЕРТЕРМІЇ

Приведені дані про зміну вмісту фотосинтезуючих пігментів в листях растінь *Rosa donetzica*, *Rosa spinosissima*, *Rosa reversa* після кратковременного воздействія високої температури (+ 40° С). Установлено, що растіння виду *Rosa donetzica* наименее жаростойкіє из исследованных видов.

**Ключові слова:** *Rosa*, фотосинтезуючі пігменти, гіпертермія

N. Nuzhyna, PhD, O. Tkachuk, PhD., A. Fukalyak, biologist II category  
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

## DYNAMICS OF PIGMENT COMPLEX THREE SPECIES OF WILD ROSE UNDER HYPERTERMIA

The data about changing of the content of photosynthetic pigments in leaves of plants *Rosa donetzica*, *Rosa spinosissima*, *Rosa reversa* after short-term exposure to high temperature (+40°C) are presented. It was established that the plants of species *Rosa donetzica* are the least resistant of the studied species.

**Key words:** *Rosa*, photosynthetic pigments, hyperthermia

УДК 577.112.85:57.083.3:591.16:631.528.6:633.34

М. Храбко, асп.,  
Р. Федорук, д-р вет. наук, проф.  
Інститут біології тварин НААН, Львів

## РІСТ І РОЗВИТОК ОРГАНІЗМУ САМЦІВ ЩУРІВ F1 ТА ЙОГО ІМУНОФІЗІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ У ПЕРІОД ВИПОЮВАННЯ РІЗНИХ ДОЗ НАНОТЕХНОЛОГІЧНОГО І ХІМІЧНО СИНТЕЗОВАНОГО ЦИТРАТУ ГЕРМАНІЮ

Метою досліджені було вивчити вплив різних доз цитрату Ge на ріст і розвиток самців F1, активність імунної системи організму, стан гемостазу. Дослідження виконані методами груп і періодів на самцях щурів F1, яким випоюювали цитрат Ge від молочного періоду до 120 діб, в дозах 10 (I), 20 (II), 200 (III) мкг Ge/кг м. т., що отриманий нанотехнологічним методом і 2000 мкг Ge/кг м. т. – хімічно синтезованого. За результатами дослідження встановлено більше виражений вплив цитрату Ge на ріст і розвиток організму самців в дозі 20 мкг Ge/кг м. т. Біологічна дія цитрату Ge стимулювала імунофізіологічну активність організму з підвищенням вмісту загальних Ig, молекул середньої маси, слалювих кислот, кількості лейкоцитів за рахунок лімфоцитів і гранулоцитів на тлі зменшення рівня циркулюючих імунних комплексів і гексоз, зв'язаних з білками. Відзначено позитивний дозо-залежний вплив цитрату Ge на ріст і розвиток організму щурів і його гематологічні та імунофізіологічні показники.

**Ключові слова:** імунофізіологія, щур, кров, тканини, германію цитрат.

**Вступ.** Розвиток організму залежить від імунофізіологічної активності організму, що визначається рівнем імунних глобулінів, глікопротеїнів, загальних цитокінів, позаклітинних ДНК, молекулярних факторів тканинного стресу [1, 2]. Ці речовини запускають імунофізіологічні механізми адаптивно-гомеостатичних реакцій, активацію яких зумовлюють низка речовин, зокрема й сполуки Германію (Ge), що володіють біологічною активністю [2-4].

В організмі людини і тварин Ge стимулює низку функцій, пов'язаних з онтогенетичним розвитком, у тому числі органів імунної системи, травлення, відтворення [5-7], коригує рух елементів у нервових клітинах і знижує поріг бульової чутливості [4, 8, 9], попереджує роз-

виток гіпоксії, виконуючи активну роль у перенесенні кисню до тканин [4, 9]. Однак, мінеральні сполуки Ge, зокрема оксиди, можуть проявляти у певних дозах токсичний вплив в організмі, порушуючи функцію нирок, що проаналізовано у низці оглядів, присвячених біологічній ролі Ge [4, 5, 9]. Тому ведуться дослідження з пошуку нових, зокрема органічних сполук Ge, токсичність яких значно нижча, або відсутня [8, 10]. Доведено, що органічні сполуки Ge, стимулюють продукування γ-інтерферону та основних факторів резистентності з підвищеннем активності багатьох фізіологічних систем [9-11], у тому числі репродуктивну функцію самиць тварин [6, 12]. Відзначено стимулюючий вплив цитрату германію, отриманого методом нанотехнології, на ан-

тиоксидантну здатність та імунобіологічну реактивність організму самиць щурів [7, 9], його репродуктивну і детоксикаційну функцію [6, 12]. Встановлені дозозалежні відмінності впливу цитрату Ge, отриманого методом нанотехнології та хімічного синтезу на ріст і розвиток організму самиць щурів у період до запліднення, вагітності та лактації [6, 12, 13]. Метою цих досліджень було вивчення впливу різних доз цитрату Ge, отриманого методами нанотехнології та хімічного синтезу, на активність імунної системи, стан гемостазу, ріст і розвиток самців щурів у період фізіологічного дозрівання.

**Матеріали і методи.** Дослідження проведено у віварії Інституту біології тварин НААН на білих лабораторних щурах-самцях, масою тіла 90–120 г у віці 2–4,5 місяці, поділених на п'ять груп за принципом аналогів, по 10-15 тварин у кожній. Самці щурів F<sub>1</sub> були отримані від самиць F<sub>0</sub>, яким у дослідних групах випоювали цитрат германію 30-40 діб до запліднення, впродовж вагітності та лактації за такою ж схемою, що зберіглась і для приплоду: I група – контрольна, отримувала збалансований стандартний раціон (СР) зі згодовуванням гранульованого комбікорму впродовж усього періоду досліджень і споживанням води без обмеження. Тваринам II – V дослідних груп згодовували СР і випоювали Ge цитрат, в кількостях: II – наногерманій цитрат (HGeЦ), виготовлений нанотехнологічним методом [14], з розрахунку 10 мкг Ge/кг маси тіла; III група – 20 мкг Ge/кг м. т. з HGeЦ; IV група – 200 мкг Ge/кг м. т. з HGeЦ; V група – 2000 мкг Ge/кг м. т. з германію цитрату хімічно синтезованого (GeЦХС). Водний розчин наногерманію цитрату у концентрації 1,2 г/дм<sup>3</sup>, pH 1,30 був отриманий від ТОВ "Наноматеріали та нанотехнології", м. Київ. Хімічно синтезований цитрат германію, з концентрацією 1,452 г Ge/0,1 дм<sup>3</sup>, pH 0,31, був виготовлений співробітниками кафедри загальної хімії та поліме-

рів, завідувач – доктор хімічних наук, професор Сейфулліна І. І. Одеського національного університету імені І. І. Мечникова у рамках співпраці за договором між Інститутом біології тварин НААН та вказаною кафедрою університету. На 120-135 добу життя по 5-9 самців F<sub>1</sub> з кожної групи умертвляли шляхом декапітації після наркозу і знерухомлення парами хлороформу з дотриманням біоетичних норм [17, 18] і відбирали зразки крові для дослідження за методами, що описані у довіднику [16]. У крові визначали кількість еритроцитів, лейкоцитів, тромбоцитів на гематологічному аналізаторі (Mythic 18), а також вміст імуноглобулінів (Ig) нефелометричним методом, молекул середньої маси (MCM) (Ніколайчик В. В., Моїн В. М., 1991), циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) (Гріневич Ю. А., Алферов А. Н., 1981), гексоз, зв'язаних з білками (ГЗБ) з орциновим реактивом (Асатіан В. С., 1957), сіалових кислот (СК) за Свеннерхольмом (Анасаншвілі А. Ц., 1968) і церулоплазміну (Ravin, 1961).

Отриманий цифровий матеріал опрацьовано методом варіаційної статистики з використанням критерію Стьюдента. Розраховували середні арифметичні величини (M) та похиби середніх арифметичних величин ( $\pm m$ ). Зміни вважали вірогідними за  $P \leq 0,05$ . Для розрахунків використано комп'ютерну програму Excel.

**Результати та обговорення.** Встановлено виражений стимулюючий вплив застосованих доз цитратів Ge на показники постнатального розвитку організму, що зумовлювало міжгрупові відмінності росту й розвитку самців дослідних і контрольної груп. Зокрема, показники маси тіла та внутрішніх органів, що характеризують інтенсивність росту і розвитку самців дослідних груп, переважали їх величини у тварин контрольної групи. Динаміка маси тіла самців II – IV дослідних груп у вікові періоди 70-110 діб булавищою порівняно з контролем на 1,3-10,3 % (табл. 1).

**Таблиця 1. Динаміка маси тіла самців щурів F<sub>1</sub> за випоювання цитратів германію різної концентрації, г (M±m, n=5)**

Група	Вікові періоди постнатального росту і розвитку, діб					
	70	80	90	100	110	120
I – контроль %	106,8±5,15	117,2±5,79	132,0±5,77	148,4±5,91	164,8±5,81	179,2±5,41
	100	100	100	100	100	100
II %	108,2±5,37	119,6±5,37	135,6±5,68	153,4±5,95	171,2±6,11	188,8±6,12
	101,3	102,0	102,7	103,4	103,9	105,4
III %	114,6±5,64	126,6±5,30	143,4±5,31	162,0±5,64	181,8±5,32	201,0±4,92*
	107,3	108,0	108,6	109,2	110,3	112,2
IV %	108,6±4,99	119,2±4,86	136,4±4,93	153,8±5,58	172,4±5,52	188,2±5,56
	101,7	101,7	103,3	103,6	104,6	105,0
V %	104,8±5,15	114,6±4,82	127,2±4,91	140,4±4,64	152,0±5,03	163,2±5,29
	98,1	97,8	96,4	94,6	92,2	91,1

Примітка: у цій та наступних таблицях різниця статистично вірогідна порівняно з першою (контрольною) групою \* –  $p \leq 0,05$ ; \*\* –  $p \leq 0,01$ , \*\*\* –  $p \leq 0,001$ .

Найвищі позитивні міжгрупові різниці порівняно з контролем відзначено у тварин III групи (7,3-10,3 %), у той час як у II і IV групах ці відмінності становили 1-5 %, а для V групи маса тіла самців була меншою на – 2-9 %. Характерно, що вищий рівень міжгрупових різниць порівняно з контрольною групою встановлено у віковому періоді 100-110 діб (4-10 %). У перші декади після відлучення маса тіла самців II і IV дослідних груп становила 101,3 і 101,7 % і зросла до 109,2 на 100 добу, що підтверджують отримані дані з вищою стимулюючою

дією дози в 20 мкг Ge/кг м. т. на імунобіологічний статус цих тварин.

Маса внутрішніх органів самців дослідних груп вірогідно не відрізнялася від їх величини у тварин контрольної групи (табл. 2), що підтверджує відсутність токсичного чи інгібуючого впливу цитрату Ge на їх розвиток. Однак, відзначено не вірогідне зниження показників маси печінки, нирок, селезінки і легені у щурів дослідних груп, що більше виражено у тварин III, а для легень – V груп.

**Таблиця 2.** Показники маси внутрішніх органів і їх коефіцієнти маси самців щурів F<sub>1</sub> за випоювання цитратів германію різної концентрації (M±m, n=9)

Орган	Група				
	I – контроль	II	III	IV	V
	Маса органу (г) / коефіцієнт маси (г/кг)				
Серце	0,6 ± 0,06 3,5±0,19	0,6±0,03 3,5±0,20	0,6±0,03 3,8±0,15	0,6±0,03 3,6±0,13	0,6±0,02 3,4±0,08
Легені	1,4± 0,27 8,1±0,99	1,3± 0,07 7,5±0,51	1,2± 0,03 7,8±0,57	1,5± 0,10 8,5±0,63	1,07± 0,04 6,6±0,25
Селезінка	0,4± 0,04 2,1±0,14	0,3± 0,01 1,6±0,04**	0,3± 0,03 1,7±0,11	0,4± 0,01 2,0±0,19	0,3± 0,02 1,9±0,08
Нирки	1,4± 0,12 7,8±0,17	1,3± 0,03 7,4±0,16	1,2± 0,05 8,0±0,14	1,3± 0,08 7,4±0,27	1,3± 0,08 7,9±0,25
Печінка	5,8± 0,51 35,8±0,87	4,9± 0,22 28,3±0,98***	4,6± 0,36 30,7±0,85**	5,5± 0,37 31,2±0,61**	5,3± 0,23 32,7±0,26**

Виявлене тенденція може зумовлюватися більшим анаболічним впливом Ge в дозі 20 мкг, що стимулювало інтенсивніший приріст маси тіла ніж розвиток внутрішніх органів у самців III групи. Проте відсутність вірогідних різниць показників маси внутрішніх органів порівняно з контрольною групою вказує на доцільність експериментальної перевірки цієї тенденції. У той час як вірогідно нижчі коефіцієнти маси печінки у тварин усіх дослідних груп, а селезінки – в II групі, підтверджують припущення про більше виражений анаболічний вплив Ge на приріст м'язової маси і менше – паренхіматозних органів. Також слід зауважити на тенденції до зменшення маси печінки, нирок, селезінки і легень у самців щурів II і III груп, у той час як для V групи маса легень збільшувалась. Характерно, що коефіцієнти маси печінки були вірогідно нижчими у всіх дослідних групах, а селезінки – тільки у II групі щодо контролю.

Дослідження клітин білої та червоної крові щурів вказує на вірогідно виражену клітинну реакцію організму та імунної системи на тривале випоювання цитрату Ge. Зокрема, у крові тварин усіх дослідних груп вірогід-

но збільшувалась кількість лейкоцитів, у тому числі лімфоцитів і гранулоцитів (табл. 3). Збільшення кількості лімфоцитів і гранулоцитів, а не вірогідно й інших клітин у крові самців щурів усіх дослідних груп, вказує на високу інтенсивність їх утворення та виходу з селезінки і менше – кісткового мозку за дії цитрату Ge. Відомо, що активність гранулоцитів, як і деяких інших лімфоїдних елементів, у периферичній крові та селезінці гризунів найвища, а кістковому мозку – найнижча [1, 2]. Очевидно, вихід лімфоцитів і гранулоцитів у периферичну кров більш чутливий до стимулюючої дії цитрату Ge у застосованих дозах, ніж інших форм лейкоцитів. Число моноцитів було вірогідно вищим порівняно з контролем лише у крові тварин II групи, але зберігалася виражена тенденція до вищого рівня їх у інших дослідних групах. Це може вказувати на менше виражений стимулюючий вплив застосованих вищих доз цитрату Ge на надходження цих клітин у периферичну кров.

**Таблиця 3.** Гематологічні та імунофізіологічні показники організму самців щурів за випоювання цитратів германію різної концентрації (M±m, n=5)

Показник	Група				
	I – контроль	II	III	IV	V
Еритроцити, 10 <sup>12</sup> /л	6,4±0,45	7,2±0,37	7,8±0,47	7,7±0,40	7,0±0,40
Гемоглобін, г/л	145,0±3,62	147,2±3,61	156,2±2,96*	146,8±2,15	142,8±3,51
Гематокрит, л/л	0,36±0,029	0,38±0,015	0,44±0,022	0,41±0,021	0,38±0,011
Лейкоцити, 10 <sup>9</sup> /л	7,8±0,57	10,5±0,58*	9,7±0,39*	10,1±0,51*	10,1±0,47*
Лімфоцити, 10 <sup>9</sup> /л	4,5±0,27	6,3±0,47**	5,7±0,46	5,8±0,36*	6,3±0,39**
Моноцити, 10 <sup>9</sup> /л	0,9±0,13	1,4±0,10*	1,2±0,20	1,5± 0,22	1,1 ± 0,23
Гранулоцити, 10 <sup>9</sup> /л	2,5±0,09	2,7±0,07*	2,9±0,11*	2,8±0,08*	2,7±0,11
Тромбоцити, 10 <sup>9</sup> /л	323,3±14,48	338,4±14,04	396,3±14,93**	342,7±16,44	330,3±11,02

Аналіз гематологічних показників вказує на відсутність вірогідних різниць у кількості еритроцитів, гемоглобіну (крім III групи) і величини гематокриту у тварин дослідних і контрольної груп. Однак, для кількості еритроцитів і величини гематокриту спостерігається виражена тенденція до підвищення цих показників у тварин всіх дослідних груп порівняно до контролю. Найвищий рівень цих показників встановлено в крові щурів III групи, що підтверджується й вірогідно вищим вмістом гемоглобіну у цих тварин. Очевидно, 20 мкг Ge/kg м. т. для самців щурів у період статевого дозрівання діє ефективніше, ніж нижча (10 мкг) і вища (200 і 2000 мкг) дози на біосинтез цього білка еритроцитів і надходження їх у периферичну кров. Характерним є також вірогідне підвищення кількості тромбоцитів у крові щурів III

групи зі збереженням тенденції до вищого рівня у тварин інших дослідних груп.

Отримані результати досліджень гематологічних показників вказують на відсутність токсичного впливу всіх застосованих доз цитрату Ge з вираженою стимулюючою дією дози в 20 мкг Ge на рівень гемоглобіну і тромбоцитів у периферичній крові самців щурів у період завершення фізіологічного дозрівання.

Аналіз отриманих результатів вказує на виражений стимулюючий вплив застосованих доз цитрату Ge, отриманого методами нанотехнології та хімічного синтезу, на імунну систему організму щурів. Це підтверджується вірогідно вищим вмістом загальної кількості імуноглобулінів, MCM, сіалових кислот (крім IV групи) у крові самців щурів дослідних груп (табл. 4).

**Таблиця 4. Вміст імунних комплексів, глікопротеїнів та їх вуглеводних компонентів у крові самців щурів за випоювання цитратів германію різної концентрації (М±т, n=5)**

Показник	Група				
	I – контроль	II	III	IV	V
Заг. к-ть Ig, г/л	5,4±0,26	6,1±0,37	8,9±0,33***	7,0±0,77	10,1±0,44***
MCM, у.о.	0,21±0,018	0,26±0,010	0,27±0,006*	0,26±0,006*	0,28±0,004**
ЦІК, ммол/л	73,2±3,12	42,7±2,51***	42,5±2,01***	78,8±4,26	32,3±2,06***
Гексози, зв'язані з білками, г/л	3,5±0,12	2,8±0,16**	2,9±0,17*	4,3±0,38	4,2±0,34
Сіалові кислоти, у. о.	132,2±4,81	162,2±4,10**	166,8±4,72***	142,8±3,26	154,6±6,73*
Церулоплазмін, у. о.	374,2±13,67	358,4±24,46	386,2±14,39	390,8±22,69	404,8±18,15

Характерно, що більше виражені відмінності вмісту цих речовин у крові тварин були у III (20 мкг Ge) і V (2 мг Ge) групах порівняно з контрольною групою. У той час як у IV групі рівень імуноглобулінів був не вірогідно вищим від контролю на 29 %, а для сіалових кислот виявляв тенденцію до зниження стосовно контролю. Встановлені відмінності стимулюючого впливу застосованих доз HGeЦ на імунофізіологічну активність організму самців щурів можуть вказувати на певні біологічні особливості дії низьких і високих доз цієї сполуки на синтез глікопротеїнів, зокрема сіалових кислот в організмі.

Таке припущення підтверджують міжгрупові відмінності й інших досліджених показників – ЦІК і гексоз, зв'язаних з білками. Зокрема, вміст ЦІК у крові самців II, III і V груп був вірогідно нижчим, проте у тварин IV групи їх рівень виявляв тенденцію до підвищення. Вміст гексоз, зв'язаних з білками також знижувався у крові самців II ( $P \leq 0,05$ ) і III ( $P \leq 0,01$ ) груп, але в IV і V групах рівень їх був не вірогідно вищим, як і церулоплазміну в III, IV і V групах. Встановлені відмінності вмісту глікопротеїнів та їх компонентів у крові самців дослідних груп вказують на не однакову дію різних доз цитрату Ge на обмін глікопротеїнів. Це можна пов'язувати з імунологічними властивостями їх вуглеводних компонентів. Відомо, що глікопротеїни крові можуть виявляти ранні імунобіологічні реакції організму, а сполуки Ge здатні їх посилювати за дії стресових, у тому числі аліментарних чинників [4, 7, 12]. Встановлено, що введення мишам 1-ізопроксигерматрану посилює біосинтетичні процеси в організмі зі збільшенням вмісту глікопротеїнів у тканинах [4, 10]. У той час як вірогідне зниження вмісту гексоз, зв'язаних з білками у крові самців II і III груп виявляє позитивний зв'язок зі зниженням рівня ЦІК у цих тварин, що може вказувати на функціональну спорідненість цих компонентів за дії не високих доз Ge.

#### Висновки

1. Уведення цитрату Ge до питної води самців щурів F<sub>1</sub> зумовлює його стимулюючий вплив на ріст тварин, які отримували 10-200 мкг Ge/кг м. т., виготовленого методом нанотехнології, проте у дозі 2 мг/кг м. т. Ge, отриманого з його цитрату хімічно синтезованого, встановлено зниження інтенсивності росту тварин на 2-9 % у віці 70-120 діб. Відзначено вірогідно нижчі коефіцієнти мас печінки у самців II – V, а селезінки – II групи.

2. Стимулюючий вплив "нанотехнологічного" Ge на інтенсивність росту самців щурів більше виражений за дії 20 мкг з досягненням найвищих (109–112 %) різниць порівняно до контролю у період завершення фізіологічного дозрівання (100–120 доби життя).

3. Застосовані дози цитрату Ge зумовлюють менше виражений вплив на гематологічний профіль організму щурів з вірогідним збільшенням вмісту гемоглобіну (III група) і не вірогідним – кількості еритроцитів у тварин усіх дослідних груп, проте виявляють стимулюючу дію на імунофізіологічну активність організму з вищим рівнем лейкоцитів ( $P \leq 0,05$ ) за рахунок лімфоцитів і грану-

лоцитів, а також імунних глобулінів ( $P \leq 0,001$ ), молекул середньої маси, сіалових кислот у крові щурів дослідних груп; у той час як нижчі дози Ge (10 і 20 мкг) сприяють зниженню рівня гексоз, зв'язаних з білками та циркулюючих імунних комплексів у крові самців II і III груп.

4. Вплив високої дози цитрату Ge хімічно синтезованого (2 мг/кг м. т.) характеризується найвищим рівнем імунних глобулінів, молекул середньої маси, церулоплазміну і лейкоцитів на тлі найнижчого вмісту циркулюючих імунних комплексів у крові щурів V групи порівняно як з контрольною, так і іншими дослідними групами.

#### References

- Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self // Science. – 2002. – Vol. 296. – P. 301–305.
- Poletaev A. B. Physiologic immunology (natural autoantibodies and problems of nanomedicine) // MICLOSH; Moscow. – 2010. – 220 p. (in Russian).
- Brutkiewicz R. R. Biological activities and antitumor mechanism of an immunopotentiating organogermanium compound Ge-132 / R. R. Brutkiewicz, F. Suzuki // In vivo. – 1987. – № 1. – P. 189–204.
- Lukevics E. J. The biological activity of compounds of germanium / E. J. Lukevics, T. K. Gard, L. M. Ignatovich, F. V. Mironov // Riga: Zynatne. – 1990. – P. 191 p.
- Miyao K., Tanaka N. Carboxyethylgermanum sesquioxide and related organogermanium compounds unique synthetic BRM'S: a review // Drugs Future. – 1988. – Vol. 13 (5). – P. 441–453.
- Khrabko M. I. Reproductive function and weight of female rats and viability of offspring for the watering of chemically synthesized nanoparticles and citrate germanium / M. I. Khrabko, O. P. Dolaychuk // Animal biology. – 2015. – Vol. 17 (4). – P. 207. (in Ukrainian)
- Kudrin A. H. Immunopharmacology microelements / A. H. Kudrin, A. V. Skalny, A. A. Zhavoronkov // M.: KMK. – 2000. – 537 p. (in Russian)
- Seyfullina I.Y. Pharmacological effects germanium compounds / I. Y. Seyfullina, O. D. Nemetyah, V. D. Lukyanchuk, E. V. Tkachenko / Odessa Medical Journal. – 2003. – № 6. – P. 111–114. (in Ukrainian)
- Thayer J. S. Germanium compounds in biological systems // Rev. Silicon, Germanium, Tin, Lead Compd. – 1985. – № 8 (2-3). – 133–155.
- Sawai K., Kurono M., Awaya J., et al. Composition containing Organogermanium compound and immunity – adjusting agent composition. Pat. (5 340 806 (K1. 514184) USA; 23) Aug. 1994.
- Kresyun V. I. Pharmacological characterization of compounds of germanium // V. I. Kresyun, K. F. Shemonayeva, A. G. Vidavská // Clinical Pharmacy. – 2004. – № 4. – P. 65–68. (in Ukrainian)
- Dolaychuk O. P. Physiological and biochemical processes in the organisms of rats when feeding them with different amounts of germanium citrate / O. P. Dolaychuk, R. S. Fedoruk, I. I. Kovalchuk, S. I. Kropyvka // Animal biology. – 2015. – Vol. 17, № 2. – P. 50–56. (in Ukrainian)
- Dolaychuk O. P. Physiological effects nanosystru Ge in the conditions of his watering lactate female rats and their offspring / O. P. Dolaychuk, R. S. Fedoruk, V. G. Kaplunenko // Physiological Journal. – 2014. – Vol. 60 (3). – P. 222–223. (in Ukrainian)
- Ukraine patent for utility model number 38391. IPC (2006): C07C 51/41, C07F 5/00, C07F 15/00, C07C 53/126 (2008.01), C07C 53/10 (2008.01), A23L 1/00, B82B 3/00. Method metal carboxylates "Nanotechnology receiving metal carboxylates". Kosinov M. V., Kaplunenko V. G. Publish. 12.01.2009, Bull. № 1. (in Ukrainian)
- Borisevich V. B. Nanomaterials in biology. Fundamentals nanoveterinary / V. B. Borisevich, V. G. Kaplunenko, N. V. Kosinov, at al. // K.: WA "Avicenna", 2010, 416. (in Ukrainian).
- Vlizlo V. V. Laboratory methods of investigation in biology, stock-breeding and veterinary / V. V. Vlizlo, R. S. Fedoruk, I. B. Ratych et al. // Reference book ; Edited by V. V. Vlizlo. Lviv : SPOLOM, 2012, 764 p. (In Ukrainian)
- European convention for the protection of vertebrate animals used for experim. and other scientific purposes // Coun. of Europe, Strasbourg. – 1986. – 53 p.
- Law of Ukraine № 3447-IV "On protection of animals from cruelty" / Supreme Council of Ukraine. – Official. kind. – 2006. – № 27. – S. 990,

P. 230. – (Library official publications). Kovalenko L. Evaluation nanoakvahelat germanium stimulating action on the natural resistance of animals // Scientific Herald NUBiP Ukraine, 2012. – № 172 (1). – P. 203–209.

#### References (SCOPUS)

1. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science*, 2002, 296: 301–305.
2. Poletaev AB. Physiologic immunology (natural autoantibodies and problems of nanomedicine). MICLOSH. Moscow. 2010: 220 p. [Russian].
3. Brutkiewicz RR, Suzuki F. Biological activities and antitumor mechanism of an immunopotentiating organogermanium compound Ge-132. *In vivo*. 1987, 1: 189–204.
4. Lukevics EJ, Gard TK, Ignatovich LM, Mironov FV. The biological activity of compounds of germanium. Riga Zynatne. 1990:191.
5. Miyao K., Tanaka N. Carboxyethylgermanium sesquioxide and related organogermanium compounds unique synthetic BRM'S: a review. *Drugs Future*, 1988, 13 (5): 441–453.
6. Khrabko MI, Dolaychuk OP. Reproductive function and weight of female rats and viability of offspring for the watering of chemically synthesized nanoparticles and citrate germanium. *Animal biology*, 2015, 17 (4): 207. [Ukrainian]
7. Kudrin AH, Skalny AV, Zhavoronkov AA. Immunopharmacology microelements. M. MKM, 2000: 537. [Russian]
8. Seyfullina IY, Nemyatuh OD, Lukyanichuk VD, Tkachenko EV. Pharmacological effects germanium compounds. *Odessa Medical Journal*, 2003, 6: 111–114. [Ukrainian]
9. Thayer JS. Germanium compounds in biological systems. *Rev. Silicon, Germanium, Tin, Lead Compd.*, 1985, 8 (2-3): 133–155.
10. Sawai K, Kurono M, Awaaya J et al. Composition containing Organogermanium compound and immunity – adjusting agent composition. Pat. (5 340 806 (K1. 514184) USA; 23) Aug. 1994.

М. Храбко асп., Р. Федорук, д-р вет. наук  
Інститут біології животних НААН, Львов, Україна

### РОСТ И РАЗВИТИЕ ОРГАНИЗМА САМЦОВ КРЫС F<sub>1</sub> ЕГО ИММУНОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ В ПЕРИОД ВЫПАИВАНИЯ РАЗНЫХ ДОЗ НАНОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО И ХИМИЧЕСКИ СИНТЕЗИРОВАННОГО ЦИТРАТА ГЕРМАНИЯ

Целью исследований было изучить влияние различных доз цитрата Ge на рост и развитие самцов F<sub>1</sub>, активность иммунной системы организма, состояние гемостаза. Исследования выполнены методами групп и периодов на самцах крыс F<sub>1</sub>, которым выпаивали цитрат Ge от молочного периода до 120 дней, в дозах 10 (I), 20 (II), 200 (III) мкг Ge/кг м. т., который полученный методом нанотехнологии и 2000 мкг Ge/кг м. т. – химически синтезированного. По результатам исследований установлено более выраженное влияние цитрата Ge на рост и развитие организма самцов в дозе 20 мкг Ge/кг м. т. Биологическое действие цитрата Ge стимулировало иммунофизиологическую активность организма с повышением содержания общих иммуноглобулинов, молекул средней массы, сиаловых кислот, количества лейкоцитов за счет лимфоцитов и гранулоцитов на фоне уменьшения уровня циркулирующих иммунных комплексов и гексоз, связанных с белками. Отмечено положительное дозо-зависимое влияние цитрата Ge на рост и развитие организма крыс и его гематологические и иммунофизиологические показатели.

**Ключевые слова:** иммунофизиология, крысы, кровь, ткани, германия цитрат.

M. Khrabko, Phd stud., R. Fedoruk, DSc.  
Institute of animal biology NAAS, Ukraine

### GROWTH AND DEVELOPMENT OF F<sub>1</sub> MALE RATS ORGANISM AND ITS IMMUNOPHYSIOLOGICAL ACTIVITY DURING THE PERIOD WATERING THEM DIFFERENT DOSES OF NANOTECHNOLOGY AND CHEMICALLY SYNTHESIZED GERMANIUM CITRATE

The aim of research was to study the effect of different doses of Ge citrate on the growth and development of F<sub>1</sub> male, the activity of their immune system and the state of hemostasis under these conditions. Research performed by methods of groups and periods with using F<sub>1</sub> male rats, which were watering during the milk-feeding period up to 120 days with Ge citrate obtained by nanotechnology method in doses 10 (I), 20 (II), 200 (III) mcg Ge/kg body weight and chemically synthesized Ge citrate in dose 2,000 (IV) mcg Ge/kg body weight. According to the research findings the most pronounced effect watering of Ge citrate on the growth and development of male rats organism was noted in dose 20 mcg Ge/kg body weight. Biological action of Ge citrate stimulated the immunophysiological activity of the organism with increasing of total Ig, molecules of average mass, sialic acid, number of white blood cells by the increasing number of lymphocytes and granulocytes, against the background of reduction of circulating immune complexes and hexoses bound to proteins. The positive dose-dependent effect of Ge citrate on the growth and development of the rats' organism and its immunophysiological and hematological parameters was noted.

**Key words:** immunophysiology, rats, blood, tissue, germanium citrate.

11. Kresyun VI, Shemonayeva KF, Vidavskaya AG. Pharmacological characterization of compounds of germanium. *Clinical Pharmacy*, 2004, 4: 65–68. [Ukrainian]

12. Dolaychuk OP, Fedoruk RS, Kovalchuk II, Kropyvka SI. Physiological and biochemical processes in the organisms of rats when feeding them with different amounts of germanium citrate. *Animal biology*, 2015, 17 (2): 50–56. [Ukrainian]

13. Dolaychuk OP, Fedoruk RS, Kaplunenko VG. Physiological effects nanotsytratu Ge in the conditions of his watering lactate female rats and their offspring. *Physiological Journal*. 2014; 60 (3): 222-223. [Ukrainian]

14. Kosinov MV, Kaplunenko VG, 2009. Method metal carboxylates "Nanotechnology receiving metal carboxylates". Ukraine. Pat. 38391. [Ukrainian].

15. Borisevich VB, Kaplunenko VG, Kosinov NV. at al. Nanomaterials in biology. Fundamentals nanoveterynariyi. K.: WA "Avicenna", 2010: 416. [Ukrainian]

16. Vlizlo VV, Fedoruk RS, Ratych IB. Laboratory methods of investigation in biology, stock-breeding and veterinary. Reference book. Lviv. Spolom. 2012: 764. [Ukrainian]

17. European convention for the protection of vertebrate animals used for experim. and other scientific purposes. Coun. of Europe, Strasbourg, 1986: 53.

18. Law of Ukraine № 3447-IV "On protection of animals from cruelty". Supreme Council of Ukraine. Official. kind. 2006, 27, 990: 230. (Library official publications). Kovalenko L. Evaluation nanoakvahelat germanium stimulating action on the natural resistance of animals. Scientific Herald NUBiP Ukraine, 2012, 172 (1): 203–209.

Надійшла до редакції 25.11.16

## БІОХІМІЧНІ ЗМІНИ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ОПІКОВОЇ ХВОРОБИ ТА ЇХ КОРЕНІННОМ

*При моделюванні лужного опіку стравоходу 1 та 2 ступеня статевонезрілих щурів спостерігалися порушення різних систем метаболізму, введення меланіну сприяло нормалізації біохімічних показників. Було показано, що за умов опіку стравоходу відбувалось порушення білкового (загальний білок, альбумін), азотистого (креатинін, сечовина), вуглеводного (глюкоза) обмінів, обміну ліпідів (холестерин), змінювалася активність ферментів (АлАТ, АсАТ, КК) порушувався водно-електролітний баланс ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , фосфати), в той час як, введення меланіну сприяло нормалізації даних показників. Найефективнішою будлодоза 0,5 мг/кг та 1 мг/кг. Виявлені антитоксичні властивості меланіну, який може бути перспективним препаратом для нормалізації метаболізму у постраждалих при опіку стравоходу та попередження їх ускладнень.*

**Ключові слова:** опік стравоходу, біохімічні показники, метаболізм, меланін.

**Вступ.** Найрозповсюдженіше хімічне пошкодження у дітей – опік стравоходу, виникає при випадковому ковтанні речовин, які мають в своєму складі луги, кислоти або інші хімічні речовини. Глибина опіку залежить від концентрації та часу контакту слизової оболонки з уражуючим агентом [1]. Лужний опік стравоходу (ЛОС) у зв'язку з утворенням коагуляційного некрозу є більш небезпечним порівняно з утворенням сухого струпа при кислотному опіку у дітей [2]. При цьому, смертність при опіку першого ступеня у дорослих, майже не трапляється, ніж при опіку другого та третього ступеня. У дітей при хімічному опіку стравоходу частіше трапляється опіковий шок та летальні випадки, навіть при опіку першого ступеня, оскільки співвідношення поверхні тіла та маси тіла у дітей, особливо раннього віку більше ніж в дорослих в 2-3 рази [3,4]. Опікова хвороба та синдром поліорганної недостатності, до якого вона призводить, є актуальну проблемою сучасної медицини. Ушкодження нирок та легень, які зустрічаються найчастіше в структурі синдрому поліорганної недостатності, виникають внаслідок розвитку шокових змін та дії ендогенних токсинів [5].

Незважаючи на велику кількість медичних препаратів, що використовуються з цією метою, у літературі є суперечливі відомості про їх ефективність та достатньо гострою є проблема скорочення строків загоєння опікових ран, попередження післяопікових ускладнень [6,7,8]. Актуальним є використання природних нетоксичних антиоксидантів в якості цитопротекторів [9]. Захисний ефект антиоксидантів широко досліджується в умовах впливу несприятливих чинників, метаболічних розладів. При глибоких опіках стравоходу, важливо швидко надати необхідну допомогу, тому що будь-яка затримка або неналежне лікування може значно уповільнити процес загоєння або викликати серйозну інфекцію. На сьогодні, на ринку є багато препаратів для лікування опіків, до сих пір не вистачає ідеального препарата, так як більшість з доступних продуктів мають тільки антимікробну активність, але не впливають на процес загоєння рани. Крім того, ці продукти можуть бути токсичними для інтактних клітин, і викликати алергічні реакції [10]. Лікарські рослини, багаті фенольними сполуками потенційно можуть впливати на прискорення загоєння опікових ран і захищає рану від бактеріальних інфекцій [11]. Додатковою перевагою використання рослинних препаратів, багатьох поліфенолами в лікуванні опіків є їх низька вартість, висока доступність і менша кількість побічних ефектів [11]. При опіках відбувається порушення гомеостазу між активними формами кисню та антиоксидантними системами захисту в організмі [12]. Антиоксидантна активність фенольних сполук відбувається за допомогою різних механізмів дії: пригнічення утворення активних форм кисню, здатність нейт-

ралізувати молекули синглетного кисню, зв'язувати іони металів які є каталізаторами реакцій, що призводять до утворення активних форм кисно, перериваючи каскад реакцій вільних радикалів у процесі перекисного окислення ліпідів [13,14,15,16]. Таким чином, аналіз сучасної літератури дозволяє стверджувати, що можливими перспективними засобами нормалізації біохімічних показників при опіку стравоходу першого та другого ступеня є речовини природного походження на основі поліфенольних сполук. До таких речовин належить меланін, який є продуктом життєдіяльності дріжджеподібних грибів *Nadsoniella nigra* штам X-1 [17]. Цей препарат демонструє антиоксидантні [18, 19, 20], імуномодулюючі [21, 22], антиканцерогенні [21,23] та стрес-протекторні [24] властивості, що дозволяє його використовувати в медицині.

Тому метою даної роботи було оцінити біохімічних показників сироватки крові щурів за умов опіку стравоходу першого та другого ступеня на фоні введення препарату меланін.

**Матеріали та методи дослідження.** У роботі дотримувались загальних етических принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 р.), інших міжнародних угод і національного законодавства в цій галузі. Досліди проводили на білих нелінійних статевонезрілих щурах (1-місячних) масою 90–110г (що відповідає 1-4-річному віку дітей). Опік моделювали розчином  $NaOH$  10% та 20%, що відповідає 1-му та 2-му ступеню опіку [1]. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію. Розділяли на 9 груп : 1 група інтактні щури, 2 та 3 група ЛОС 1 та 2 ступеня яким вводили фізіологічний розчин у відповідній дозі та терміни, 4, 5 та 6 група ЛОС 1 ступеня, яким вводили меланін починаючи з 2-ї доби експерименту в дозі 0,1; 0,5 та 1мг/кг відповідно, протягом 14 днів; 7, 8 та 9 група ЛОС 2 ступеня, яким вводили меланін починаючи з 2-ї доби експерименту в дозі 0,1; 0,5 та 1мг/кг відповідно, протягом 14 днів. Продуцентом меланіну, використаних в наших дослідженнях, були дріжджеподібні гриби *Nadsoniella nigra* штам X1, що висіяні із зразків вертикальних скель о.Галіндез. Сироватку крові для дослідження відбирали на 7, 15 та 21 добу, які відповідають стадіям опікової хвороби [8]. Методом виведення тварин із досліду була цервікал-надисплокація. Біохімічні показники визначали в сироватці крові, яку отримували центрифугуванням крові при 2500g × 40 хв. Біохімічні параметри крові (загальний білок, альбумін, АСТ, АЛТ, ЛФ, глюкоза, холестерин, сечовина, креатинін, креатиніназа,  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , фосфати) визначали за допомогою біохімічного аналізатора *Humalyser 3000* по стандартним методикам. Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою методів варіаційної статистики з

використанням комп'ютерної програми Excel. Для визначення достовірності відмінностей між двома вибірками використовували критерій Стьюдента ( $t$ ). При цьому достовірними вважались різниці  $p < 0,05$ .

**Результати та їх обговорення.** Основними критеріями білкового обміну є концентрація загального білка та альбуміна [25], тому для аналізу було обрано саме ці показники. Концентрація загального білка знижувалась при опіку стравоходу 1 та 2 ступеня, що вказує на зниження синтезу білка, підвищення процесів катаболізму, зниження абсорбції протеїнів, інгібування окисного фосфорилювання. Зниження концентрації загального білка відбувається в основному, за рахунок втрати альбумінової фракції [1,26,27]. За умов введення препарату меланін при ЛОС 2 в дозах 0,1; 0,5 та 1 мг/кг найбільш ефективною була доза 1 мг/кг, при якій спостерігали підвищення концентрації загального білка на 7 добу на 54,1%. Концентрація альбуміну при ЛОС 1 підвищувалась на 7 добу на 26,9%, 26,6% та 23,9% відповідно за доз 0,1, 0,5 та 1 мг/кг меланіну, порівняно з опіком стравоходу 1 ступеня. При ЛОС 2 найбільше підвищення спостерігали на 7 добу на 22,3%, 39,8% та 25,4% при дозах 0,1, 0,5 та 1 мг/кг меланіну відповідно, порівняно з тваринами з ЛОС 2. Відомо, що вміст альбуміну в крові тварин залежить переважно від інтенсивності його синтезу в печінці [28]. Так, гіпоальбумінемія, яку ми спостерігали свідчить про порушення білоксинтезуючої функції цього органа. Введення препарату меланін сприяло підвищенню концентрації загального білка та альбуміну, що може свідчити про його відновлюючий вплив на клітини печінки.

Печінка є одним із провідних органів регулювання вуглеводного та ліпідного обміну, депо глікогену. Зміна функціонального стану печінки супроводжується порушенням обміну речовин [1, 29]. Тому, для оцінки функціонального стану печінки визначали активність аміно-трансфераз (АСТ та АЛТ), лужної фосфатази, холестерину та глюкози в крові. Визначення активності АСТ і АЛТ зазвичай використовують в якості діагностичного маркера пошкодження печінки, так як вони є внутрішньоклітинними ферментами, тому підвищення їх активності в крові свідчить про пошкодження гепатоцитів [30]. Активність АСТ підвищувалась при ЛОС 1 та ЛОС 2 протягом всього експерименту. Найсуттєвіші зміни спостерігалися при ЛОС 1 на 15 добу при введені препарату меланін у дозах 0,1, 0,5 та 1 мг/кг, активність ферменту спадала на 28,6%, 25,8% та 16,7% відповідно порівняно з тваринами з ЛОС 1. У групі ЛОС 2 які отримували препарат в дозах 0,1, 0,5 та 1 мг/кг спостерігалися найсуттєвіші зміни на 7 добу, активність ферменту знижувалась на 5%, 11% та 11,1% відповідно порівняно з шурами, яким моделювали ЛОС 2. Активність АЛТ підвищувалась при ЛОС 1 та ЛОС 2 на 7, 15 та 21 добу при 1 та 2 ступені опіку стравоходу. Найсуттєвіші зміни спостерігалися при ЛОС 1 на 7 добу при введені препарату меланін у дозах 0,1, 0,5 та 1 мг/кг активність ферменту спадала на 8%, 19,6% та 25,8% відповідно, порівняно з тваринами з ЛОС 1. У групі ЛОС 2, які отримували препарат в дозах 0,1, 0,5 та 1 мг/кг найбільш виражені зміни були на 7 добу, активність ферменту знижувалась на 12,4%, 26,6% та 11,7% відповідно порівняно з тваринами з ЛОС 2. Як відомо, лужна фосфата за у найбільшій кількості знаходиться в кістковій тканині, печінці, слизовій оболонці кишечника. Даний маркер існує в двох ізоформах, при чому, в дитячому віці переважає кісткова, а в дорослому – печінкова ізоформа [31]. За умов опіку відбувалось підвищення активності ферменту протягом всього експерименту, що свідчить

про пошкодження даних тканин, при ЛОС 1 та ЛОС 2. При введені препарату меланін у дозах 0,1, 0,5 та 1 мг/кг спостерігалося зниження активності ЛФ при ЛОС 1 на 7 добу на 12%, 11% та 10,5%; при ЛОС 2 на 17,5%, 5% та 26% відповідно порівняно з тваринами з ЛОС 1 та ЛОС 2 відповідно, що може вказувати на відновлюючі функції меланіну, щодо гепатоцитів. За умов опіку підвищувалась концентрація холестерину в сироватці крові, що може вказувати на зниження активності печінкової три酰ілгліцидеридої ліпази [32], концентрація холестерину достовірно зростала у тварин з ЛОС 2 на 7, 15 та 21 добу на 9,7%, 12,1% та 14,7% відповідно порівняно з контрольними значеннями. При введені препарату меланін у дозах 0,1, 0,5 та 1 мг/кг спостерігалося зниження концентрації холестерину: при моделюванні ЛОС 2 станом на 15 добу на 11,8%, 12,9% та 8,7% та 21 добу на 10,3%, 15,3% та 7,2% відповідно, порівняно з тваринами з ЛОС 2. Можна припустити, що меланін діє, як активатор мобілізації холестерину з периферичних тканин в печінку в складі жовчних кислот. Можливо меланін діє шляхом зниження синтезу мРНК ацетил КоАкарбоксилази та синтез жирних кислот. Одним з головних учасників вуглеводного обміну є глюкоза за умов опіку стравоходу 1 та 2 ступеня спостерігалося підвищення даного показника на 7, 15, 21 добу на 23,5%, 26,1%, 19,4% та на 40,9%, 20,9%, 22,1% відповідно, порівняно з контрольними значеннями, що може бути пов'язано з стресовим станом та зниженням виділення інсулулу внаслідок стресу. Відомо, що підвищення глюкози в крові та зменшення використання глюкози клітинами може привести до гіперглікемії. Крім того, окислювальний стрес може бути одним з основних патогенних впливів як на резистентність клітин до інсулулу, так і дисфункції б-клітин після опіку стравоходу [33]. За умов введені препарату меланін спостерігалося зниження глюкози при ЛОС 1 на 15 добу концентрація глюкози спадала на 5,3%, 5,9% та 8% відповідно порівняно з тваринами з ЛОС 1. У групі ЛОС 2, які отримували препарат в дозах 0,1, 0,5 та 1 мг/кг спостерігали найсуттєвіші зміни на 7 добу, концентрація глюкози знижувалась на 12,4%, 15%, 16,7% відповідно порівняно з тваринами з ЛОС 2, що може вказувати на активацію продукування інсулулу та стимулювання периферичних тканин до використання глюкози.

Для визначення функціонального стану нирок досліджували показники азотистого обміну: креатинін, сечовину та активність креатинінази. За умов опіку 1 та 2 ступеня протягом всього експерименту спостерігали підвищення концентрації сечовини. Найсуттєвіші зміни при введені препарату меланін у дозі 0,51 мг/кг спостерігалися при ЛОС 2 на 21 добу показник знижувався на 10% відповідно, порівняно з тваринами з ЛОС 2. Концентрація креатиніну за умов ЛОС 1 підвищувалась на 7, 15 та 21 добу порівняно з контрольними значеннями. За умов введені меланіну у дозах 0,1, 0,5 та 1 мг/кг при ЛОС 1 на 7 добу відбувалось зниження даного показника на 4,5%, 13% та 16,6% відповідно, порівняно з тваринами з ЛОС 1. При ЛОС 2 достовірно знижувався показник станом на 15 добу на 18%, 16,6%, 21,7% та 21 добу на 21,1%, 22%, 10,5% відповідно, порівняно з тваринами з ЛОС 2. Активність креатинінази підвищувалась при ЛОС 1 та ЛОС 2 у всі досліджувані терміни. При введені препарату меланін у дозах 0,1, 0,5, 1 мг/кг активність достовірно знижувалась при ЛОС 2 на 7 добу на 17,6%, 16,9%, 13,5% на 15 добу на 22%, 28%, 14% відповідно, порівняно з тваринами з ЛОС 2.

**Таблиця 1.** Основні біохімічні показники та показники водно-електролітного балансу у сироватці крові щурів за умов лужного опіку стравоходу 1 ступеня та при введенні різних доз меланін (M±m, n=10)

Показник	Контроль	ЛОС 1											
		7 доба				15 доба				21 доба			
		ЛОС 1	ЛОС 1 + меланін 0,1мг/кг	ЛОС 1 + меланін 0,5мг/кг	ЛОС 1 + меланін 1мг/кг	ЛОС 1	ЛОС 1 + меланін 0,1мг/кг	ЛОС 1 + меланін 0,5мг/кг	ЛОС 1 + меланін 1мг/кг	ЛОС 1	ЛОС 1 + меланін 0,1мг/кг	ЛОС 1 + меланін 0,5мг/кг	ЛОС 1 + меланін 1мг/кг
Загальний білок (г/л)	65,01±0,8	62,3±0,8*	63,7±1,5	59,8±1,2**	63,1±1,4	64,1±0,36	64,2±1,1	47,2±1,5*	70,1±1,0**	67,3±1,3*	70,6±0,9**	73,4±1,2**	73,1±1,4**
Альбумін (г/л)	37,5±2,5	30,1±1,5*	38,2±1,1*	38,1±1,0*	37,3±0,9*	32,7±1,06*	37,6±1,3*	40±2,1*	39,1±1,9*	35,8±1,0	44,1±1,6*	39,2±1,4*	40,5±1,3*
ACT (Од/л)	55,5±1,1	66,8±1,2*	62,5±1,1**	61,7±1,5**	60,6±1,1**	64,06±1,5*	53,9±1,2*	57,9±0,9*	59,6±1,0**	55,9±1,1	39,9±1,3**	41,5±1,6*	46,54±1,9**
АЛТ (Од/л)	27,7±0,9	57,7±1,2*	53,1±1,5**	46,4±1,2**	42,8±1,7**	48,1±0,9*	45,4±1,1*	43,12±1,5**	38,9±1,6**	40,8±1,1*	41,45±1,2*	41,8±1,3*	40,1±1,0*
ЛФ (Од/л)	354,2±3,5	479,7±4,9*	374,6±2,9**	380,1±4,1**	381,2±3,7**	401±3,7**	371,1±3,8**	395,1±3,8*	362,7±2,9**	376,3±5,1*	337,8±3,6**	360,46±3,1**	341,1±3,9**
Глюкоза (ммоль/л)	4,94±0,3	6,1±0,7*	6,16±0,84*	6,07±0,82*	5,9±0,73*	6,23±0,64*	5,9±0,61*	5,86±0,4*	5,74±0,52*	5,9±0,4*	5,7±0,43*	5,94±0,61*	5,2±0,6
Холестерин (ммоль/л)	4,22±0,1	4,42±0,12	4,39±0,18	4,03±0,21*	4,16±0,13*	4,23±0,3	4,11±0,2	4,1±0,25	4,27±0,18	4,65±0,19*	4,34±0,21	4,2±0,13*	4,1±0,24*
Сечовина (мг/дл)	36,2±0,21	44,2±1,1*	40,8±1,2**	42,5±1,1**	39,1±0,78*	42,6±0,89*	42,1±0,89*	38,4±1,3**	41,1±1,1*	39,6±0,67*	38,1±0,9	37,6±0,89*	37,9±0,8*
Креатинін (мкм/л)	88±2,1	126,2±1,6*	120,5±1,5**	110±1,7**	105,2±1,3**	100,6±1,8*	108,9±1,7**	101,6±0,98**	100,7±1,8**	92,8±1,3*	94,1±1,63**	95,1±0,8**	91±1,6**
KK (Од/л)	191,4±1,3	264,9±1,3*	258,7±1,2**	237,1±1,5**	224,9±1,4**	234,7±1,5*	240±1,1**	222,7±1,5**	218±1,5**	205,7±1,0*	210,8±1,5**	208,4±1,7**	207,7±1,3*
Na(ммоль/л)	156,2±1,1	151,2±1,5*	152,4±1,2*	152,9±1,3*	153,1±1,1*	152,8±1,2*	152,9±1,1*	153,8±1,2*	154,64±1,2	154,7±1,3*	154,9±1,2*	154,8±1,2	155,4±1,3
K (ммоль/л)	5,4±0,2	6,3±0,3*	6,23±0,4*	6,1±0,4*	5,9±0,1*	6,1±0,3*	5,78±0,2	5,4±0,3	5,8±0,4	5,5±0,6	5,37±0,5	5,5±0,4	5±0,3
Cl (ммоль/л)	110±1,1	103,4±1,3*	104,6±1,5*	105,67±1,2*	104,5±1,3*	108,2±1,1	103,4±1,4**	106,1±1,3*	105,3±1,6**	107,1±1,1*	107,6±1,3*	107,5±1,4*	108,1±1,3*
Mg(ммоль/л)	0,91±0,01	0,8±0,06*	0,82±0,05*	0,83±0,04*	0,86±0,03**	0,86±0,03*	0,87±0,02*	0,87±0,03	0,93±0,04	0,8±0,04*	0,9±0,03*	0,89±0,04*	0,91±0,05*
Ca (мг/дл)	10,6±0,3	8,9±0,4*	10,2±0,3*	10,5±0,4*	11,5±0,5**	9,1±0,3*	8,4±0,4*	8,3±0,2**	9,9±0,4**	9,65±0,4	10,1±0,6	10,4±0,5	12,2±0,5**
P(мг/дл)	3,98±0,3	6,9±0,3*	6,04±0,3*	6,6±0,3*	5,5±0,5**	5,7±0,4*	5,5±0,4*	5,3±0,4*	5±0,3*	4,3±0,4	5,1±0,2**	5±0,3*	4,6±0,5

\* – p<0,05 порівняно з контролем

# – p<0,05 порівняно з ЛОС 1

**Таблиця 2.** Основні біохімічні показники та показники водно-електролітного балансу у сироватці крові щурів за умов лужного опіку стравоходу 2 ступеня та при введенні різних доз меланін (M±m, n=10)

Показник	Контроль	ЛОС 2											
		7 доба				15 доба				21 доба			
		ЛОС 2	ЛОС 2 + меланін 0,1мг/кг	ЛОС 2 + меланін 0,5мг/кг	ЛОС 2 + меланін 1мг/кг	ЛОС 2	ЛОС 2 + меланін 0,1мг/кг	ЛОС 2 + меланін 0,5мг/кг	ЛОС 2 + меланін 1мг/кг	ЛОС 2	ЛОС 2 + меланін 0,1мг/кг	ЛОС 2 + меланін 0,5мг/кг	ЛОС 2 + меланін 1мг/кг
Загальний білок (г/л)	65,01±0,8	41,2±1*	62,5±0,56**	60,01±0,96**	63,5±0,89#	60,5±0,7*	63,5±1,2**	64±0,45*	61,4±1,5**	67,3±0,8*	65,5±0,89*	73,8±1,2**	62,7±0,38**
Альбумін (г/л)	37,5±2,5	23,6±1,12*	28,86±2,3**	33±1,1**	29,5±1,2*	29±0,7*	32,3±1,09**	43,2±1,7**	35,2±1,3*	31±0,8*	31,1±1,1*	41,5±1,5*	32,2±0,7*
ACT (Од/л)	55,5±1,1	70,1±2,3*	66,6±0,99**	62,4±1,4**	62,3±1,4**	63,1±1,9*	58,05±1,9**	58,1±1,3**	48,4±1,9**	56,3±1,2	51,8±0,75**	56±1,5*	39,7±2,1*
АЛТ (Од/л)	27,7±0,9	71,1±2,2*	62,3±1,9*	52,2±1,3**	55,7±1,0**	64±2,3*	50,48±1,5*	48,2±1,5*	50,8±1,1*	43±1,9*	42,05±2,1*	46,7±1,4**	47,7±1,5**
ЛФ (Од/л)	354,2±3,5	513,2±4,7*	423,6±4,7**	491,2±3,4**	378,1±2,8*	436,2±3,9**	401,3±3,8*	389,7±2,9**	364,7±3,1**	385,7±4,2*	396±4,1**	347±3,1*	368,1±3,7**
Глюкоза (ммоль/л)	4,94±0,3	6,96±0,98*	6,1±0,98*	5,91±0,8*	5,8±0,44**	5,97±0,56*	5,94±0,87*	5,8±0,56*	5,48±0,37*	6,03±0,96*	5,7±0,49*	5,55±0,33*	5,6±0,51*
Холестерин (ммоль/л)	4,22±0,1	4,63±0,19*	4,33±0,18	4,27±0,2	4,39±0,12	4,73±0,23*	4,17±0,23*	4,12±0,21*	4,32±0,17*	4,84±0,31*	4,34±0,27	4,1±0,16*	4,49±0,13
Сечовина (мг/дл)	36,2±0,21	46,4±0,38*	43,3±1,2**	44,2±1,1**	39,2±1,3**	44,9±0,46*	44,4±1,32*	42,4±0,89**	34,2±1,07**	42,1±0,8*	46,1±1,4**	46,1±0,98**	40,1±0,99**
Креатинін (мкм/л)	88±2,1	145,01±2,1*	125,6±2,6**	109,9±1,3**	93,4±1,24**	120±2,9*	98,5±1,4**	100,0±1,7**	94±1,36**	110±1,9*	86,8±1,8*	86,1±0,99*	89,7±1,4*
KK (Од/л)	191,4±1,3	350,8±1,1*	288,9±1,1**	291,4±1,5**	303,6±1,1**	323,6±1,0*	251,2±1,1**	231±1,4**	278,4±1,2**	241,4±1,5*	249,6±1,3**	199,8±1,5**	218,7±1,0**
Na(ммоль/л)	156,2±1,1	148±1,3*	150,95±1,1**	152,8±1,5*	149,4±1,1*	141±1,5*	149,7±1,0**	153,1±1,5**	150,6±1,3**	150±1,1*	151,97±1,1**	154,03±1,5**	152,1±1,3**
K (ммоль/л)	5,4±0,2	8±0,8*	6,6±0,6*	6,7±0,9*	6,1±0,5*	6,9±0,3*	5,8±0,3*	6,1±0,4*	5,7±0,6*	5,9±0,4	5,3±0,4	5,8±0,5	5,5±0,7
Cl (ммоль/л)	110±1,1	98,4±1,5*	104,6±1,1**	105,9±1,2**	104,8±1,5**	101,8±1,3*	105,4±1,4**	104,9±1,2**	105,2±1,0**	103,6±1,4*	106,4±1,4*	108,7±1,1*	107,2±1,3**
Mg(ммоль/л)	0,91±0,01	0,74±0,06*	0,79±0,06*	0,81±0,05*	0,8±0,05*	0,8±0,05*	0,82±0,05*	0,87±0,03	0,84±0,04*	0,85±0,04*	0,84±0,05*	0,85±0,03*	0,87±0,03
Ca (мг/дл)	10,6±0,3	8,6±0,6*	11,8±0,3**	9,8±0,4**	10,9±0,4*	8,1±0,5*	9,8±0,2**	10,5±0,6*	9,5±0,5**	7,1±0,5	11,8±0,4*	10,4±0,5*	10,2±0,7*
P (мг/дл)	3,98±0,3	9,3±0,4*	7,7±0,7*	6,8±0,7*	6,1±0,6**	6,6±0,3*	7,7±0,7**	6,8±0,7**	6,1±0,6**	5,5±0,4*	5,1±0,3*	5,2±0,4*	5,3±0,5*

\* – p<0,05 порівняно з контролем

# – p<0,05 порівняно з ЛОС 2

Обмін електролітів важлива частина загального метаболізму, що спрямована на підтримання гомеостазу. Основними катіонами організму є калій, натрій, кальцій та магній; аніонами – хлориди, фосфати, бікарбоната та органічні кислоти. За нормального фізіологічного стану рівень іонів в клітині та поза її межами нерівномірний, що сприяє підтриманню трансмембраниого потенціалу, при патологіях цей баланс порушується і, як наслідок, є неспроможність клітини проводити нормальні обміни речовин [34]. За умов ЛОС 1 та ЛОС 2 підвищувались концентрації К та Р, порівняно з контролальними значеннями. При введенні препарату меланін у дозах 0,1, 0,5, 1мг/кг за умов ЛОС 1 концентрація К знижувалась переважно на 15 добу на 5,2%, 11,5%, 5%, при ЛОС 2 на 7 добу на 17,5%, 16,2%, 23,7%. Концентрація Р знижувалась при ЛОС 1 на 15 добу на 5%, 7% та 12,3%, при ЛОС 2 на 7 добу на 17%, 27%, 34% відповідно порівняно з тваринами з ЛОС 1 та ЛОС 2. Концентрація Na та Cl знижувалась за умов ЛОС 1 та ЛОС 2 у всі доби експерименту. При введенні препарату меланін у дозах 0,1, 0,5, 1мг/кг при ЛОС 2 концентрація Na підвищувалась переважно на 15 добу на 6,2%, 8,6%, 6,8%, концентрація Cl зростала на 7 добу на 6,3%, 7,6% та 6,5% відповідно, порівняно з тваринами з ЛОС 2. Концентрація Mg та Саспадала за умов ЛОС 1 та ЛОС 2 на 7, 15 та 21 добу експерименту. За умов ЛОС 1 найбільш ефективною була доза 1мг/кг, при якій концентрацію Mg підвищувалась на 7, 15, 21 добу на 7,5%, 8,1%, 14%; а концентрацію Ca на 29,2%, 9%, 26,4% відповідно, порівняно з тваринами з ЛОС 1. При ЛОС 2 також найбільш ефективною виявилась доза 1мг/кг, концентрація Mg зростала за таких умов на 7 добу на 8,1%; а концентрацію Ca на 43% відповідно порівняно з тваринами з ЛОС 2.

У щурів з опіком стравоходу було виявлено зміни метаболізму, водно-електролітного обміну та зміна активності ферментів, препарат меланін виявив нормалізуючий вплив на дані показники, найбільш ефективними були дози 0,5мг/кг та 1мг/кг.

### Висновок.

Отже, було встановлено, що при лужному опіку стравоходу 1 та 2 ступеня у статевонезрілих щурів відбувалося порушення основних біохімічних показників та водно-електролітного балансу. Введення препарату меланін сприяло нормалізації біохімічних показників та електролітів. Даний ефект вказує на можливість застосування меланіну для полегшення перебігу опікових та післяопікових ускладнень. У зв'язку з цим доцільно провести більш поглиблена вивчення механізмів антитоксичного впливу меланіну при опіках різної тяжкості.

### Список використаних джерел

- Раєцька Я. Б. Відтворення експериментальної моделі хімічного опіку стравоходу I ступеня у щурів / Я. Б Раєцька, Т.В Іщук, О.М. Савчук, Л.І. Остапченко // Медична хімія. – 2013. – т. 15, № 4. – С. 30-34.
- Karaman Ibrahim Evaluation of 968 children with corrosive substance in gestion. / OrhanKoç, Ayşe Karaman // Indian Journal Crit Care Medicine. – 2015. – 19(12). – Р. 714-718.
- Öztorun Cl. The out comes of becoming a pediatric burn center in Turkey /Öztorun Cl, Demir S. //UlusTravma Acil Cerrahi Derg. – 2016. – 22(1). Р. 34.
- Самойленко Г. Е. Ожоги у детей / Г. Е. Самойленко //Здоровье и ребенок. – 2006. – №1.
- Сухомлин Т.А. Вплив препарату ліпін на показники вуглеводного обміну при опіковій хворобі / Т.А. Сухомлин, Я.О. Басараб // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник української медичної стоматологічної академії. – № 4 (48). Tom 14. – 2014.
- Клименко М.О. Опікова хвороба (патогенез і лікування) / М.О. Клименко, Л.Г. Нетюхайлло. – Полтава, 2009. – 118 с.
- Нетюхайлло Л.Г. Механізми опікової хвороби та обґрунтування застосування препарату "Кроюхор" для її лікування : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня доктора мед. наук : спец. 14.03.04 "Патологічна фізіологія" / Л.Г. Нетюхайлло. – Харків, 2007. – 34 с.
- Фісталь Е.Я. Комбустіологія. / Е.Я. Фісталь, Г.П. Козинець, Г.Є. Самойленко та ін. – К., 2004. – 184 с.
- Сенюк О. Ф. Влияние меланин-глюканового комплекса, выделенного из грибов трутовика, на продолжительность жизни самок мышей линии ICR. / О. Ф. Сенюк, Л. Ф. Горовой\*, Л. А. Паламар. // Пробл. старения и долголетия. – 2014. – 23, № 1. – С. 11–27
- Kazi A. Inhibition of the proteasome activity, a Novel mechanism as associated with the tumor cell apoptosis in duing ability of genistein/A. Kazi, K.G. Daniel, D.M. Smith, N.B. Kumar, Q.P Dou. // Biochem. Pharmacol. – 2003. – 66. – Р. 965–976.
- Bahrami R. Medicinal plant sand their natural components as future drugsfor the treatment of burn wounds: Anintegrative review. / R. Bahrami, M.H. Farzaei, R. Rahimi // Arch. Dermatol. Res. – 2014. – 306. – Р. 601–617.
- Yoo H.G. Lithospermum erythrorhizon next ract protects keratinocyte sand fibroblasts against oxidative stress. / H.G. Yoo, B.H. Lee, W. Kim, J.S. Lee, G.H. Kim, O.K. Chun, S.I. Koo, D.O Kim // J. Med. Food. – 2014. – 17. – Р. 1189–1196.
- Samoylenko A. Nutritional counter measure star getting reactive oxygen species in cancer From mechanisms to biomarkers and clinical evidence. / A Samoylenko, J.A. Hossain, D. Mennerich, S. Kellokumpu, J.K. Hiltunen, T. Kietzmann //Antioxid. RedoxSignal. – 2013. – 19. – Р. 2157–2196.
- Liaudanskas M. Phenolic composition and antioxidant activity of Malusdomestica leaves. / M. Liaudanskas, P. Viskelis, R. Raudonis, D. Kvirklys, N. Uselis, V. Janulis // Sci. World J. – 2014. – 2014. – Р. 306217.
- Alov P. Computational studies of free radical scavenging properties of phenolic compounds. / P. Alov, I. Tsakovska, I. Pajeva // Curr. Top. Med. Chem. – 2015. – 15. – Р. 85–104.
- Andjelković M. Iron chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. / M. Andjelković, J. vanCamp, B.de Meulenaer, G. Depaeemaere, C. Socaciu, M. Verloo, Verhe R. // FoodChem. – 2006. – 98. – Р. 23–31.
- Чижанська Н.В. Рівень кортизолу в крові щурів до та після стресу на фоні дії меланіну / Н.В. Чижанська, О.І. Цирюк, Т.В. Берегова // Вісник проблем біології і медицини. – 2007. – Вип.1.- С. 40-44.
- Brenner M. The protective role of melanin against UV damage in human skin / M.Brenner, V.G. Hearling// PhotochemPhotobiol. – 2008. – Vol. 84(3). – Р. 539-549.
- Романовская В.А. Устойчивость к УФ излучению микроорганизмов, изолированных из наскальных биотопов Антарктики / В.А. Романовская, А.Б. Таширев, С.О. Шилин, Н.А. Черная // Мікробіологічний журн. – 2010. – 72, № 3. – С. 8–14.
- Keypour S. Investigation of the antibacterial activity of a chloroform extract of Ling Zhi or Reishi medicinal mushroom, Ganodermalucidum (W. Curt. Fr.) P. Karst. (Aphylophoromycetidae), from Iran / S.Keypour, H.Riahi, M.Moradali, H.Rafati // Int. J. Med. Mushrooms. – 2008. – 10, № 4. – Р. 345–349.
- Racca S. Effects of swim stress and alpha-MSH acute pre-treatment on brain 5-HT transporter and corticosterone receptor. / S.Racca, A.Spacamiglio, P.Escalario, G.Abbadessa, L.Cangemi, F.DiCarlo, et al. // PharmacolBiochemBehav. – 2005. – 81(4). – Р. 894-900.
- Chornenko N. M. Correction Parameters of Endogenous Intoxication in Experimental Burn Disease at the Stage of Toxemia. / N. M.Chomenka, YA.B. Raetska, O. M.Savchuk, E.O.Torgalo, T. V.Beregova, L.I.Ostapchenko// RJPBCS 7(5), September – October. – 2016. – Р. 1042.
- Seniuk O.Anticancerogenic properties of melanin-glucancomplex from higher fungi / O.Seniuk, L.Gorovoj, V. Kovalev, et al. // Proc. 5th Internat. Med. Mushroom Con.(Nantong, China, 5th–8th September, 2009). – Nantong, 2009. – Р. 142–149.
- Голишкін Д. В. Особливості лейкоцитарної формулі крові щурів за умов стрес-індукованих ерозивно-виразкових уражень шлунка та профілактичного введення меланіну / Д. В. Голишкін, Т. М. Фалалеєва, Н. В. Чижанська, Т. В. Берегова, Л. І. Остапченко. //Український антарктичний журнал. – № 14. – 2015. С.114
- Gokakin A. K. The protective effects of sildenafil in acute lung injury in a rat modelof severe scald burn: A biochemical and histopathological study. / A. K Gokakin, K. Deveci, A. Kurt, BC.Karakus, C.Duger. // Burns. – 2013; V -39:P. 1193.
- Ibrahim M. Y. Effects of alloxan-induced diabetes mellitus on blood metabolites and serum minerals and hormones in rabbits (Lepus cuniculus) in relation to starch supplementation and season/ M. Y Ibrahim, M. A.Abdalla// AdvancesinBiologicalResearch. – 2011. -5 (1). – Р.45-58.
- Ishchuk T.V. Changes in blood protein composition under experimental chemical burns of esophageal development in rats. / T.V. Ishchuk, Ya.B. Raetska, O.M. Savchuk, L.I. Ostapchenko. // Biomedical Research and Therapy. – 2015. -2(4). – Р. 241-249.
- De Ledinghen V. Liver stiffness measurement in children using FibroScan: feasibility study and comparison with Fibrotest, aspartate transaminase to platelets ratio index, and liver biopsy. / V.De Ledinghen, B.Le Bail, L.Rebouissoux et al. // J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. – 2007. – 45. – Р. 443–450.
- Іщук Т.В. Зміни білкового складу гомогенату стравоходу за розвитку експериментального опіку стравоходу щурів. / Т.В. Іщук, Я.Б. Раєцька, О.М. Савчук // Молодий вчений. – 2015. – № 4 (19).
- Yousef IM. Sodiumarseniteinducedbiochemicalperturbationsinrats: Amelioratingeffectofcucum. / Yousef IM, El-Demerdash MM, Radwan FME// FoodChemToxicol. – 2008. – 48. Р. – 3506–11.
- Лисенко С. А. Активність лужної фосфатази як маркер паранепопластичного ревматологічного синдрому у хворих на рак легені. / С. А. Лисенко, А. В. Мельник, Р.Г. Церковник // Український науково- медичний молодіжний журнал. -2012. – № 4. – С 47.
- Amrani S. Hypolipidemic activity of aqueous Ocimum basilica umex tract in acute hyperlipidemia emia induced bytriton WR-1339 in rats and its antioxidant property./ S. Amrani, H. Harnafi, H. BouananiNel, M. Aziz, HS. Caid, S. Manfredini, etal.//PhytotherRes. – 2006. -20. –P.1040-5.

33. Klibet F. Oxidative stress-related liver dysfunction by sodium arsenite: Alleviation by Pistacia lentiscus oil / Klibet F., Boumendjel A., Khari M., ElFeki A., Abdennour C., Messarah M. // PharmBiol. – 2016. – 54(2). P. 354.
34. Ercan S. The Effect of Pepper Gas (OC) on Some Biochemical Parameters in Rats. / S. Ercan, M. Nihat. // Kafkas Univ Vet Fak Derg. – 2012. – 18 (2). – P.259-266.
- Reference.**
1. Raetska Ya.B., T.V. Ishchuk, O.M. Savchuk, L.I. Ostapchenko. Experimental modeling of first-degree chemically-induced esophageal burns in rats. Medical chemistry;2013. 15, № 4.P. 30-34.
  2. Karaman Ibrahim, Orhan Koç, Evaluation of 968 children with corrosive substance ingestion. Indian J Crit Care Med; 2015. 19(12). P. 714–718.
  3. Oztorun Cl., Demir S. The outcomes of becoming a pediatric burn center in Turkey. Ulus Travma Acil Cerrahi Derg; 2016. 22(1). P. 34.
  4. Samolenko G.E. Burns in children. Child Health; 2006. 1(1).
  5. Sukhomlyn T.A., Basarab Ya. Effect of pharmaceutical preparation "lipin" on indices of carbohydrate metabolism in burn disease Actual problems of modern medicine: Bulletin of the Ukrainian Medical Dental Academy; 2014. № 4 (48).
  6. Klimenko M.O. Netyuhaylo L.G. Burn disease (pathogenesis and treatment). 2009. 118 p.
  7. Hetuyuhaylo L. G Mechanisms of burn disease and justification of the drug "Kriohor" for its treatment: Author. Dis. on competition sciences. Dr. med degree. Sciences specials. 14.03.04 "Pathologic Physiology". Kharkiv, 2007. 34 p.
  8. Fistal E.Y., G.P. Kozinets, G.E Samoilenco and al. Combustiology. Kharkov; 2004. 184 p.
  9. SeniukO. F., GorovyI. F., PalamarL. A., KrulN. I.. Effects of melanin-glucancomplex, isolated from polypropofungin, on the lifespan of female icr mice Probl. aging and longevity; 2014. 23, № 1. P. 11–27
  10. KaziA., K.G. Daniel, D.M. Smith, N.B. Kumar, Q.P Dou. Inhibition of the proteasome activity, a novel mechanism associated with the tumor cell apoptosis-inducing ability of genistein. Biochem. Pharmacol; 2003. 66. P. 965–976.
  11. Bahrami R., M.H. Farzaei, R. Rahimi Medicinal plants and their natural components as future drugs for the treatment of burn wounds: An integrative review. Arch. Dermatol. Res; 2014. 306. P. 601–617.
  12. Yoo H.G., B.H. Lee, W. Kim, J.S. Lee, G.H. Kim, O.K. Chun, S.I. Koo, D.O. Kim Lithospermum erythrorhizon extract protects keratinocytes and fibroblasts against oxidative stress. J. Med. Food; 2014. 17. P. 1189–1196.
  13. Samoylenko A., J.A. Hossain, D. Mennerich, S. Kellokumpu, J.K. Hiltunen, T. Kietzmann Nutritional countermeasures targeting reactive oxygen species in cancer: From mechanisms to biomarkers and clinical evidence. Antioxid. Redox Signal; 2013. 19. P. 2157–2196.
  14. Liudanskas M., P. Viskelis, R. Raudonis, D. Kvirklys, N. Uselis, V. Janulis Phenolic composition and antioxidant activity of Malus domestica leaves. Sci. World J; 2014. P. 306217.
  15. Alov P., I. Tsakovska, I. Pajeva Computational studies of free radical-scavenging properties of phenolic compounds. Curr. Top. Med. Chem; 2015. 15. P. 85–104.
  16. Andjelković M., J. van Camp, B.de Meulenaer, G. Depaemelaere, C. Socaci, M. Verloo, Verhe R. Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. Food Chem; 2006. 98. P. 23–31.
  17. Chyzhanska N.V., O.I. Tsyryuk, T.V. Beregovaya. The level of cortisol in the blood of rats before and after stress action against the background of melanin. Visnik of problems of biology and medicine; 2007.1.P. 40-44.
  18. Brenner M. V.G. Hearing The protective role of melanin against UV damage in human skin. PhotochemPhotobio; 2008. Vol. 84(3).P. 539–549.
  19. Romanovskaya V.A., B. Tashirev, S.O. Shilin, N.A. Chornaia. Resistance to UV radiation of microorganisms isolated from Antarctic rock habitats. Mikrobiologichny Journal; 2010.72, №3.P. 8–14.
  20. Keypour S.-H. Riahi, M. Moradali, H. Rafati. Investigation of the antibacterial activity of a chloroform extract of Ling Zhi or Reishi medicinal mushroom, Ganoderma lucidum (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllophoromycetidae), from Iran. Int. J. Med. Mushrooms; 2008. 10, № 4. P. 345–349.
  21. Racca S., A. Spaccamiglio, P. Esculapio, G. Abbadessa, L. Cangemi, F. DiCarlo, et al. Effects of swim stress and alpha-MSH acute pre-treatment on brain 5-HT transporter and corticosterone receptor. Pharmacol Biochem Behav; 2005. 81(4). P. 894–900.
  22. Chornenka N.M., Ya.B. Raetska, O.M. Savchuk, E.O. Torgalo, T.V. Beregovaya, L.I. Ostapchenko. Correction Parameters of Endogenous Intoxication in Experimental Burn Disease at the Stage of Toxemia. RJPBCS 7(5), September – October; 2016. P.1042.
  23. Seniuk O., L. Gorovoj, V. Kovalev, et al. Anticancerogenic properties of melanin-glucan complex from higher fungi. Proc. 5th Internat. Med. Mushroom Con. (Nantong, China, 5th–8th September, 2009). Nantong; 2009. P. 142–149.
  24. D.V. Golyshev, T.M. Falalyeyeva, N.V. Chyzhanska, T.V. Beregovaya, L.I. Ostapchenko White blood count of rats under stress-induced stomach lesions and the prophylactic administration of melanin. Ukrainian Antarctic Journal; 2015. № 14. P. 114.
  25. Gokakin A. K., K. Deveci, A. Kurt, BC. Karakus, C. Duger. The protective effects of sildenafil in acute lung injury in a rat model of severe scald burn: A biochemical and histopathological study. Burns; 2013;V -39:P. 1193.
  26. Ibrahim M. Y., M. A. Abdalla Effects of alloxan-induced diabetes mellitus on blood metabolites and serum minerals and hormones in rabbits (*Lepus cuniculus*) in relation to starch supplementation and season. Advances in Biological Research; 2011. 5 (1). P.45-58.
  27. Ishchuk T.V., Ya.B. Raetska, O.M. Savchuk, L.I. Ostapchenko. Changes in blood protein composition under experimental chemical burns of esophageal development in rats. Biomedical Research and Therapy; 2015. 2(4). P. 241-249.
  28. De Ledinghen V., B. Le Bail, L. Rebouissoux et al. Liver stiffness measurement in children using FibroScan: feasibility study and comparison with Fibrotest, aspartate transaminase to platelets ratio index, and liver biopsy. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr; 2007. 45. P.443–450.
  29. Ishchuk T.V., Y.B. Rayetska, O.N. Savchuk. Changes in protein composition homogenate of experimental esophagus for esophageal burns in rats. The young scientist. 2015. № 4 (19).
  30. Yousef IM., El-Demerdash MM, Radwan FM. Sodium arsenite induced biochemical perturbations in rats: Ameliorating effect of curcumin. FoodChemToxicol; 2008. 48. P. 3506–11.
  31. Lysenko S. AA. Melnik, R.H Tserkovnyuk. Alkaline phosphatase activity as a marker rheumatological paraneoplastic syndrome in patients with lung cancer. Ukrainian Scientific Medical Youth Journal; 2012. № 4. P. 47.
  32. Amrani S., H. Harnafi, H. Bouanani Nel, M. Aziz, HS. Caïd, S. Manfredini, et al. Hypolipidaemic activity of aqueous *Ocimum basilicum* extract in acute hyperlipidaemia induced by triton WR-1339 in rats and its antioxidant property. Phytother Res; 2006. 20. P.1040-5.
  33. Klibet F., Boumendjel A., Khari M., El Feki A., Abdennour C., Messarah M. Oxidative stress-related liver dysfunction by sodium arsenite: Alleviation by Pistacia lentiscus oil. Pharm Biol; 2016. 54(2). P. 354.
  34. Ercan S., M. Nihat. The Effect of Pepper Gas (OC) on Some Biochemical Parameters in Rats. Kafkas Univ Vet Fak Derg; 2012. 18 (2). P.259-266.

Надійшла до редколегії 28.10.16

Н.Чорненська, асп., Я. Раецька, канд. біол. наук, О Савчук, д-р біол. наук, Л.Остапченко, д-р біол. наук  
Київський національний університет імені Тараса Шевченко, Київ, Україна

## БІОХІМІЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОЖОГОВОЙ БОЛЕЗНИ И ИХ КОРРЕКЦИЯ МЕЛАНИНОМ

При моделировании щелочного ожога пищевода 1 и 2 степени в половозрелых крыс наблюдалась нарушение различных систем метаболизма, введение меланина способствовало нормализации биохимических показателей. Было показано, что при ожоге пищевода происходило нарушение белкового (общий белок, альбумин), азотистого (креатинин, мочевина), углеводного (глюкоза) обменов, обмена липидов (холестерин), менялась активность ферментов (АлАТ, АсАТ, КК), нарушился водно-электролитный баланс (К+, На+, Cl-, Ca2+, Mg2+, фосфаты), в то время как, введение меланина способствовало нормализации данных показателей. Самой эффективной была доза 0,5 мг/кг и 1 мг/кг. Обнаруженные антитоксические свойства меланина, который может быть перспективным препаратом для нормализации метаболизма в пострадавших при ожоге пищевода и предупреждения их осложнений.

**Ключевые слова:** ожог пищевода, биохимические показатели, метаболизм, меланин.

N.Chornenka, PhD student., Ya. Rayetska, PhD. O. Savchuk, Dr. Sci., L.Ostapchenko, Dr. Sci.  
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

## BIOCHEMICAL CHANGES IN BLOOD SERUM OF RATS WITH EXPERIMENTAL BURN DISEASE AND THEIR CORRECTION MELANIN.

During modeling of esophageal alkali burns 1 and 2 degrees in immature rats were observed violations of various metabolic systems, melanin administration helped to normalize the biochemical parameters. It was shown that under the esophageal burns there occurred violations of protein (total protein, albumin), nitrogen metabolism (creatinine, urea) metabolism of carbohydrate (glucose) and lipids (cholesterol), changed the activity of enzymes (GOT, GPT, CC), violated fluid and electrolyte balance (K+, Na+, Cl-, Ca2+, Mg2+, phosphates), while the introduction of melanin contributed to the normalization of these indicators. The most effective dose were of 0.5 mg/kg and 1 mg/kg. There were found anti-toxic properties of melanin, which may be a promising drug for the normalization of metabolism in patients with burns of esophagus and prevent its complications.

**Keywords:** burn the esophagus, biochemical parameters, metabolism, melanin.

УДК 577.217.5

Н. Воробйова, асп., О. Корнелюк, чл.-кор. НАН України, д-р біол. наук, проф.  
 Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ,  
 Д. Ложко, мол. наук. співр.  
 Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

## СТАБІЛЬНІСТЬ РЕКОМБІНАНТНОГО БІЛКА AIMP1/p43 ЛЮДИНИ В КОМПЛЕКСІ З tРНК

**Досліджено взаємодію рекомбінантного білка AIMP1/p43 – компонента аміноацил-tРНК-синтетазного комплексу вищих евкаріот у комплексі з tРНК. Показано, що у складі комплексу температурна стабільність AIMP1/p43 суттєво підвищується. Локальний конформаційний перехід залишку Trp271 AIMP1/p43, пов'язаний з внутрішньомолекулярною стабільністю білка, спостерігається при 43°C, а у складі комплексу з tРНК – при 49°C. На основі даних спектрофлуориметричного титрування визначено величину константи дисоціації та стехіометрію комплексу AIMP1/p43 з tРНК. Отримано модель комплексу AIMP1/p43 з tРНК методом молекулярного докінгу.**

**Ключові слова:** AIMP1/p43, tРНК, стабілізація, флуоресцентна спектроскопія.

### Вступ.

Створення нових біомедичних препаратів на основі рекомбінантних білків – один з провідних напрямів сучасної біотехнології [1]. Експресія білків в *E.coli* є простим, швидким, недорогим і надійним методом, який дозволяє отримати рекомбінантні білки у препаративних кількостях в нативному стані, що є необхідною умовою для їх впровадження в біотехнологічне виробництво [6]. Однак, бактеріальні системи експресії мають ряд істотних недоліків, як наприклад, відсутність посттрансляційних модифікацій рекомбінантних білків та можлива висока агрегаційна здатність і формування тілець включення (inclusion bodies) внаслідок високого рівня експресії та неправильного фолдингу білків [5; 11].

Білок AIMP1/p43 (Aminoacyl-tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein 1, proEMAP II) є обов'язковим компонентом мультиаміноацил-tРНК-синтетазного комплексу вищих евкаріотів [17]. По-перше AIMP1/p43 виступає як кофактор аміноацілювання за рахунок своєї tРНК-зв'язуючої активності, по-друге AIMP1/p43 містить послідовність цитокіна EMAP II і ряд не досліджених до кінця властивостей, зокрема локалізацію білка AIMP1/p43 в клітинному ядрі [9; 12] та наявність у нього цитокінових активностей [8; 13], з огляду на що, можна віднести даний білок до молекулярних об'єктів, які є перспективними продуктами сучасної біотехнології.

У вільному стані AIMP1/p43 проявляє значну нестабільність у розчині, оскільки належить до природно неструктуртованих білків [4; 18]. Отже, пошук та вивчення впливу стабілізуючих агентів на структуру білка AIMP1/p43 є важливим етапом роботи для створення лікарських препаратів на основі цього білка.

На сьогоднішній день просторова структура повнорозмірного білка AIMP1/p43 (312 а.з.) не встановлена експериментально, кристалографічна структура визначена тільки для N-кінцевого фрагмента білка (7-70 а.з.), який представляє собою α-спіральну ділянку [7] та для С-кінцевого модуля (147-312 а.з.), який є цитокіном EMAP II [14]. Центральна ділянка (71-146 а.з.), яка з'єднує N-кінцевий та С-кінцевий модулі, є неструктурованою частиною білка з невідомою просторовою структурою. Для проведення структурних досліджень білка AIMP1/p43 методами рентгеноструктурної кристалографії та мультивимірної ЯМР-спектроскопії необхідні препаративні кількості білка у стабільному розчинному стані.

Відомо що AIMP1/p43 має tРНК зв'язуючи властивості [16], проте структурні аспекти взаємодії ізольованого AIMP1/p43 з tРНК залишаються ще недостатньо дослідженими, а роль tРНК у стабілізації структури білка невідома. Метою даної роботи було вивчення взаємодії AIMP1/p43 з tРНК методами флуоресцентної спектро-

скопії, характеристика параметрів зв'язування AIMP1/p43 з tРНК та аналіз РНК-зв'язувальної поверхні білка.

### Матеріали і методи

#### *Експресія, виділення та очистка рекомбінантного білка AIMP1/p43 з клітин *E.coli*.*

У роботі використано штам-продуцент рекомбінантних білків, отриманий на основі реципієнта *E.coli* BL21(DE3)pLysE. Клітини були трансформовані за загальноприйнятою методикою плазмідною конструкцією pET28b-p43, що містила ген, який кодує синтез цільового білка AIMP1/p43 під контролем промотора фага T7. Селективним маркером плазміди pET28b є ген kan, який забезпечує стійкість трансформованих клітин до антибіотика канаміцина.

Фізико-хімічні властивості білка AIMP1/p43 проаналізовано за допомогою сервера ProtParam (<http://expasy.org/tools/protparam.html>): молекулярна вага 35175.5 Да; ізоелектрична точка рІ = 8.62; коефіцієнт екстинції AIMP1/p43 при довжині хвилі 280 нм – 9970 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (0,29 мг/мл).

Штам-продуцент *E.coli* BL21(DE3)pLysE вирощували на середовищі Luria-Bertani (LB) з додаванням антибіотика канаміцина до кінцевої концентрації 30 мкг/мл. Культуру *E.coli* інкубували при температурі 37°C та інтенсивному струшуванні (250 об/хв.) до досягнення нею оптичної густини 0,5–0,7 опт.од. Оптичну густину (ОГ<sub>600</sub>) визначали спектрофотометрично (спектрофотометр BioMate-5, Велика Британія) при довжині хвилі 600 нм.

Для індукції синтезу рекомбінантного білка до культурального середовища додавали індуктор ІПТГ (ізо-пропіл-β-тіогалактопіранозид, Sigma, США) до кінцевої концентрації 1,0 ММ та інкубували культуру при 28°C протягом 4 годин після індукції експресії.

Рекомбінантний білок отримували із супернатанту лізованих клітин *E.coli* методом метал-хелатуючої хроматографії на колонці з Ni-NTA-агарозою (Qiagen, Germany). Аналіз бактеріальних білків проводили за допомогою SDS-гель-електрофорезу за методом Леммлі в денатуруючих умовах у 12% розділювальному гелі [10], використовуючи суміш маркерних білків виробництва Thermo Scientific (Литва). Гелі фарбували Coomassie blue R-250.

Концентрацію очищеного рекомбінантного білка AIMP1/p43 визначали спектрофотометрично, використовуючи коефіцієнти екстинції 9970 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (0,29 мг/мл) при довжині хвилі 280 нм.

#### **Методика флуоресцентних вимірювань.**

Для дослідження взаємодії рекомбінантного білка AIMP1/p43 з сумарною tРНК проводили титрування AIMP1/p43 у буфері, який містив 50ММ Na-фосфат, pH 7.5, 150ММ NaCl. Спектри флуоресценції реєструва-

ли на спектрофлуориметрі Hitachi M850 (Японія), обладнаному термостатованим кюветотримачем. Вимірювання проводили у кварцовій кюветі з довжиною оптичного шляху 1 см. Спектральна ширина щілин монохроматора при збудженні флуоресценції та її реєстрації становила 5–10 нм. Збудження флуоресценції проводили при 296 нм, реєстрацію флуоресценції – в діапазоні 300–400 нм під кутом 90° до напрямку пучка збуджуючого світла.

#### Молекулярний докінг

Молекулярний комплекс AIMP1/p43 з тРНК було отримано за допомогою програмного пакету HEX [15]. Візуалізацію та аналіз отриманих результатів проводили з використанням програмного забезпечення UCSF Chimera [3]. Для проведення молекулярного докінгу використовували модель просторові структури AIMP1/p43 та кристалічну структуру дріжджової тРНК<sup>Phe</sup> (PDB ID: 1EHZ).

#### Результати та їх обговорення

##### *Експресія, виділення та очистка рекомбінантного білка AIMP1/p43 з клітин E.coli.*

Білок AIMP1/p43 було експресовано в клітинах *E.coli* BL21(DE3)pLysE, як описано вище. Після проведення бактеріальної експресії здійснювали афінну очистку рекомбінантного білка AIMP1/p43 металхелатуючою хроматографією на Ni-NTA-агарозі. В результаті очистки отримано препарат білка AIMP1/p43 високого ступеня чистоти (блізько 95%, рис.1).

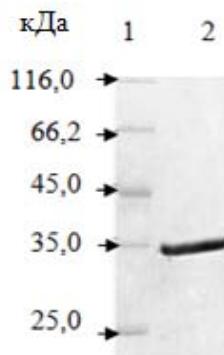


Рис. 1. Електрофоретичний контроль чистоти отриманого препарату AIMP1/p43  
1 – білкові маркери;  
2 – препарат AIMP1/p43 після хроматографічної очистки

##### *Дослідження взаємодії рекомбінантного білка AIMP1/p43 з тРНК методом флуоресцентної спектроскопії.*

Спектр власної триптофанової флуоресценції AIMP1/p43, обумовленої залишком Trp271, який локалізований в С-кінцевому EMAP II-домені, має максимум при 333 нм. Слід зазначити, що максимум флуоресценції AIMP1/p43 є дещо зміщеним в короткохвильову область у порівнянні зі спектром флуоресценції вільного EMAP II, який має максимум при 335 нм [2]. При вивчені взаємодії AIMP1/p43 з тРНК виявлено гасіння власної триптофанової флуоресценції білка AIMP1/p43 при підвищенні концентрації тРНК (рис.2). На основі отриманих даних розрахована константа дисоціації ( $K_d$ ) комплекса AIMP1/p43 з тРНК, яка становить  $1,82 \pm 0,15$  М. Стхеметрія зв'язування тРНК з AIMP1/p43 становить згідно даним близько 1:1, що підтверджує формування специфічного комплексу.

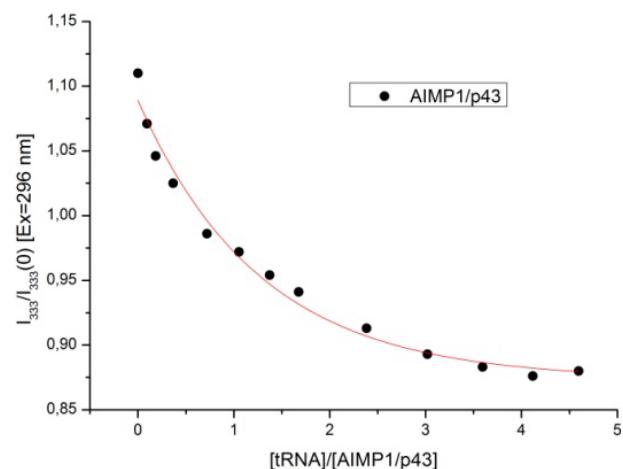


Рис. 2. Залежність інтенсивності флуоресценції AIMP1/p43 від концентрації тРНК в розчині.

Буфер 50 mM Na-фосфат, 150 mM NaCl, pH 7.5, температура 25°C;  $\lambda_{\text{Ex}} = 296$  нм,  $\lambda_{\text{Em}} = 333$  нм

При реєстрації спектрів флуоресценції AIMP1/p43 (рис. 4) в залежності від температури в діапазоні 23–63°C виявлено зсув максимуму флуоресценції від 333 до 350 нм (рис.3, 4а), що відповідає максимуму флуоресценції триптофану в денатурованих білках. Це обумовлено тим, що при підвищенні температури в молекулі AIMP1/p43 спостерігається локальний конформаційний перехід, пов'язаний з експонуванням залишку Trp271 на поверхні білка. Температура локального конформаційного переходу в AIMP1/p43 становить  $43 \pm 1$  °C (визначена як температура в точці напівпереходу між двома станами).

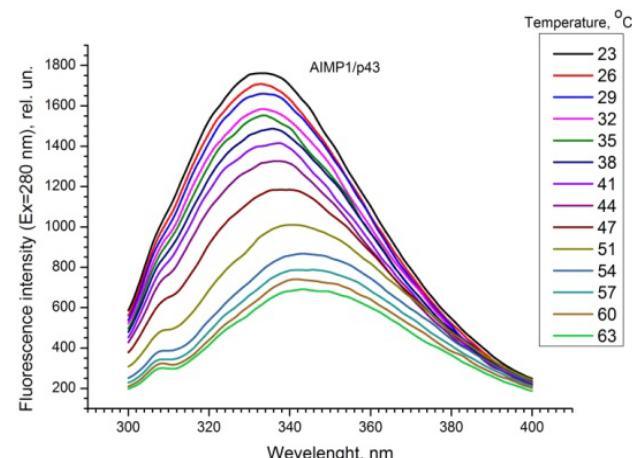


Рис. 3. Температурна залежність інтенсивності флуоресценції AIMP1/p43 в діапазоні 300–400 нм.  
Буфер 50 mM Na-фосфат, 150 mM NaCl, pH 7.5.  $\lambda_{\text{Ex}} = 280$  нм

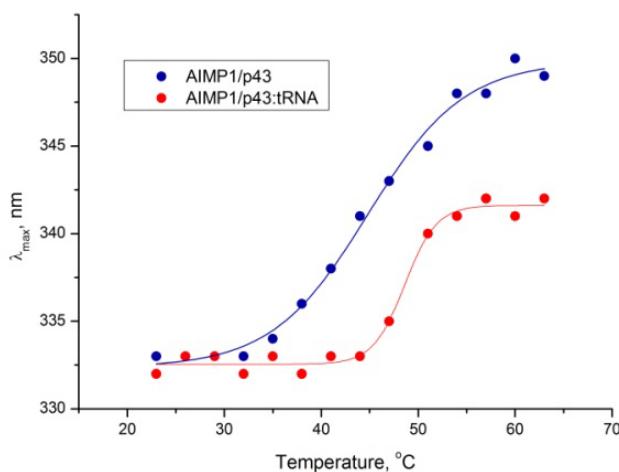


Рис.4. Температурна залежність максимума ємісії флуоресценції AIMp1/p43 у вільному стані(а) та в складі комплексу з тРНК(б). Буфер 50мМ Na-фосфат, 150мМ NaCl, рН 7.5

При дослідженні впливу тРНК на стабільність білкової глобули встановлено, що при підвищенні температури максимум емісії флуоресценції AIMp1/p43 зсувається лише до 342 нм, тоді як локальний конформаційний перехід в оточенні Trp271 спостерігається при  $49 \pm 1^{\circ}\text{C}$  (рис. 4б), що свідчить про стабілізацію структури AIMp1/p43 в отриманому комплексі з тРНК.

#### Молекулярний докінг.

Для вивчення взаємодії AIMp1/p43 з РНК, нами була використана тРНК<sup>Phe</sup> як модельна РНК, оскільки відомо, що AIMp1/p43 та його С-кінцевий модуль EMAP II мають широку специфічність відносно зв'язування різних тРНК. З метою виявлення потенційного тРНК зв'язуючого сайту на молекулярній поверхні AIMp1/p43 було проведено гнукий докінг в програмі HEx. Відомо що білок AIMp1/p43 існує у вигляді гомодимеру, причому кожна субодиниця складається з N- (MET1-GLU70) та C- (SER147-LYS312) кінцевих модулів, які з'єднані довгою гнукою неструктурованою ділянкою (ILE71-ASP146).

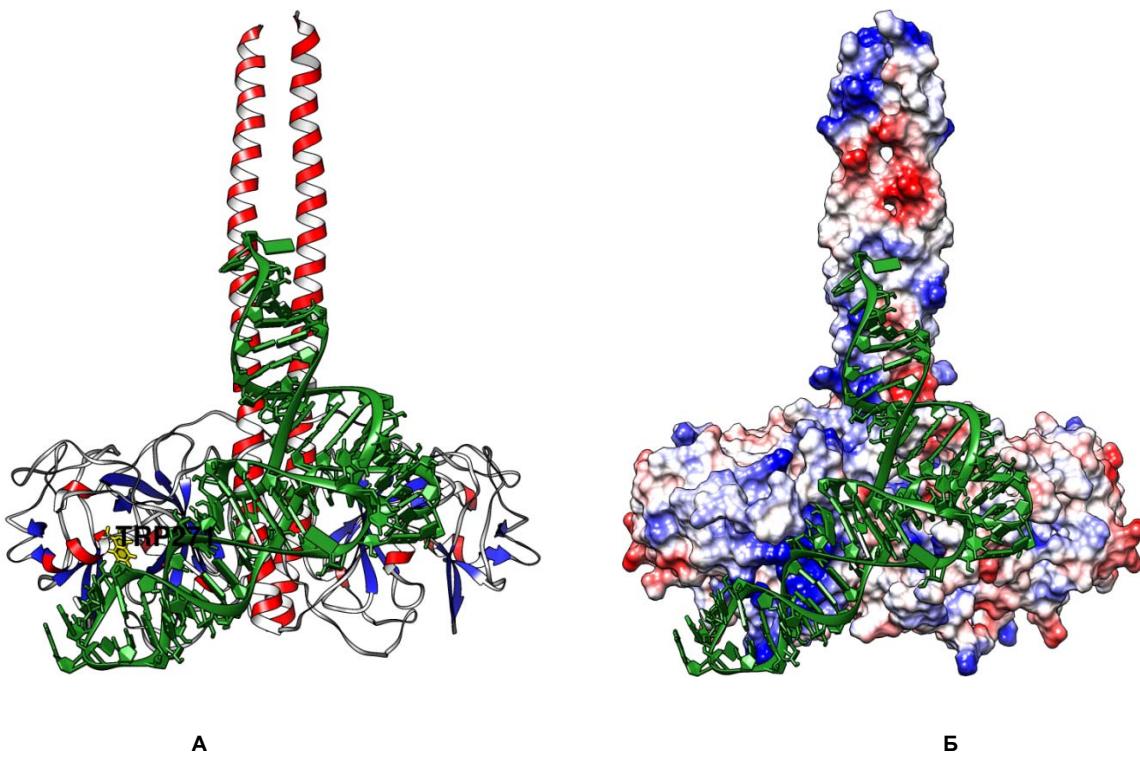


Рис.5. Молекулярний комплекс AIMp1/p43 з тРНК<sup>Phe</sup> (а), зеленим кольором позначена тРНК, жовтим – залишок Trp271(б) – молекулярна поверхня AIMp1/p43, забарвлена відповідно до електростатичного потенціалу

В результаті комп’ютерного моделювання докінгу AIMp1/p43 з тРНК<sup>Phe</sup> встановлено, що зв’язування тРНК відбувається з двома субодиницями білка: в N-модулі першої субодиниці з LEU31, LYS35 і в C-модулі з LYS124-GLY143 та ASN265-GLN273, а також в другій субодиниці з ділянкою PHE80-VAL105, яка належить до неструктурованого міжмодульного лінкера (рис. 5).

Слід зазначити, що ділянки LYS124-GLY143 та ASN265-GLN273 містять в послідовності значну кількість залишків лізина, що формують позитивно заряджені кластери, де локалізований ароматичний залишок Trp271. Очевидно, що такий позитивно заряджений кластер може приймати участь в електростатичних взаємодіях з негативно зарядженими молекулами тРНК. Формування комплексу між тРНК та AIMp1/p43 призводить до стабілізації білкової глобули за рахунок того, що нуклеїнова

кислота одночасно взаємодіє з N- та C- кінцевими модулями AIMp1/p43, а також, очевидно, стабілізує неструктуровані ділянки міжмодульного лінкера.

#### Висновки.

Встановлено, що тРНК специфічно зв’язується з двома субодиницями рекомбінантного білка AIMp1/p43 у розчині. Найбільш вірогідним сайтом зв’язування є ділянки LYS124-GLY143 та ASN265-GLN273, що містять значну кількість залишків лізина і формують позитивно заряджені кластери. Ароматичний залишок Trp271, частково експонований у заглибині на поверхні AIMp1/p43 поряд з функціонально важливим лізин-багатим кластером, також приймає участь у взаємодії з тРНК. Білок AIMp1/p43 у складі отриманого комплексу з тРНК в розчині є суттєво більш стабільним, ніж у вільному стані. Це відкриває можливості подальших структурно-

функціональних досліджень AIMPI/p43 та вивчення його взаємодії з tРНК, а також створення нових нанокомпозитних комплексів для застосування в біомедицині.

#### Список використаних джерел

- Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. / Б. Глик, Дж. Пастернак. М. : Из-во Мир, 2002. – 589 с.
- Кордиш М. О. Локальний конформаційний перехід флуорофора Trp125 в цитокіні EMAP II, індукований фізіологічною температурою / М.О. Кордиш, О.Л. Дубровський, О.І. Корнелюк // Фізика живого. – 2005. – Т. 13, №1. – С. 79-85.
- Chen V. B. UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis / V.B. Chen, E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G.S. Couch // J Comput Chem. – 2004. – Vol. 25, N 13. – P. 1605-1612.
- Dyson H. J. Intrinsically unstructured proteins and their functions / H. J. Dyson, P. E. Wright // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2005. – Vol. 6, N 3. – P. 197-208.
- Fink A. L. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid / A. L. Fink // Folding Dis. – 1998. – N 3. – P. R9-R23.
- Francis D. M. Strategies to optimize protein expression in E.coli / D. M. Francis, R. Page // Curr Protoc Protein Sci. – 2010. – N5. – P. 1-29.
- Fu Y. Structure of the ArgRS-GlnRS-AIMP1 complex and its implications for mammalian translation / Y. Fu, Y. Kim, K.S. Jin, H.S. Kim [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2014. – Vol. 111, N 42. – P. 15084-15089.
- Ivakhno S. S. Cytokine-like activities of some aminoacyl-tRNA synthetases and auxiliary p43 cofactor of aminoacylation reaction and their role in oncogenesis / S. S. Ivakhno, A. I. Kornelyuk // Exp. Oncol. – 2004. – Vol. 26, N 4. – P. 250-255.
- Ivanova Iu. L. Comparative study of localization of tryptophanyl-tRNA-synthetase and components of high molecular weight aminoacyl-tRNA-synthetase complex in animal cells / Iu. L. Ivanova, N. E. Cherni, V. I. Popenko, [et al.] // Mol. Biol. – 1993. – Vol. 27, N 3. – P. 666-684.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K Laemmli // Nature. – 1970. – Vol. 227, N 5259. – P. 680-685.
- Murphy R. M. Protein Misfolding and Aggregation / R. M. Murphy, B. S. Kendrick // Biotechnol. Prog. – 2007. – N 23. – P. 548-52.
- Popenko V. I. Compartmentalization of certain components of the protein synthesis apparatus in mammalian cells / V. I. Popenko, J. L. Ivanova, N. E. Cherny, V. V. Filonenko [et al.] // Eur. J. Cell. Biol. – 1994. – Vol. 65, N 1. – P. 60-69.
- Quevillon S. The p43 component of the mammalian multisynthetase complex is likely to be the precursor of the endothelial monocyte-activating polypeptide II cytokine / S. Quevillon, F. Agou, J-C. Robinson, M. Mirande // J. Biol. Chem. – 1997. – Vol. 272, N 51. – P. 32573-32579.
- Renault L. Structure of the EMAPII domain of human aminoacyl-tRNA synthetase complex reveals evolutionary dimer mimicry / L. Renault, P. Kerjan, S. Pasqualato, J. [et al.] // EMBO J. – 2001. – Vol. 20, N 3. – P. 570-578.
- Ritchie D.W. Evaluation of Protein Docking Predictions Using Hex 3.1 in CAPRI Rounds 1 and 2 / D.W. Ritchie // PROTEINS: Struct. Funct. Genet. – 2003. – N 52. – P. 98-106.
- Shalak V. The EMAPII cytokine is released from the mammalian multisynthetase complex after cleavage of its p43/proEMAPII component / V. Shalak, M. Kaminska, R. Mitznacht-Kraus [et al.] // J Biol Chem. – 2001. – Vol. 276, N 26. – P. 23769-23776.
- Wolfe C. L. Isolation and characterization of human nuclear and cytosolic multisynthetase complexes and the intracellular distribution of p43/EMAPII / C. L. Wolfe, J. A. Warrington, S. Davis, S. Green, M. T Norcum // Protein Sci. – 2003. – Vol. 12, N 10. – P. 2282-2290.
- Wright P. E. Ittrinsically unstructured proteins: Reassessing the protein structure-function paradigm / P. E. Wright, H. J. Dyson // J. Mol. Biol. – 1999. – Vol. 293, N 2. – P. 321-331.

#### Reference

- Glik B. [Molecular Biotechnology. Principles and application]. M. World: 2002. 589 p. Russian
- Kordysh MO, Dubrovskyy OL, Kornelyuk AI. [Local conformational transition of Trp125 fluorophore in cytokine EMAP II, induced by physiological temperature]. Physics of live. 2005; 13(1):79-85. Ukrainian
- Chen VB, Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. J Comput Chem. 2004;25(13):1605-1612.
- Dyson HJ, Wright PE. Intrinsically unstructured proteins and their functions. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2005;6(3): 197–208.
- Fink AL. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. Folding Dis. 1998;(3): R9-R23.
- Francis DM, Page R. Strategies to optimize protein expression in E.coli. Curr Protoc Protein Sci. 2010;5: 1-29.
- Fu Y, Kim Y, Jin KS, Kim HS, [et al.] Structure of the ArgRS-GlnRS-AIMP1 complex and its implications for mammalian translation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(42): 15084-9
- Ivakhno SS, Kornelyuk AI. Cytokine-like activities of some aminoacyl-tRNA synthetases and auxiliary p43 cofactor of aminoacylation reaction and their role in oncogenesis. Exp. Oncol. 2004;26(4): 250-5.
- Ivanova IuL, Cherni NE, Popenko VI, Filonenko VV, Vartanian OG. Comparative study of localization of tryptophanyl-tRNA-synthetase and components of high molecular weight aminoacyl-tRNA-synthetase complex in animal cells. Mol. Biol. 1993;27(3): 666-84.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227(5259): 680- 5.
- Murphy RM, Kendrick BS. Protein Misfolding and Aggregation. Biotechnol. Prog. 2007(23):548- 52.
- Popenko V I, Ivanova JL, Cherny NE, Filonenko V V, [et al.] Compartmentalization of certain components of the protein synthesis apparatus in mammalian cells. Eur. J. Cell. Biol. 1994;65(1): 60-9.
- Quevillon S, Agou F, Robinson J-C, Mirande M. The p43 component of the mammalian multi-synthetase complex is likely to be the precursor of the endothelial monocyte-activating polypeptide II cytokine. J. Biol. Chem. 1997;272(51): 32573-9.
- Renault L, Kerjan P, Pasqualato S, [et al.] Structure of the EMAPII domain of human aminoacyl-tRNA synthetase complex reveals evolutionary dimer mimicry. J. 2001;20(3): 570-8.
- Ritchie DW. Evaluation of Protein Docking Predictions Using Hex 3.1 in CAPRI Rounds 1 and 2. PROTEINS: Struct. Funct. Genet. 2003;52: 98-106.
- Shalak V, Kaminska M, Mitznacht-Kraus R [et al.] The EMAPII cytokine is released from the mammalian multisynthetase complex after cleavage of its p43/proEMAPII component. J. Biol. Chem. 2001; 276(26):23769-23776.
- Wolfe CL, Warrington JA, Davis S, Green S, Norcum MT. Isolation and characterization of human nuclear and cytosolic multisynthetase complexes and the intracellular distribution of p43/EMAPII. Protein Sci. 2003;12(10): 2282-90.
- Wright PE, Dyson HJ. Ittrinsically unstructured proteins: Reassessing the protein structure-function paradigm. J. Mol. Biol. 1999;293(2): 321-31.

Надійшла до редакції 27.10.16

**Н. Вороб'єва, асп., А. Корнелюк, чл.-кор. НАН України, д-р біол. наук, проф.  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,  
Д. Ложко, млад. наук. сотр.  
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, Україна**

#### СТАБІЛЬНОСТЬ РЕКОМБІНАНТНОГО БЕЛКА AIMPI/P43 ЧЕЛОВЕКА В КОМПЛЕКСЕ С ТРНК

Исследовано взаимодействие рекомбинантного белка AIMPI/p43 – компонента аминоацил-tРНК-синтетазного комплекса высших эукариот в комплексе с tРНК. Показано, что в составе комплекса температурная стабильность AIMPI/p43 существенно повышается. Локальный конформационный переход остатка Trp271 AIMPI/p43, связанный с внутримолекулярной стабильностью белка, наблюдается при 43°C, а в составе комплекса с tРНК – при 49°C. На основе данных спектрофлуориметрического титрования установлены величина константы диссоциации и stoichiometria комплекса AIMPI/p43 с tРНК. Получена модель комплекса AIMPI/p43 с tРНК методом молекулярного докинга.

**Ключевые слова:** AIMPI/p43, tРНК, стабилизация, флуоресцентная спектроскопия.

N. Vorobyova, PhD stud., A. Kornelyuk, professor, Dr. Sci., Corresponding Member of NASU  
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,  
D. Lozhko, research assistant  
Institute of Molecular Biology and Genetics of NASU, Kyiv, Ukraine

#### STABILITY OF HUMAN RECOMBINANT AIMPI/P43 PROTEIN IN THE COMPLEX WITH TRNA

The interaction of AIMPI/p43 recombinant protein, which is a component of aminoacyl-tRNA synthetase complex in higher eukaryotes, in the complex with tRNA was studied. It was shown that temperature stability of AIMPI/p43 is significantly increased in the complex. Local conformational transition of residue Trp271 of AIMPI/p43, which is associated with intramolecular protein stability, is observed at 43°C, but in a complex with tRNA it is observed at 49°C. Based on the data of spectrofluorimetric titration the value of the dissociation constant and the stoichiometry of the complex of AIMPI/p43 with tRNA were determined. The model of the complex of AIMPI/p43 with tRNA was obtained by the molecular docking method.

**Key words:** AIMPI/p43, tRNA, stabilization, fluorescence spectroscopy.

УДК 577.112.7:612.115

Т. Катрій, асп., О. Савчук, д-р біол. наук  
 Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ,  
 В. Шандюк, асп.  
 Національний медичний університет імені О.О.Богомольця, Київ,  
 В. Мельник, д-р мед. наук  
 Медична компанія "ILAYA", Київ

## ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОТРОМБІНОВОГО ПУЛУ У ПАЦІЄНТІВ ЯКІ ПЕРЕНЕСЛИ ІШЕМІЧНИЙ ІНСУЛЬТ

**Показано повернення до норми концентрації протромбінового пулу у пацієнтів які рік тому перенесли атеротромботичний та кардіоемболічний підтипи ішемічного інсульту. Виявлено присутність у плазмі крові білкових фракцій ідентичних фракціям здорових донорів у діапазоні молекулярних мас, що відповідають молекулам протромбіну, тромбіну, їх ковалентних комплексам з іншими білками та деградованих фрагментів.**

**Ключові слова:** протромбіновий пул, атеротромботичний та кардіоемболічний підтипи ішемічного інсульту.

**Вступ.** Відомо, що система гемостазу це збалансована взаємодія клітин крові, судинного ендотелію, плазмових білків та низькомолекулярних речовин. Згортання крові або збереження рідкого її стану – це прояв загальної закономірності, що забезпечує гомеостаз внутрішнього середовища організму, зокрема, підтримання агрегатного стану крові на такому рівні, який необхідний для нормальної життєдіяльності клітин, тканин і органів [1-3]. У системі гемостазу приймають участь фактори згортання, антикоагулянтної та фібринолітичної систем крові [4, 5]. Зміна функціонального стану однієї з систем супроводжується компенсаторними зрушеннями в діяльності іншої [3]. Порушення функціональних взаємо-зв'язків може привести до важких патологічних станів організму, що полягають або у підвищенні кровоточивості, або у внутрішньосудинному тромбоутворенні [4].

Детальне дослідження стану системи гемостазу у хворих з тромбозами показує, що у більшості випадків можна виявити та передбачити гіперкоагуляцію крові, зниження фібринолізу, антикоагулянтної активності крові, а також підвищення її в'язкості [6 – 8]. Існує чимало свідчень зв'язку між ферментами, які приймають участь у згортання крові і рівнем ризику артеріального тромбозу. Беручи до уваги безпосередню участь системи згортання крові у патогенезі ішемічного інсульту, метою нашого дослідження було визначити функціональний стан протромбіну, який є попередником ключово-го регулюючого ферменту тромбіну. Дослідження системи гемостазу має першочергове значення для діагностики різних типів кровотеч, тромбоемболічних синдромів, тромбофілічних станів і процесів ДВЗ крові, в тому числі при критичних станах [9]. Динамічний контроль за гемостазом необхідний також при проведенні антитромботичної терапії в процесі консервативного і хірургічного лікування серцево-судинних захворювань, ішемії та інфарктів органів, великого числа акушерських ускладнень і хвороб новонароджених [10]. Цей далеко неповний перелік патологічних станів, при яких контроль за станом системи гемостазу як в гострий період хвороби так і через певний час після перенесеного захворювання є надзвичайно важливим. У сучасних умовах не можуть вважатися повноцінними обстеження і лікування хворих без контролю за станом системи гемостазу.

Відомо, що гемостаз є однією з найскладніших фізіологічних систем організму, яка забезпечує підтримання крові в рідкому стані, підтримує реологічні властивості та здатна, у разі необхідності, швидко індукувати зупинку або зменшення кровотечі [17]. Гемостатичний дисбаланс неодмінно пов'язаний з впливом як внутрішніх, так і зовнішніх чинників які збільшують ризик кровотечі або тромбозу. Вивчення функціонального стану протромбінового пулу викликає значний інтерес через участь протромбіну не тільки в реалізації низки фізіологічних реакцій, а й за його причетністю до таких процесів, як регуляція судинного тонусу, загоєння ран, здійснення

імунних реакцій, розвитку запалення, утворення пухлини, атерогенезу хвороби Альцгеймера та інші [18-20].

Розвиток наших знань про фізіологію гемостазу має численні наслідки для терапії. Дефекти згортання крові можуть бути оцінені за допомогою специфічних тестів, що дає нам фору у безкінечній боротьбі організму з хворобами. Останнім часом почали з'являтися відомості про зв'язок факторів ризику розвитку ішемічного інсульту з утворенням антитіл, спрямованих проти протромбіну. Здатність цих антитіл знижувати функціональну активність білків-мішенні сприяє порушенням про- і антикоагулянтами балансу.

**Матеріали та методи.** Забір зразків. Для проведення дослідження було виконано клініко-лабораторне обстеження 114 хворих які 1 рік тому перенесли гострий ішемічний інсульт. В залежності від підтипу інсульту пацієнти відкритим методом були рандомізовані на дві групи: з атеротромботичним ішемічним інсультом (ATI)(n=57); та пацієнти з кардіоемболічним ішемічним інсультом (KEI) (n=57). Вік хворих на момент огляду складав в середньому  $73 \pm 8$  років. Хворі перебували на стаціонарному лікуванні у I та II неврологічних відділеннях Київської міської клінічної лікарні №4. Всі хворі або їх родичі були попереджені про проведення клінічного дослідження та давали письмову згоду на участь у ньому. Також у досліджені також взяли участь практично здорові доноси (n=35) без тромбоемболічних захворювань в анамнезі, які за статтю та віком відповідали обстеженим хворим.

Кров відбирали пункциєю ліктьової вени з 8 до 9 годин ранку, натщесерце, у пластикову пробірку з лімоннокислим натрієм (38 г/л) у кінцевому співвідношенні 9:1, та обережно перемішували (не струшуючи). Суміш центрифугували протягом 40 хв. за 2500 об/хв. переносили лабораторним дозатором у пластикову пробірку. Отриману плазму крові використовували для аналізу або заморожували за  $-20^{\circ}\text{C}$  у епендорфах порціями по 0,5 мл. Плазму розморожували прогріванням на водяній бані ( $37^{\circ}\text{C}$ ) не довше 15 хв., після чого розмішували перевертанням пробірки та негайно переміщували на лід. Завдяки такому способу розморожування зниження активності факторів зсідання крові не відбувалося [11].

**Виділення фракції вітамін K-залежних білків плазми крові.** До 1 мл плазми крові кожної патології додавали 30 мг BaSO<sub>4</sub> та перемішували протягом 1 години на льоду. Суміш центрифугували при 2,000g протягом 15 хв при кімнатній температурі. Елюючи вітамін

K-залежних білків плазми з осаду було зроблено шляхом додавання 50 мМ Tris-HCl, pH 7,4, що містить 200 мМ NaCl і 20 мМ ЕДТА [12].

Концентрація протромбінового пулу в плазмі вимірювали за допомогою стандартного твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA) [13, 14]. В лунки мікропланшет для ELISA вносили досліджувану плазму, попередньо розведену 10 -кратно з 50 мМ Tris-HCl, що

містить 130 мМ NaCl, pH 7,4 та інкубували протягом нічі при 4 ° С. Після промивання планшети блокували 5% знежиреного сухого молока в 50 мМ Тріс-HCl, що містить 130 мМ NaCl, pH 7,4 протягом 1 год при температурі 37 ° С після чого промивали повторно. Потім планшети інкубували протягом 1 год при 37 ° С з кролячими полікліональними антитілами проти протромбіну власного отримання. Планшети промивали і інкубували протягом 1 год при температурі 37 ° С з відповідними вторинними антитілами (Sigma, США), які були кон'юговані з пероксидазою хрону. Після промивання додавали субстрат (о-фенілендіамін та перекис водню). Планшети зчитували при 492 нм за допомогою мікропланшет-спектрофотометра (QuantTM, BioTek Instruments, Inc., США).

*Диск-електрофорез в системі Леммлі та Вестерн Блот.* Аліквоти об'ємом 50 мкл з кожної досліджуваної фракції вітамін К-залежних білків плазми розводили в 10 разів за допомогою буфера для зразків і у об'ємі 10 мкл наносили на 8% поліакриламідний гель [15, 16]. Гелі фарбували 0,125%-ним розчином Кумассі діамантовим блакитним G-250 в 25% ізопропанолу і 10% оцтової кислоти. Аналогічна процедура була проведена для подальшого перенесення розділених за молекулярними масами у гелі білків на нітроцелюлозну мембрани. Використовували первинні полікліональні антитіла до протромбіну у розведенні 1:2000 та відповідні вторинні антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрону у співвідношенні 1:1500. Візуалізували 3,3 '-діаміно-

бензідіном (ДАБ) субстрат у концентрації 5 мг/мл з додаванням 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Статистична обробка отриманих результатів проводили з використанням програмного забезпечення Statistica 7 і Origin 9.1. Значення вважалися достовірними при  $p < 0.05$ . Аналіз електрофореграмах проводили шляхом сканування комп'ютерної програми TotalLab 2.01.

### Результати.

У попередніх дослідженнях на даних хворих нами було показано наявність порушень системи гемостазу у гострому періоді ішемічного інсульту – спостерігалося підвищення концентрації протромбінового пулу в середньому у два рази порівняно з показником здорових доно-рів [12]. Однак залишається невивченим питання стану системи гемостазу через рік після перенесеного інсульту.

З метою уточнення характеристик системи зсідання крові, нами було досліджено загальний пул молекул протромбінового походження. Для досягнення даної мети, ми визначали концентрацію протромбінового пулу, а також охарактеризували його компонентний склад у фракціях отриманих з плазми крові хворих які 1 рік тому перенесли ATI чи KEI.

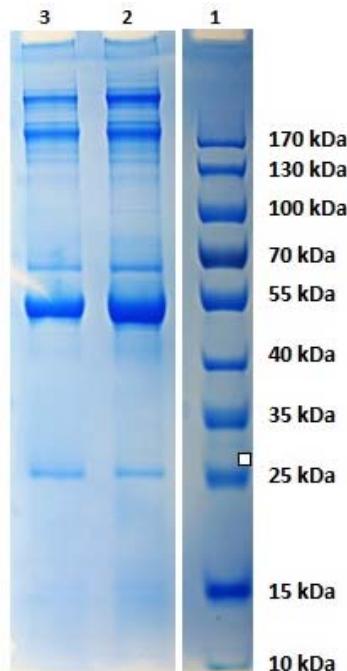
Через рік після інсульту для хворих які перенесли ATI концентрація протромбінового пулу в середньому становила  $0,47 \pm 0,08$  у.о./мл та для хворих після KEI всередньому дорівнювала  $0,43 \pm 0,08$  у.о./мл (Табл. 1.), тобто була в межах норми і відповідала показнику здорових доно-рів.

**Таблиця 1.** Концентрація протромбінового пулу у плазмі крові хворих, які 1 рік тому перенесли атеротромботичний чи кардіоемболічний ішемічний інсульт

Досліджувана група	Концентрація протромбінового пулу (умовні одиниці/мл)
Здорові доно-ри	$0,47 \pm 0,02$
Пацієнти з перенесеним ATI	$0,47 \pm 0,08$
Пацієнти з перенесеним KEI	$0,43 \pm 0,08$

На наступному етапі дослідження була проведена оцінка якісного складу фракції протромбінового пулу за допомогою вестерн blot аналізу. Для чого попередньо був проведений 8% Диск електрофорез в системі Леммлі (Рис. 1). Результати якого показали наявність білків

з молекулярними масами в діапазоні від 10 до 250 кДа у фракції вітамін К-залежних білків виділених з плазми крові хворих які перенесли ATI та KEI (Табл. 2.). Анало-гічні результати були отримані для здорових доно-рів.



**Рис. 1.** Типова електрофореграма фракції вітамін К-залежних білків плазми крові хворих з перенесеним атеротромботичним чи кардіоемболічним підтипами ішемічного інсульту.

1. Маркери. 2.Фракція отримана з плазми хворих після ATI. 3. Фракція отримана з плазми хворих після KEI

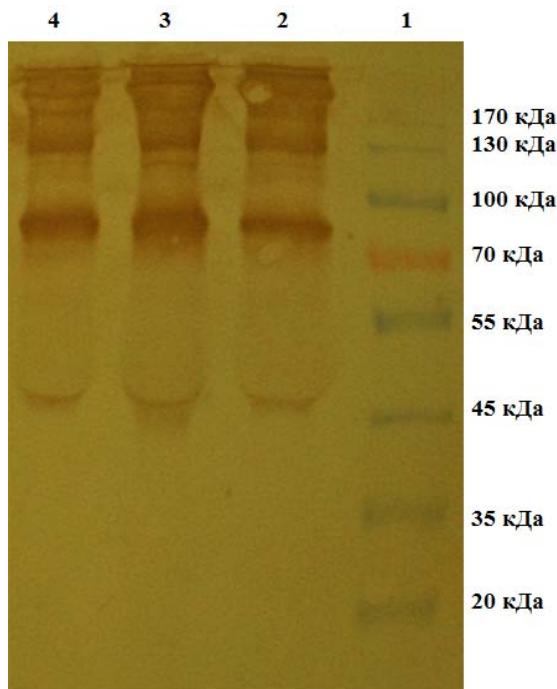
**Таблиця 2.** Білковий склад фракції вітамін К-залежних білків плазми крові хворих після ішемічного інсульту

Фракція пацієнтів з АТІ	Фракція пацієнтів з КЕІ
297	302
265	265
253	253
239	239
222	220
200	200
177	185
160	160
136	136
-	123
118	118
100	100
84	84
72	72
60	60
50	50
40	40
36	36
26	26
13	13
-	-

Використання полікліональних антитіл до протромбіну на етапі вестерн blottingу дозволило нам оцінити вміст не тільки безпосередньо протромбіну, а також молекул, що містять епітопи протромбінового походження, а саме проміжні продукти активації протромбіну, тромбіну, іх ковалентні комплекси з іншими білками та фрагменти їх деградованих молекул.

Вестерн-блот аналіз підтверджив наявність молекул протромбінового походження в усіх досліджуваних

фракціях в діапазоні від 30 до 250 кДа (Рис. 2.). Визначені молекулярні маси відповідають протромбіну, тромбіну, іх ковалентним комплексам та деградованим формам (Табл. 3.). Білок з молекулярною масою ~70 кДа відповідає молекулі протромбіну, ~37 кДа – тромбіну. В більшості ідентифіковані білки були аналогічними в усіх досліджуваних фракціях. Різниця між фракціями отриманими з плазми крові хворих ішемічним інсультом та здоровими донорами не була зафіксована.

**Рис. 2.** Блотограма протромбінового пулу плазми крові хворих з перенесеним ішемічним інсультом.

1. Маркери.
2. Фракція отримана з плазми здорових донорів.
3. Фракція отримана з плазми хворих після АТІ.
4. Фракція отримана з плазми хворих після КЕІ

**Таблиця 3. Білковий склад протромбінового пулу плазми крові здорових донорів та хворих з перенесеним ішемічним інсультом**

Фракція здорових донорів	Фракція пацієнтів з АІ	Фракція пацієнтів з КЕІ
240	239	239
220	220	220
200	200	200
160	160	160
136	136	136
118	118	118
84	84	84
75	75	75
50	50	50
40	40	40
35	37	37
-	-	-

Відомо, що генерація тромбіну може бути детектована накопиченням в плазмі N- кінцевої частини молекули протромбіну фрагмента F1 + 2 [21], молекулярна маса якої становить близько 40 кДа. Активація протромбіну може супроводжуватися накопиченням ряду проміжних продуктів, деякі яких характерна ферментативну активність (мезотромбін та мезотромбін 1) а також інші, які відносяться до функціонально неактивних похідних (претромбін 1, 2, фрагменти 1, 2, 1 + 2). Білкові фракції з молекулярною масою близько 50 кДа і 37 можуть складатися з претромбіну 1 і 2.. Відомо що їх поява в крові служить раннім маркером внутрішньо-судинного згортання крові [22]. Мезотромбін (молекулярна маса близько 70 кДа) є одним з перехідних проміжних продуктів, які утворюються в процесі перетворення протромбіну в тромбін в системах, під впливом комплексу утвореного фактором Xa і фактором Va, які збираються на фосфоліпідній мембрани. Наявність на блотограмі білків з молекулярною масою близько 118, 136, 170 кДа можуть бути результатом утворення протромбіну і його похідних комплексів по мірі прогресування ішемічного інсульту. Наприклад, поява в крові комплексів тромбін-антитромбін III (молекулярна маса яких близько 118 кДа) вважається як один з діагностичних критеріїв розвитку тромбозів. Інші літературні дані свідчать що білки в діапазоні 77 > 450 кДа можуть відповідати стабільним комплексам тромбіну з іншими білками плазми крові, які виділяються активованими тромбоцитами, та які не мають каталітичної активності.

**Висновки.** Було показано що через рік після перенесеного атеротромботичного та кардіоемболічного ішемічного інсульту кількісний та якісний склад протромбінового пулу повертається до рівня здорових донорів. Таким чином можемо стверджувати, що рівень протромбінового пулу у плазмі крові може розглядатись додатковим прогностичним чинником для моніторингу стану системи гемостазу при атеротромботичному та кардіоемболічному ішемічному інсульту.

#### Список використаних джерел

- Andrew J. Gale. Current Understanding of Hemostasis // Toxicol Pathol. – 2011. Vol. 39, N 1. – P.273–280.
- Bauer KA. Hypercoagulable States. Hematology Basic Principles and Practice.3. / Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Silberstein LE, McGlave P // Churchill Livingstone; New York. – 2000. – P.2009–2039.
- Versteeg HH. New fundamentals in hemostasis. / Heemskerk JW, Levi M, Reitsma PH. // Physiol Rev. – 2013. Vol. 93, N 1. – P.327-58.
- Kirchhofer D. Initiation of blood coagulation: the tissue factor/factor VIIa complex. / Nemerson Y. // Curr Opin Biotechnol. – 1996. Vol.7. – P.386–391.
- Sanjeev P. Overview of the coagulation system. / Saroa R, Palta A // Indian J Anaesth. – 2014. Vol. 58, N 5. – P.515–523.
- Clemetson KJ. Platelets and primary haemostasis. // Thromb Res. – 2012. Vol. 129, N 3. – P. 220-4.
- Aird WC. Endothelium and haemostasis. / Hamostaseologie. – 2015;35(1):11-6. doi: English.
- Mackie IJ, Bull HA. Normal haemostasis and its regulation. Blood Rev. 1989;3(4):237-50. English.
- Nahreen Tynngård, Tomas L Lindahl, Sofia Ramström Assays of different aspects of haemostasis – what do they measure? Thromb J. 2015; 13: 8. English.
- Johansson PI, Ostrowski SR, Secher NH. Management of major blood loss: an update. Acta Anaesthesiol Scand. 2010;54:1039–49. English.
- Токар А.В. Сучасні методи лабораторної діагностики внутрішньовенного мікрозідання крові (методичні рекомендації) / А.В. Токар, Е.М. Макогоненко, Т.М. Платонова – К.: Макком, 1994. – 22 с. Українська.

12. Raksha N, Burlova-Vasylieva M, Torgalo E, Savchuk O. The appearance of molecules of prothrombin origin in blood upon development of atherothrombotic and cardioembolic ischemic stroke. Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv, series Biology. 2014;3(68): 57-60. English.
13. Hockfield S, Carlson S, Evans C. Selected methods for antibody and nucleic acid probes. 1993;4(1):679. English.
14. Kemeny M. A Practical Guide to ELISA. 1991 NY: Pergamon Press. English.
15. Cleveland D, Fischer S, Kirschner M, Laemmli UK. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. Journal of Biological Chemistry. 1977; 252(3):1102-1106. English.
16. Weber K, Osborn M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. The Journal of Biological Chemistry. 1969;244(16):4406-4412. English.
17. Stassen J, Arnout J, Deckmyn H. The hemostatic system. Curr.Med.Chem. 2004;11(17) 2245-2260. English.
18. M.Aleman, B.Walton, J.Byrnes (at al.) Elevated prothrombin promotes venous, but not arterial, thrombosis in mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013 Aug; 33(8): 1829-1836. English.
19. Wolberg AS, Monroe DM, Roberts HR, Hoffman M. Elevated prothrombin results in clots with an altered fiber structure: a possible mechanism of the increased thrombotic risk. Blood. 2003;101:3008-3013. English.
20. Castoldi E, Simioni P, Tormene D, Thomassen MC, Spiezia L, Gavasso S, Rosing J. Differential effects of high prothrombin levels on thrombin generation depending on the cause of the hyperprothrombinemia. J Thromb Haemost.2007;5:971-979. English.
21. Juutistenaho S, Vahtera E, Aranko K, et al. Prothrombin activation fragment 1+2 as a marker of coagulation activation in cord blood collection for banking. Transfus. Med. – 2010;20 (4):250–257. English.
22. Volkov G, Platonov T, Savchuk O, Krasruff E, Chernyshenko T, Gornitskaya O. Modern views on the haemostasis system. 2005. Naukova Dumka, Ukr. Русский.

Надійшла до редколегії 14.09.16

Т. Катрий, асп., А. Савчук, д-р бiol. наук  
 Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,  
 В. Шандюк, асп.  
 Національний медичинський університет імені О.О.Богомольца, Київ, Україна,  
 В. Мельник, д-р мед. наук  
 Медичинська компанія "ILAYA", Київ, Україна

## ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОТРОМБИНОВОГО ПУЛА У БОЛЬНЫХ ПЕРЕНЕСШИХ ИШЕМИЧЕСКИЙ ИНСУЛЬТ

Показано возвращение к норме концентрации пептидного пула у больных которые год назад перенесли атеротромботический или кардиоэмболический подтипы ишемического инсульта. Выявлено присутствие в плазме крови белковых фракций идентичных фракциям здоровых доноров в диапазоне молекулярных масс, соответствующих молекулам протромбина, тромбина, их ковалентных комплексов с другими белками и деградированных фрагментов.

**Ключевые слова:** протромбиноный пул, атеротромботический и кардиоэмболический подтипы ишемический инсульта.

T.Katrii PhD-student, O. Savchuk DSc.  
 Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,  
 V. Shandyuk PhD-student  
 Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine,  
 V. Melnyk DSc  
 Medical company "ILAYA", Kyiv, Ukraine

## CHARACTERISTICS OF POOL PROTHROMBIN IN PATIENTS WITH ISCHEMIC STROKE

The normal level of prothrombin pool concentration at the blood plasma for the people who one year past had a acute atherothrombotic or cardioembolic ischemic stroke was shown. Identified plasma proteins at the post stroke fractions were identical to the healthy donor's fraction. Was proved the tested fraction included the proteins in a range of molecular weights corresponding to molecules of prothrombin, thrombin, their covalent complexes with other proteins and degraded fragments.

**Key words:** prothrombin pool, atherothrombotic or cardioembolic ischemic stroke.

УДК 577.12+616.379+616.831

Т. Царенко, асп., Л. Гайда, канд. бiol. наук, О. Кравченко, канд. бiol. наук  
 Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

## ПОКАЗНИКИ ЕНДОТОКСЕМІЇ ПАЦІЄНТІВ ІЗ ІШЕМІЧНИМ ІНСУЛЬТОМ ТА ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ ДРУГОГО ТИПУ

Одним із загальнозвизнаних чинників гострих порушень мозкового кровопостачання є цукровий діабет. Численні дослідження показали, що у патогенезі діабетичних церебральних порушень бере участь багато факторів, найбільш важливими з яких є метаболічні зміни, зокрема хронічна ендотоксикація. Метою дослідження було визначити біохімічні особливості білкового обміну та рівень ендотоксемії в крові пацієнтів за умов ішемічного інсульту у складеного цукровим діабетом 2 типу в порівнянні з інсультом. Крім того визначалися загально клінічні показники: стать, середній вік пацієнтів, індекс маси тіла (IMT), вміст глюкози у крові, ліпопротеїни, наявність ускладнень та показники проявів інсульту (NIHSS й Barthel індекс). В результаті проведених досліджень було встановлено, що ішемічний інсульт, зокрема ускладнений інсуліннезалежним діабетом характеризується гіпопротеїнемією на фоні відсутності виражених змін концентрації альбуміну. Вміст молекул середньої маси (MCM) та олігопептидів вказуває на наявність ендогенної інтоксикації, рівень якої не залежав від гіперглікемії і перевищував контрольні величини в середньому в 1,5 рази. Отримані результати дозволили встановити також сумісні відмінності значення IMT, гіперліпопротеїнемію та посилення проявів гострого порушення мозкового кровопостачання за NIHSS у групі пацієнтів з ішемічним інсультом, що супроводжується цукровим діабетом 2 типу. Отже, розвиток ішемічного інсульту, як за умов діабету другого типу, так і без нього, характеризується зростанням показників ендотоксикації (молекул середньої маси та олігопептидів) в крові пацієнтів, що в сукупності з гіпопротеїнемією та гіперліпідемією може зумовлювати вторинні патобіохімічні зміни в клітинах головного мозку та олосередковувати негативні наслідки розвитку гострого порушення церебрального кровопостачання.

**Ключові слова:** ішемічний інсульт, цукровий діабет II типу, молекули середньої маси, олігопептиди, ендотоксикація, індекс маси тіла.

Однією з характерних рис останніх десятиріч став масштабний ріст так званих хронічних неінфекційних захворювань, притаманний в першу чергу населенню розвинених та відносно благополучних країн. До цієї групи захворювань, що утримують провідні позиції се-

ред причин смертності та істотно погіршують якість життя на рівні популяції, належать церебро-васкулярні та серцево-судинні патології, запальні та онкологічні процеси, діабет, алергійні прояви та ін.

Не дивлячись на виражену неоднорідність вищезазначених захворювань, їх різну етіологію та механізми розвитку, для кожного з них на певному етапі притаманне формування проявів ендогенної інтоксикації. Ендогенною (чи метаболічною) інтоксикацією називайуть зумовлений деструктивними процесами стан, що призводить до накопичення в рідинах та тканинах організму підвищених, нефізіологічних кількостей проміжних та кінцевих продуктів нормального обміну речовин, а також продуктів зміненого метаболізму сполучної тканини та компонентів деградації її нормальних структур, що зумовлюють токсичний вплив та дисфункцію різних органів і систем [5].

Найбільш перспективними для поглиблена вивчення ендогенної інтоксикації в якості маркерів на даний момент вважають молекули середньої маси (MCM). Це – речовини різної природи з молекулярною масою 500-5000 Да, до яких також належать середньомолекулярні пептиди (СМП). Тобто, показник рівня MCM є біохімічним маркером, який відображає рівень патологічних змін головним чином білкового метаболізму. Вони поділяються на дві групи – речовини середньої молекулярної маси та олігопептиди [9]. Перша група являє собою небілкові похідні різної природи, що накопичуються в організмі в концентраціях, які перевищують норму; друга група – олігопептиди, представлена речовинами пептидної природи, які виконують регуляторні і нерегуляторні функції.

Загальновідомо, що рівень MCM варіює залежно від метаболічного стану організму та, слугує прогностичним критерієм порушення обмінних процесів організму. Спільно з низькомолекулярними (300-500 Да), високомолекулярними (понад 10 кДа) та надмолекулярними (тисячі кДа) токсинами MCM формують цілий пул пептидних та білкових фрагментів, утворюваних за надмірної активації протеолітичних ензимів крові на фоні недостатньої екскреторної функції нирок [6]. Молекули середньої маси мають пряму мембранотоксичну дію та ініціюють появу пептидів, близьких за структурою до біорегуляторів, яким притаманна висока біологічна активність. Серед молекул середньої маси виділяють гепатоцеребральні, уремічні, ішемічні, опікові, в залежності від патології, які вони супроводжують. Вважають, що значне підвищення вмісту молекул середньої маси у крові при різних видах патології є прогностично несприятливим показником, тому що продукти деградації біополімерів можуть чинити виражений нейротоксичний вплив на структури головного мозку [8], вони також порушують фізико-хімічні властивості клітинних мембран і роблять їх більш доступними для різних шкідливих впливів [5].

Слід додати, що накопичення MCM є не лише маркером ендотоксики, але і фактором, який посилює патологічний перебіг захворювання – набуваючи властивостей вторинних токсинів, вони спричиняють розлади функціонування гематоенцефалічного бар'єру, мікроциркуляційного русла, інгібують мітохондріальні процеси окиснення, порушують транспорт амінокислот. Виявлено майже повне роз'єднання окиснення та фосфорилювання, порушення механізмів регуляції інтенсивності дихання аденіловими нуклеотидами під впливом MCM. Одним із можливих механізмів нейротоксичного впливу MCM вважають інгібування механізмів активного транспорту іонів натрію та калію через мембрани клітинних елементів тканин ЦНС [7]. Подібні результати узгоджуються з іншими літературними даними, за якими виявлено зростання концентрації MCM у період первинного ішемічного інсульту, яке при цьому корелювало з клінічним перебіgom захворювання [8]. Важливу роль зростання концентрації молекули середніх масс відіграє

також за умов таких патологій, як метаболічний синдром [1]. Поруч із тим, спостерігається відсутність вичерпних досліджень ролі показників ендогенної інтоксикації в умовах розвитку ішемічного інсульту при цукровому діабеті другого типу. Відтак, метою даної роботи було визначити вплив наявності діабету другого типу на вміст молекул середніх мас, олігопептидів, загального білку та альбуміну в крові пацієнтів за умов розвитку ішемічного інсульту.

**Матеріали та методи.** Забір крові для біохімічних досліджень здійснювали одразу після надходження хворих до Неврологічного відділення Київської міської лікарні №4. Діагностування ішемічного інсульту виконували загальновизнаними методами із застосуванням комп'ютерної та/або магнітно-резонансної томографії. Цукровий діабет виявляли за наявністю гіперглікемії та попереднім анамнезом. Таким чином було відібрано 56 пацієнтів з ішемічним інсультом, у 21 з них діагностувався цукровий діабет другого типу та отримано від них, чи їх родичів, письмову згоду на проведення досліджень.

В якості контролю застосовували показники 25 відносно здорових донорів віком 35-62 років.

Оцінку досліджуваних показників здійснювали стандартними клініко-діагностичними методами: загальний білок та альбумін визначали за допомогою біохімічного аналізатора Humalyser 3000 з використанням відповідних комерційних тест-наборів, вміст глюкози визначали глюкозооксидазним методом. Концентрацію MCM та олігопептидів визначали за модифікованим методом Габриелян I. [2]. Метод базується на осадженні високомолекулярних пептидів і білків біологічних рідин з використанням трихлороцтової кислоти і кількісним визначенням в отриманому після центрифугування супернатанті середньомолекулярних пептидів за поглинанням в монохромному потоці світла при довжині хвилі 254 нм. Результати дослідження вмісту MCM у сироватці крові виражали в умовних одиницях оптичної щільноти.

Індекс маси тіла (IMT) розраховували з використанням загальноприйнятої формули:  $I=m/h^2$ , де  $m$ -маса тіла в кг,  $h$  – зріст в м. Крім цього, оцінювали такі загально-клінічні параметри пацієнтів з ішемічним інсультом та діабетом, як вік, стать, наявність гіпертензії, гіперліпідемії, ішемічної хвороби серця та захворювань периферійних артерій, а також індекс Barthel й базовий рівень за шкалою оцінки важкості інсульту NIHSS (National Institutes of Health Stroke Scale).

Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою програми StatSoftStatistica version 7.0 для Windows, аналіз на параметричність – із застосуванням тесту Шапіро-Уілка. Числові дані представлені вигляді середнього значення із стандартним відхиленням ( $M \pm SD$ ) або зі стандартною похибкою ( $M \pm SE$ ). Достовірність різниці вмісту загально білку, альбуміну, MCM, олігопептидів, глюкози та загальноклінічних параметрів між групами пацієнтів визначали із застосуванням Манн-Уїтні U тесту. Для оцінки статистично значущої різниці між пацієнтами з ішемічним інсультом та пацієнтами з інсультом на фоні цукрового діабету відповідні показники були ранговані. Частоти зустріваності та проценти розраховані для всіх категоріальних змінних і значення відмінності розраховано за критерієм узгодження Пірсона

**Результати та їх обговорення.** Основні результати загальноклінічних досліджень представлені в Таблиці 1, з якої видно, що не виявлено статистично значущих відмінностей між пацієнтами з ішемічним інсультом та цукровим діабетом другого типу (ІІ+ЦД) і без останнього (ІІ) за такими параметрами, як стать та вік виникнення аполексії, а також наявність гіпертензії та ішемічної хвороби серця. Зокрема, середній вік проявів інсульту становить

$76,2 \pm 10,9$  років, а за наявності діабету – близько 74, при цьому чоловіків і жінок було порівну при інсульті, а супут-

на гіперглікемія призводила до зростання кількості жінок до 62% серед пацієнтів з ішемічним інсультом.

**Таблиця 1. Загальноклінічні показники пацієнтів з ішемічним інсультом (II) та інсультом на фоні цукрового діабету другого типу (II+ЦД)**

	II (n=35)	II+ЦД (n=21)	p
Вік, роки (M±SD)	$76,2 \pm 10,9$	$73,8 \pm 9,7$	0,503
Стать, чоловіки, n (%)	18(51)	8 (38)	0,214
Гіпертензія, n (%)	25 (71)	16 (76)	0,537
Гіперліпідемія, n (%)	11 (31)	10 (48)	<0,001 <sup>†</sup>
Ішемічна хвороба серця, n (%)	10 (29)	7 (33)	0,120
Ангіопатія периферійних судин, n (%)	3 (9)	4 (19)	<0,001 <sup>†</sup>
Індекс маси тіла, kg / m <sup>2</sup>	$20,26 \pm 1,6$	$34,01 \pm 5,48$	0,023 <sup>†</sup>
Рівень NIHSS (M±SE)	$9,9 \pm 0,5$	$12,2 \pm 1,0$	0,030 <sup>†</sup>
Індекс Barthel на 7 день (M±SE)	$66,4 \pm 2,6$	$57,3 \pm 5,9$	0,117

<sup>†</sup> – p≤0,05, по відношенню до показників пацієнтів з ішемічним інсультом;

Показано, що пацієнтам з ішемічним інсультом ускладненим цукровим діабетом другого типу притаманна дисліпідемія, ангіопатія периферійних судин, зростання IMT та більш виражені неврологічні прояви інсульту за NIHSS в порівнянні з пацієнтами, які страждають виключно на ішемічний інсульт. При цьому значення індексу маси тіла у осіб з цукровим діабетом становило  $34,01 \text{ кг}/\text{м}^2$ , що за даними ВООЗ відповідає стану ожиріння першого ступеня.

Оскільки до групи пацієнтів з II+ЦД входили особи із середнім показником вмісту глукози в крові  $9,47 \pm 2,65$  мМоль та, беручи до уваги виявлену гіперліпідемію, актуальності набуває дослідження показників вмісту білків у сироватці крові пацієнтів з госторю фазою ішемічного інсульту на фоні цукрового діабету та без нього.

В результаті проведених досліджень виявлено суттєве зниження вмісту загального білку в крові пацієнтів в гострій фазі порушення мозкового кровообігу (Табл.2). Причому більш виражені відхилення від норми спостерігалися у хворих з II, всі пацієнти (100%) цієї групи характеризувались показниками нижчими за мінімальні значення контрольних величин. В той час, як серед осіб з цукровим діабетом при ішемічному інсульті кількість осіб із зниженням вмістом білка становила лише 60%. Вміст альбуміну як у пацієнтів з II, так і у осіб з II+ЦД мав тенденцію до зниження, однак не таку виражену як загальний білок.

Оскільки було зафіксоване зниження вмісту протеїнів в крові пацієнтів з ішемічним інсультом, є підстави передбачити надмірну активацію протеолітичних ензимів та розвиток ендотоксикації, показниками якої є вміст MCM та олігопептидів.

**Таблиця 2. Концентрація білку та показники ендотексемії (MCM, олігопептиди) в крові пацієнтів з ішемічним інсультом та інсультом на фоні цукрового діабету другого типу**

	ІНСУЛЬТ		ІНСУЛЬТ+ДІАБЕТ	
	Абсолютне середнє значення (M±SE)	Відсоток пацієнтів з відповідними показниками	Абсолютне середнє значення (M± SE)	Відсоток пацієнтів з відповідними показниками
Білок загальний, [г/л]	<b>56,82±1,18*</b>	<65	Контроль, 65-85	<b>62,84±1,59</b>
		100%	0	
Альбумін, [г/л]	<b>33,86±0,69</b>	<35	Контроль, 35-50	<b>32,90±0,84</b>
		90%	10%	
MCM, [у.од.]	<b>0,96±0,07*</b>	Контроль, 0,26-0,60	>0,60	<b>0,84±0,03*</b>
		15%	85%	
Олігопептиди, [мг/мл]	<b>0,34±0,05*</b>	Контроль, 0,04-0,25	>0,25	<b>0,42±0,07*</b>
		47%	53%	

\* – p≤0,05, по відношенню до показників відносно здорових дононів;

† – p≤0,05, по відношенню до показників пацієнтів з ішемічним інсультом.

Відтак, встановлено зростання вмісту молекул середньої маси та олігопептидів, як за умов ішемічного інсульту окремо в 1,6 рази для MCM та 1,4 рази – для олігопептидів порівняно з верхнею межею контрольних величин, так і при інсульті на фоні цукрового діабету (в 1,4 та 1,7 разів, відповідно). Не дивлячись, на більше накопичення MCM за умов II статистичної різниці при порівнянні цих показників з даними II+ЦД виявити не вдалося. Зростання вищезазначеного показника було також показано Нікольською В.А. при гістостанному цукровому діабеті та Єлєєвою М.А. при різних формах інсульту. Причому автори виявили закономірне зростання MCM з максимальними значеннями за умов високих клінічних проявів у хворих з гострим порушенням мозкового кровообігу, поступове зниження їх рівня з пара-

лельною позитивною динамікою захворювання та нормалізацією досліджуваного показника в період пізньої реконвалесценції [4].

Слід зазначити, що в групу MCM входять, головним чином, речовини небілкової природи: проміжні метаболіти, продукти аномального обміну, токсичні компоненти порожнинних середовищ організму – альдегіди, кетони, багатоатомні спирти, карбонові та жирні кислоти, олігосахариди, аміноцикли, глукuronові кислоти, фосфоліпіди та їх похідні, деякі вітаміни й інші речовини, що накопичуються в надмірних кількостях і є токсичними тільки у значно збільшених концентраціях. Відтак, можна передбачити, що наявність діабету – хронічного процесу, який сам призводить до змін метаболізму і формування аномальних кількостей певних проміжних продуктів обміну,

при розвитку гострої форми ішемії мозку зумовлює не таке виражене зростання молекул ендотоксемії небілкової природи як інсульт, що розвивається на фоні метаболізму незміненою постійною гіперглікемією та інсульнорезистентності. Поруч із цим показано більш виражене зростання вмісту олігопептидів саме за умов ішемічного інсульту при цукровому діабеті (Табл.2).

Основним джерелом утворення середньомолекулярних пептидів вважають посилення протеолізу, зокрема, білків крові (фібриногену, альбуміну, тромбіну), в результаті якого утворюються продукти з високою функціональною активністю. Наприклад, встановлено можливість виділення серед них пептидів близьких до відомих біорегуляторів ангіотезину та енкефалінів. Деякі з них інгібують еритропоез, пригнічують продукування гемоглобіну, що за умов ішемії є надзвичайно негативним фактором, інші гальмують глуконеогенез і синтез ДНК, справляють цитотоксичну дію, порушуючи проникність клітинних мембрани та змінюючи трансмембраний транспорт, основний механізм функціонування нейронів, зокрема мозку. Вважають також, що значне підвищення вмісту молекул середньої маси у крові при різних видах патології є прогностично несприятливим показником, тому що продукти деградації біополімерів можуть чинити виражений нейротоксичний вплив на структури головного мозку [3].

Таким чином, розвиток ішемічного інсульту, як за умов діабету другого типу, так і без нього, характеризується зростанням показників ендотоксикації (молекул середньої маси та олігопептидів) в крові пацієнтів, що в сукупності з гіпопротеїнемією та гіперліпідемією може зумовлювати вторинні патобіохімічні зміни в клітинах головного мозку та опосередковувати негативні наслідки розвитку гострого порушення церебрального кровопостачання.

#### Список використаних джерел

1. Ведунова М.В. Состояние эндогенной интоксикации при метаболическом синдроме и его коррекции низкими дозами озона / Ведунова М.В. // Автореф. дис. на соиск. степени канд. биол. наук. – 2008. – 27с.
2. Габриелян Н. И. Скрининговый метод определения средних молекул в биологических жидкостях / Габриелян Н.И., Левицкий П.А., Левицкий Э.Р., Дмитриев Ф.Ф. // Методические рекомендации. – М., 1985. – С. 11.
3. Гунас И.В. Динаміка змін рівня ендогенної інтоксикації в організмі щурів протягом місяця після опіку шкіри II-III ступеня, площею 21-23 % поверхні тіла та її корекція інфузійними розчинами лактотропіну з сорбітом та haes-Ix-5% / Гунас И.В., Кондрацький Б.О., Нурметова И.К., Дзевульська И.В., Ковальчук О.І., Черкасов Е.В., Бебешко Н.П., Булько И.В., Вітрук Т.К., та ін. // Український морфологічний альманах. – 2012. – Том 10, № 4. – С. 29-34.
4. Елеєва М.А.-К. Состояние прооксидантной системы крови и уровень молекул средней массы у больных с инсультом / Елеєва М.А.-К. // Вестник новых медицинских технологий – 2013 – N 1. – 17-22.

Т. Царенко, асп., Л.Гайда, канд. бiol. наук, О. Кравченко, канд. бiol. наук  
Київський національний університет імені Тараса Шевченко, Київ, Україна

#### ПОКАЗАТЕЛИ ЭНДОТОКСЕМИИ ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКИМ ИНСУЛЬТОМ И САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ ВТОРОГО ТИПА

Одним из общепринятых факторов, сопровождающих нарушения мозгового кровообращения является сахарный диабет. Многочисленные исследования позволили установить, что в патогенезе диабетических церебральных нарушений задействовано множество элементов, важнейшими из которых являются метаболические изменения, включая эндогенную интоксикацию. Поэтому целью данной работы было определить биохимические особенности белкового обмена и уровень эндотоксемии в крови пациентов с ишемическим инсультом, а также инсультом, осложненным сахарным диабетом 2-го типа. Кроме этого определялись следующие общеклинические показатели: пол, средний возраст пациентов, индекс массы тела, содержание глюкозы и липопротеинов в крови, наличие осложнений и показатели проявлений инсульта (NIHSS и Barthel индекс). В результате проведенных исследований установлено, что ишемический инсульт, включая осложненный инсулиннезависимым диабетом, характеризуется гипопротеинемией на фоне отсутствия выраженных изменений концентрации альбумина. Содержание молекул средней массы (MCM) и олигопептидов свидетельствовало о наличии эндогенной интоксикации, независящей от гипергликемии и превышающей контрольные показатели в 1,5 раза. Полученные результаты позволили также установить отличия в показателях ИМТ, гиперлипопротеинемию и усиление проявлений остального нарушения мозгового кровообращения по NIHSS у пациентов с ишемическим инсультом при сахарном диабете 2 типа. Таким образом, развитие ишемического инсульта, как в условиях сахарного диабета второго типа, так и без них, характеризуется возрастанием показателей эндотоксикации (молекул средней массы и олигопептидов) в крови пациентов, что в совокупности с гипопротеинемией и гиперлипидемией может обуславливать вторичные патобиохимические изменения в клетках головного мозга и опосредовать негативные последствия развития острого нарушения церебрального кровообращения.

**Ключевые слова:** ишемический инсульт, сахарный диабет II типа, молекулы средней массы, олигопептиды, эндотоксикация, индекс массы тела.

5. Заболотний Д. І. Патологічні ефекти інтоксикації клітинних мембрани ендогенними пептидами / Заболотний Д. І. О. Й. Кизим, С. В. Вєрська // Журн. НАМН України. – 2011. – т. 17, № 3. – С. 201-207.

6. Копитова Т.В. Молекулы средней массы как субстрат эндогенной интоксикации при тяжелых дерматозах / Копитова Т.В. // Успехи современного естествознания. – 2006. – № 9 – С. 7-10.

7. Кротенко Н.М. Молекулы средней массы и антитела к нативной и денатурированной ДНК у пациентов при различных типах течения рассеянного склероза / Кротенко Н.М., Алифирова В.М., Кротенко Н.В., Рязанцева А.А., Бойко А.С., Иванова С.А. // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 5 – С. 305-310.

8. Кульматицький А.В. Вільнові радикальні окиснення та ендогенна інтоксикація в гострий період первинного ішемічного інсульту / Кульматицький А.В. // Ендовоаскулярна нейрорентгенхірургія. – 2013. – № 6. – С. 17-22.

9. Нікольська В.А Біохіміческий аспект розгляду ролі молекул середньої маси в організмі / Нікольська В.А., Данильченко Ю.Д., Меметова З.Н. // Учені записки Таврійського національного університета ім. В. І. Вернадського Серія "Біологія, хімія". – 2013. – т. 26, № 1. – С. 139-145.

10. Нікольська В.А. Изменение процессов окислительной модификации белков и уровня молекул средней массы у больных с надпочечниковской недостаточностью, сопровождающейся гиперинсулинемией / Нікольська В.А. // Учені записки Таврійського національного університета ім. В. І. Вернадського Серія "Біологія, хімія". – 2010. – № 1 – С. 84-90.

#### Reference

1. Vedunova M.V. [Status of endogenous intoxication in the metabolic syndrome and its correction low doses of ozone] Abstract. Dis. of PhD – 2008. -27s. Russian.
2. Gabrielyan N I [Screening method of middle molecules in biological fluids] Guidelines. – M., 1985. S. 11. Russian.
3. Gunas I.V. [The dynamic of changes of endogenic intoxication in experimental rat burns] Ukrainsky morphologichny almanach. – 2012. – Volume 10, number 4. – S. 29-34. Ukrainian.
4. Eleev M.A.-K. [Status prooxidant blood system and the level of middle mass molecules in patients with stroke] Bulletin of new medical technologies – 2013 – N 1. – 17-22. Russian.
5. Zabolotny D. I. [Patological effects of intoxication cell membranes endogen peptides] Journal. NAMS of Ukraine. – 2011 – 17 v/# 3. – Pp 201-207. Ukrainian.
6. Kopytova T V [The molecules of average weight as a substrate of endogenous intoxication in severe dematoses] The successes of modern science. – 2006. – number 9 – S. 7-10. Russian.
7. Krotenko N M [The middle mass molecules and antibodies to native and denatured DNA in patients with different types of sclerosis] Basic Research. – 2012. – number 5 – pp 305-310. Russian.
8. Kulmatitsky A. V. [Free radical oxidation and endogenous intoxication in acute ischemic stroke during the primary ischemic stroke] Endovascular neuroreoperationsurgery. – 2013. -№ 6- S. 17-22.9 Ukrainian.
9. Nikolskaya V.A. [Biochemical aspects of the consideration of the role of middle mass molecules in the body] Scientific notes of Taurida National University. Vernadsky Series "Biology, Chemistry". – 2013 – 26 m, # 1. – Pp 139-145. Russian.
10. Nikolskaya V.A. [Change processes of oxidative modification of proteins and the level of middle mass molecules in patients with adrenal insufficiency, accompanied by hyperinsulinemia] Scientific notes of Taurida National University. Vernadsky Series "Biology, Chemistry". – 2010. – # 1 – S. 84-90. Russian.

Надійшла до редколегії 16.09.16

T. Tsarenko, PhD student, L. Gayda, PhD, O. Kravchenko, PhD.  
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

## ENDOTOXICATION INDICATORS IN THE BLOOD OF PATIENTS WITH ISCHEMIC STROKE COMPLICATED BY TYPE TWO DIABETES MELLITUS

*Diabetes is one of the generally accepted factors of acute cerebral blood flow disorders. Numerous studies have shown involvement of many factors in the pathogenesis of diabetic cerebral disorders, the most important of which are the metabolic changes, including endotoxification. The aim of this study was to measure the endotoxification parameters and total protein and albumin contents in the blood of patients with ischemic stroke and patients with stroke complicated by type 2 diabetes. Also the average sex, age of the patients, body mass index (BMI) and blood glucose and lipoproteins levels, different disease complication presents and NIH Stroke Scale with Barthel index were determined.*

*The investigation had shown that patients with ischemic stroke, including complicated by insulin independent diabetes, were characterized by hypoproteinemia with the absence of marked changes of albumin content. The middle mass molecule (MSM) and oligopeptide contents revealed the presence of endogenous intoxication. These parameters, exceeding the control by 1.5 times, were high independently of hyperglycemia presence. The results also allowed to establish differences in BMI, hyperlipoproteinemia and increasing of NIHSS in patients with ischemic stroke and diabetes mellitus type 2 comparing with stroke alone. Thus, the development of ischemic stroke separately and under conditions of type II diabetes was characterized by increasing rates of endotoxification (middle mass molecule and oligopeptides contents) in the blood of patients, that with hypoproteinemia and hyperlipidemia may cause the secondary pathobiochemical changes in the head brain cells and mediate the negative effects of acute disorders of cerebral blood circulation.*

**Key words:** ischemic stroke, type 2 diabetes, middle mass molecules, oligopeptides, endotoxification,, body mass index.

УДК 612.133; 616.132; 615.255; 611.018.61; 615.252

I. Кізуб, канд. біол. наук, О. Харченко, канд. біол. наук,  
О. Костюк, канд. біол. наук, Л. Остапченко, д-р біол. наук  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ,  
К. Клименко, канд. біол. наук, А. Соловйов, д-р біол. наук  
ДУ "Інститут фармакології та токсикології НАМН України", Київ

## УЧАСТЬ ПРОТЕЇНКІНАЗИ С У МЕХАНІЗМАХ ПОРУШЕННЯ СУДИННОГО ТОНУСУ ЗА УМОВ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ. ЧАСТИНА 4

**Цукровий діабет (ЦД) супроводжується розвитком порушень судинного тонусу. До розвитку цих порушень залучений регуляторний фермент протеїнкіназа С (ПКС). Багато даних свідчать про те, що скоротливі відповіді гладеньких м'язів судин суттєво підвищенні за умов ЦД і ендотелій-незалежні механізми пов'язані із ПКС також залучені до цього процесу. Такими механізмами є ПКС-опосередковане пригнічення струму через  $Ca^{2+}$ -керовані  $K^+$ -канали великої провідності ( $V_{K_{Ca}}$ ) в гладеньком'язових клітинах (ГМК) судин та  $Ca^{2+}$ -сенситизація міофіламентів ГМК. ПКС є потенційною терапевтичною мішенню для лікування діабетичних судинних порушень. Серед інгібіторів ПКС вже існує декілька субстанцій, зокрема рубоксістaurін, індолілмалеїмід та його похідні. Нещодавно винайдений метод РНК-інтерференції (РНКі) є важливим інструментом для пригнічення генів і також може бути застосований для пригнічення ПКС та усунення судинних ускладнень за ЦД.**

**Ключові слова:** цукровий діабет, протеїнкіназа С, судинний тонус, і гладенькі м'язи судин,  $Ca^{2+}$ -сенситизація, РНК-інтерференція.

**Залучення протеїнкінази С (ПКС) до ендотелій-незалежного зростання скоротливості гладеньких м'язів судин за цукрового діабету (ЦД).** Хоча численні дослідження продемонстрували, що ЦД впливає на судинну функцію через пригнічення ендотелій-залежної вазодилатації, результати інших досліджень свідчать, що ЦД також призводить до зростання судинного тонусу за участю механізмів, що не пов'язані із впливом ендотелію [2, 19, 31, 54]. Багато даних свідчать про те, що скоротливі відповіді гладеньких м'язів судин суттєво підвищені за умов ЦД [14, 19, 22, 31, 54]. Дослідження з використанням різних експериментальних моделей ЦД у тварин показали, що вазоконстрикція, яка опосередкована активацією  $\alpha_1$ -адренорецепторів судинних гладеньком'язових клітин (ГМК), в артеріях є підвищеною [6, 22, 34, 52] і ПКС є залученою до цього процесу [2, 19, 31]. Зокрема, було встановлено, що ендотелій-незалежна вазоконстрикція, яка опосередковується активацією простагландинових рецепторів Е 1 та 3 (ЕР1/ЕР3) підсиlena в очеревинних артеріях щурів із ЦД 2-го типу та є надзвичайно чутливою до пригнічення ПКС-б ізоформи [14].

**ПКС-опосередковане пригнічення  $K^+$ -каналів в ГМК судин за ЦД.** Калієві ( $K^+$ ) канали відіграють важливу роль у регуляції потенціалу спокою ГМК судин та їхньої скоротливості [33]. Пригнічення  $K^+$ -каналів в судинних ГМК викликає деполяризацію сарколеми та, внаслідок цього, зростання внутрішньоклітинної концентрації іонів  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ), що призводить до скорочення ГМК та, відповідно, вазоконстрикції [33]. Деполяризація плазматичної мембрани активує вхід  $Ca^{2+}$  через потенціал-

залежні  $Ca^{2+}$ -канали L-типу та вивільнення  $Ca^{2+}$  із інозитол-1,4,5-трифосфат- та ріанодин-чутливих внутрішньоклітинних  $Ca^{2+}$ -депо [32].

$Ca^{2+}$ -керовані  $K^+$ -канали великої провідності ( $V_{K_{Ca}}$ ) є домінуючими  $K^+$ -каналами в ГМК судин і відіграють суттєву роль у регуляції судинної функції [16, 33]. Активність  $V_{K_{Ca}}$ -каналів регулюється їхньою допоміжною субодиницею  $\beta 1$  ( $VK-\beta 1$ ) [32]. Дані, що існують, вказують на те, що функція судинних  $V_{K_{Ca}}$ -каналів є пригніченою у тварин із моделями ЦД обох типів [30], що пов'язано із зниженою експресією  $VK-\beta 1$  в судинних ГМК [24, 25], а також, із зниженням активності формуючої пору субодиниці а ( $VK-a$ ) під дією реактивних форм кисню (РФК) [25]. Пригнічення  $V_{K_{Ca}}$ -струму також було показано у ГМК мікросудин щурів із інсулін-резистентністю [11].

На артеріях мишей із стрептозотоциновою (СТЗ) моделлю діабету 1-го типу та ГМК коронарних артерій людини, культівованих за умов високої концентрації глюкози, було встановлено, що знижена експресія  $VK-\beta 1$  пов'язана із зростанням активності ПКС- $\beta$  ізоформи [24]. Пригнічення ПКС- $\beta$  відновлювало опосередковані  $V_{K_{Ca}}$ -каналами вазодилатацію у діабетичних мишей [24]. Нещодавно ми також показали, що ПКС- $\beta$  є залученою до пригнічення загального  $K^+$ -струму в ГМК аорти щурів із СТЗ-моделлю ЦД [20]. Було також показано, що високі концентрації глюкози через ПКС-опосередковані процеси та оксидативний стрес пригнічують потенціал-залежній  $K^+$ -струм ( $I_K$ ) в артеріальних ГМК, приводячи до деполяризації ГМК судин та вазоконстрикції [35, 47].

Потрібно також зауважити, що декілька ранніх досліджень показали досить суперечливі дані щодо мож-

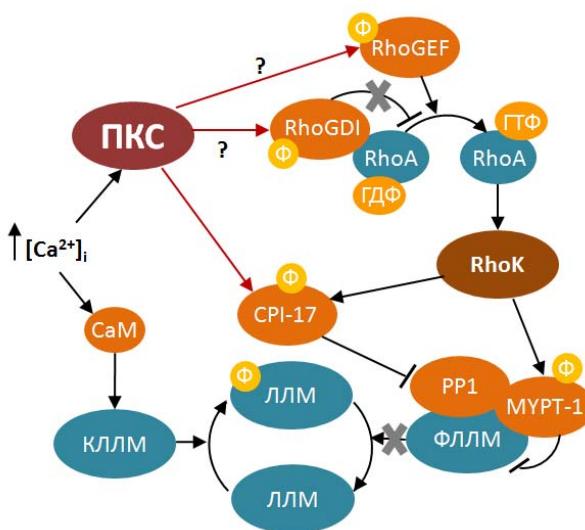
ливого залучення зростання активності  $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -АТФзи у судинних тканинах діабетичних тварин [10, 17, 18, 53] та активації ПКС до цих змін [21, 53]. Однак, беручи до уваги те, що інші результати свідчать про відсутність змін у активності  $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -АТФзи ГМК судин за умов ЦД [42], роль  $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -АТФзи у механізмах судинної гіперскоротливості за ЦД та залучення ПКС до цього механізму потребує подальшого з'ясування.

**ПКС-опосередкована  $\text{Ca}^{2+}$ -сенситизація міофіламентів ГМК судин за ЦД.** Добре відомо, що головною умовою для розвитку скоротливої відповіді гладеньких м'язів судин є зростання  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Було встановлено, що як зростання входу  $\text{Ca}^{2+}$  ззовні, так і його вивільнення із внутрішньоклітинних депо, є залученими до підвищеної судинної реактивності за умов ЦД [3, 52]. Деякі ранні дослідження показали, що стимуляція ізольованих сегментів аорти діабетичних щурів норадреналіном супроводжується зростанням входу  $\text{Ca}^{2+}$  у порівнянні із судинами контрольних тварин [26, 52]. Інші автори також встановили залучення зростання внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  до механізмів судинної гіперскоротливості за ЦД [3].

Однак, існує один суперечливий факт, який полягає в тому, що вхід  $\text{Ca}^{2+}$  через потенціал-залежні та депокеровані  $\text{Ca}^{2+}$ -канали в ГМК судин є парадоксально пригніченим за умов ЦД [8, 51]. Тому зростання чутливості скоротливих білків до іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , або  $\text{Ca}^{2+}$ -сенситизацію, було запропоновано як найбільш суттєвий та загальний механізм розвитку підвищеної судинної скоротливості, що пов'язана із ЦД [19, 31, 54]. На підтримку цього твердження існують дані про те, що

підвищені скоротливі відповіді на норадреналін очевидною артерій діабетичних щурів не пов'язані із відповідним зростанням  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  [6]. Подібним чином, за умов високої концентрації глюкози констрикція аорти, викликана тромбоксаном А<sub>2</sub>, є підвищеною незалежно від рівня внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  [34]. Зростання  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  призводить до активації кальмодулін (CaM)-залежної кінази легких ланцюгів міозину (КЛЛМ), яка каталізує фосфорилювання легких ланцюгів міозину (ЛЛМ), приводячи до активації актин-міозинової взаємодії в судинних ГМК та їх скорочення [39, 46]. На додаток до цього первинного механізму, у ГМК судин існують декілька модулюючих механізмів, які можуть змінювати силу скорочення м'язів незалежно від існуючої  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  [39, 46].

Було встановлено, що до механізму зростання чутливості міофіламентів до іонів  $\text{Ca}^{2+}$  залучені ПКС [23, 40] та Rho-залежна кіназа (RhoK) [23, 38, 49] (див. схему на рис. 1). В цьому механізмі ПКС- та RhoK-опосередковані шляхи збігаються на фосфорилюванні за Thr38 інгібіторного білку фосфатази легких ланцюгів міозину (ФЛЛМ), що має назву 17 кДа інгібітор ПКС-залежної протеїнфосфатази-1 (CPI-17) [39, 40, 49]. Фосфорилюваний білок CPI-17 зв'язується із каталітичною субодиницею ФЛЛМ, ПКС-залежною протеїнфосфатазою-1 (PP1), пригнічуючи таким чином активність ФЛЛМ [12]. На додаток до цього, RhoK може фосфорилювати регуляторну субодиницю ФЛЛМ, MYPT1, що також пригнічує активність фосфатази [13, 23, 38, 49]. Пригнічення ФЛЛМ призводить до підвищення фосфорилювання ЛЛМ за будь-якого рівня  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  та активності КЛЛМ [13].



**Рис. 1. Схема, що ілюструє ПКС-опосередкований механізм  $\text{Ca}^{2+}$ -сенситизації скоротливих білків у ГМК судин за ЦД. Пояснення див. у тексті**

Таким чином, цей механізм може суттєво регулювати судинний тонус [38, 46]. Mueed та співавтори [31] показали, що підвищені скоротливі відповіді очевидної артерії СТЗ-діабетичних щурів у відповідь на стимуляцію  $\alpha_1$ -адренорецепторів ГМК супроводжуються зростанням рівня активності ПКС- $\alpha$  та - $\epsilon$  ізоформ, та зростанням залучення ГМК артерій у щурів із СТЗ-індукованим ЦД 1-го типу пов'язаний із підвищеною чутливістю міофіламентів до  $\text{Ca}^{2+}$  і обидва ферменти, ПКС та RhoK, суттєво сприяють цьому процесу в діабетичних судинах [19]. Було також показано, що активність RhoK є підви-

щеною в ГМК діабетичних судин [2, 54] і RhoK-опосередковане фосфорилювання білку CPI-17 збільшено в ГМК судин мишій із генетичною моделлю ЦД 2-го типу (db/db) та ГМК, що були культивовані за високих концентрацій глюкози [54]. Показано, що до розвитку судинного гіпертонусу за ЦД залучені як активація RhoK-залежних шляхів фосфорилювання CPI-17, так і зростання загального рівня CPI-17 [54], а активація CPI-17 у db/db діабетичних мишій також асоційована із значним зростанням артеріального тиску крові [48]. Нещодавно було встановлено, що судинна дисфункція в аорті щурів із ЦД 1-го типу залежить від підвищеної активності RhoK ізоформи ROCK2 [7]. Зв'язок між

ПКС- та RhoK-опосередкованими шляхами в механізмах зростання тонусу ГМК судин за умов гіперглікемії та ЦД було продемонстровано [54]. Показано, що за умов високого рівня глюкози активація ПКС є необхідною умовою для активації RhoK та наступного фосфорилювання CPI-17 [54]. Результати цього дослідження свідчать також, що хоча ПКС і може безпосередньо фосфорилювати CPI-17 в ГМК судин під дією деяких агоністів за фізіологічних умов, ПКС не є тим ферментом, що може фосфорилювати CPI-17 за гіперглікемічних умов [54]. Також було встановлено, що рівні мРНК та білку RhoK можуть зростати внаслідок впливу збоку ПКС і, скоріше за все, за умов ЦД RhoK та CPI-17 є ланками, активність яких модулюється під дією ПКС [54]. Можливо також, що ПКС в ГМК судин опосередковує викликану гіперглікемією активацію білків RhoA, RhoGDI та RhoGEF шляхом їхнього фосфорилювання, як це було продемонстровано на кардіоміоцитах діабетичних щурів [45]. RhoA, RhoGDI та RhoGEF являють собою мономерні G-білки (малі ГФази), які є активаторами або регуляторами RhoK [23, 27, 38, 54]. Існує свідчення того, що рівні мРНК та білку RhoA підвищені в ГМК артерій гіпертензивних діабетичних щурів та мишей [29, 54].

**Перспективи застосування пригнічення ПКС у терапії судинних порушень за ЦД.** Розробка інноваційних фармакологічних засобів, що здатні впливати на активність ПКС, є надзвичайно важливою для розвитку нових клінічних стратегій лікування та запобігання розвитку судинних ускладнень, що асоційовані із ЦД. Наш огляд показує, що ПКС є потенційною терапевтичною мішенню для лікування діабетичних судинних порушень. На даний час серед інгібіторів окремих ізоформ ПКС вже існує декілька субстанцій, що проходять клінічні випробування для лікування діабетичних судинних ускладнень [15]. Рубоксістаурін (LY333531), інгібітор РКС- $\beta_2$ , який може бути застосований перорально, на даний час інтенсивно досліджується для лікування діабетичної ретинопатії [9, 28, 43], нефропатії [9, 28, 43] та нейропатії [4, 9, 28] і виявив себе нешкідливим для застосування [1, 28]. Індопілмалеїмід та його похідні, які є неселективними інгібіторами ПКС або селективними до РКС-θ ізоформи, також були залучені до клінічних випробувань з метою лікування діабетичних ускладнень, здебільшого нефропатії, кардіоміопатії та нейропатії [44].

Однак, проблема у селективності щодо структурно схожих різних ізоформ ПКС залишається найбільшою перешкодою у створенні безпечних інгібіторів ПКС, що можуть бути застосовані у клініці [44]. Нещодавно винайдений метод РНК-інтерференції (РНКі) швидко набуває популярності як важливий інструмент для пригнічення генів [5]. Введення малих інтерференційних РНК (міРНК), коротколанцюгових молекул РНК, що складаються із 21-22 нуклеотидів, призводить до послідовності-специфічного пригнічення експресії визначеного гену [5, 41]. Основана на РНКі терапія може мати значні переваги над традиційними методами лікування захворювань, включаючи широкий спектр застосування, терапевтичну точність та специфічність, та відсутність побічних ефектів у порівнянні із існуючими фармакологічними засобами пригнічення ПКС. Такі переваги, поряд із відносно легкими засобами синтезу та низькою ціною продукту, роблять міРНК привабливим новим класом низькомолекулярних ліків. Основані на РНКі ліки дозволяють руйнувати певну таргетну РНК та, таким чином, блокувати синтез білку, який пов'язаний із розвитком певного захворювання [37]. Як терапевтичний інструмент методика РНКі є багатообіцяючою щодо контролю перебігання широкого спектру захворювань [36].

Незважаючи на декілька невирішених питань щодо безпечної використання міРНК, вже зараз декілька фармацевтичних компаній по всьому світу рухаються у напрямку розробки терапії, що основана на РНКі для боротьби із захворюваннями серцево-судинної системи [36], ЦД та його ускладнень [50]. РНКі може бути адаптовано для боротьби із будь-якими захворюваннями, що мають визначену молекулярну мішень. Як тільки мішенні РНКі та відповідні маркери будуть точно встановлені в діабетичних тканинах, застосування міРНК може стати надзвичайно ефективним терапевтичним засобом для інактивації генів ПКС для нормалізації судинної функції за умов ЦД. Наші нещодавні дослідження показали, що пригнічення гену ПКС-β з використанням таргетних міРНК в значній мірі відновлюють пригнічений К<sup>+</sup>-струм в ГМК та ендотелій-залежну вазодилатацію в аорті щурів із СТЗ-індукованим діабетом 1-го типу [20]. Ці зміни супроводжувались зниженням рівня мРНК ПКС-β в діабетичних судинах та зниженням гіперпродукції РФК [20].

**Заключення.** Як можна бачити із представленого огляду, ПКС є надзвичайно важливою ланкою у патогенезі розвитку судинних ускладнень, що викликані ЦД. Сучасним завданням медицини є відновлення або запобігання розвитку порушень судинної функції за умов гіперглікемії. Для вирішення цього питання необхідно чітко ідентифікувати роль ПКС у клітинних механізмах, які запускають та підтримують розвиток викликаних ЦД судинних порушень, і, таким чином, ПКС може бути важливою фармакологічною мішеню для лікування пацієнтів із діабетом та відповідними судинними порушеннями. Дуже важливим є також точна ідентифікація не лише виявлення головних фармакологічних мішеней для терапії, але також внутрішньоклітинних структур та механізмів в клітинах судинної стінки безпосередньо пов'язаних із активацією ПКС, що може слугувати в якості маркерів ефективності терапії. Такими компонентами є іонні канали, експресія та функція ферментів, компоненти ендотелій-залежної судинної дилатації, Ca<sup>2+</sup>-сенсitzація міофіламентів ГМК судин та інше. Гладенькі м'язи є кінцевою загальною ланкою для багатьох захворювань і ЦД не є виключенням. Таким чином, повне розуміння механізмів небажаних змін у скоротливості гладеньких м'язів судин за умов ЦД є важливим шагом в напрямку створення нових терапевтичних засобів.

Щодо "родини" ПКС, це насправді вдала назва для групи ферментів, які контролюють велику кількість важливих функцій та має аналогію із італійською "Cosa Nostra". Вона відома як асоціація кримінальних угруповань, знаних як "родини", що поділяють багато спільніх рис в структурній організації та механізмах дії. Однак, на відміну від добре структурованої "Cosa Nostra", родина ПКС, на жаль, характеризується надто заплутаними аспектами щодо багатофункціональності та варіабельності серед різних клітин. В будь-якому випадку, ми впевнені, що буде досягнено повне розуміння участі ПКС в регуляторних клітинних шляхах та взаємодії із різними сигнальними системами, що пов'язані із розвитком судинних порушень за ЦД.

#### Список використаних джерел

1. Aiello L. P. Oral protein kinase C β inhibition using ruboxistaurin: efficacy, safety, and causes of vision loss among 813 patients (1,392 eyes) with diabetic retinopathy in the protein kinase C β inhibitor-diabetic retinopathy study and the protein kinase C β inhibitor-diabetic retinopathy study 2 / L. P. Aiello, L. Vignati, M. J. Sheetz [et al.] // Retina. – 2011. – Vol. 31. – P. 2084–2094. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
2. Akhtar S. Activation of Erbb2 and downstream signalling via Rho kinases and ERK1/2 contributes to diabetes-induced vascular dysfunction / S. Akhtar, M. H. M. Yousif, G. S. Dhaunsi [et al.] // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, N 6. – e67813. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

3. Balasubramanyam M. Evidence for mechanistic alterations of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in type 2 diabetes mellitus / M. Balasubramanyam, R. A. Balaji, B. Subashini [et al.] // Int J Exp Diabetes Res. – 2001. – Vol. 1. – P. 275–287. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
4. Bansal D. Ruboxistaurin for the treatment of diabetic peripheral neuropathy: a systematic review of randomized clinical trials / D. Bansal, Y. Badhan, K. Gudala [et al.] // Diabetes Metab J. – 2013. – Vol. 37. – P. 375–384. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
5. Caplen N. J. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems / N. J. Caplen, S. Parrish, F. Imani [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. – 2001. – Vol. 98. – P. 9742–9747. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
6. Chow W. L. Noradrenaline-induced changes in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and tension in mesenteric arteries from diabetic rats / W. L. Chow, L. Zhang, K. M. MacLeod // Br J Pharmacol. – 2001. – Vol. 134. – P. 179–187. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
7. Cicek F. A. Role of ROCK upregulation in endothelial and smooth muscle vascular functions in diabetic rat aorta / F. A. Cicek, H. B. Kandilci, B. Turan // Cardiovasc Diabetol – 2013. – Vol. 12. – P. 51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
8. Curtis T. M. Diabetes induced activation of protein kinase C inhibits store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  uptake in rat retinal microvascular smooth muscle / T. M. Curtis, E. H. Major, E. R. Trimble [et al.] // Diabetologia. – 2003. – Vol. 46. – P. 1252–1259. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
9. Danis R. P. Ruboxistaurin: PKC- $\beta$  inhibition for complications of diabetes / R. P. Danis, M. J. Sheetz // Expert Opin Pharmacother. – 2009. – Vol. 10, N 17. – P. 2913–2925. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
10. Davel A. P. Effects of ouabain on the pressor response to phenylephrine and on the sodium pump activity in diabetic rats / A. P. Davel, L. V. Rossini, D. V. Vassallo // Eur J Pharmacol. – 2000. – Vol. 406. – P. 419–427. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
11. Dimitrolooulou C. Potassium ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) currents are reduced in microvascular smooth muscle cells from insulin-resistant rats / C. Dimitrolooulou, G. Han, A. Miller [et al.] // Am J Physiol Heart Circ Physiol. – 2002. – Vol. 282. – P. 908–917. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
12. Eto M. Regulation of cellular protein phosphatase-1 (PP1) by phosphorylation of the CPI-17 family, C-kinase-activated PP1 inhibitors / M. Eto // J Biol Chem. – 2009. – Vol. 284. – P. 35273–35277. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
13. Feng J. Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase / J. Feng, M. Ito, K. Ichikawa [et al.] // J Biol Chem. – 1999. – Vol. 274. – P. 37385–37390. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
14. Ishida K. Protein kinase C delta contributes to increase in EP3 agonist-induced contraction in mesenteric arteries from type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats / K. Ishida, T. Matsumoto, K. Taguchi [et al.] // Eur J Physiol. – 2012. – Vol. 463. – P. 593–602. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
15. Gerald P. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications / P. Gerald, G. L. King // Circ Res. – 2010. – Vol. 106. – P. 1319–1331. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
16. Ghatta S. Large conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications / S. Ghatta, D. Nimmagadda, X. Xu [et al.] // Pharm Ther. – 2006. – Vol. 110, N 1. – P. 103–116. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
17. Gupta S. Hyperglycemia increases endothelial superoxide that impairs smooth muscle cell  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity / S. Gupta, E. Chough, J. Daley [et al.] // Am J Physiol Cell Physiol. – 2002. – Vol. 282. – P. 560–566. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
18. Gupta S. Role of endothelium-derived nitric oxide in stimulation of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity by endothelium in rabbit aorta / S. Gupta, C. McArthur, C. Grady [et al.] // Am J Physiol Heart Circ Physiol. – 1994. – Vol. 266. – P. 577–582. Available from: <http://ajpheart.physiology.org>
19. Kizub I. V. Rho kinase and protein kinase C involvement in vascular smooth muscle myofilament calcium sensitization in arteries from diabetic rats / I. V. Kizub, O. O. Pavlova, C. D. Johnson [et al.] // Br J Pharmacol. – 2010. – Vol. 159, N 8. – P. 1724–1731. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
20. Klymenko K. I. PKC- $\delta$  isozyme gene silencing restores vascular function in diabetic rat / K. I. Klymenko, T. V. Novokhatska, I. V. Kizub [et al.] // J Basic Clin Physiol Pharmacol. – 2014. – P. 1–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
21. Kowluru R. A. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes or experimental galactosemia: V. Relationship between protein kinase C and ATPases / R. A. Kowluru, M. R. Jirousek, L. Stramm [et al.] // Diabetes. – 1998. – Vol. 47. – P. 464–469. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
22. Lee J.-H. The diabetes-induced functional and distributional changes of the alpha 1-adrenoceptor of the abdominal aorta and distal mesenteric artery from streptozotocin-induced diabetic rats / J.-H. Lee, J.-H. Bahk, S.-H. Park [et al.] // Korean J Anesthesiol. – 2011. – Vol. 60, N 4. – P. 272–281. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
23. Loirand G. Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology / G. Loirand, P. Guerin, P. Pacaud // Circ Res. – 2006. – Vol. 98. – P. 322–334. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
24. Lu T. Reactive oxygen species signaling facilitates FOXO-3a/FBXO-dependent vascular BK channel b1 subunit degradation in diabetic mice / T. Lu, Q. Chai, L. Yu [et al.] // Diabetes. – 2012. – Vol. 61, N 7. – P. 1860–1868. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
25. Lu T. [Impaired vascular BK channel function in type 2 diabetes mellitus] / T. Lu, H.-C. Lee. – Shanghai: InTech; 2011. – P. 55–70.
26. Mahmoudian M. Diabetes-induced changes in the contractility of the aorta and pA2 of nifedipine in the rat / M. Mahmoudian, F. Behnaz, E. Rezaei // Acta Diabetol. – 1996. – Vol. 33. – P. 114–117. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
27. Matsui T. Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho / T. Matsui, M. Amano, T. Yamamoto [et al.] // EMBO J. – 1996. – Vol. 15. – P. 2208–2216. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
28. Mehta N. N. Selective PKC beta inhibition with ruboxistaurin and endothelial function in type-2 diabetes mellitus / N. N. Mehta, M. Sheetz, K. Price [et al.] // Cardiovasc Drugs Ther. – 2009. – Vol. 23. – P. 17–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
29. Miao L. Upregulation of small GTPase RhoA in the basilar artery from diabetic (mellitus) rats / L. Miao, J.W. Calvert, J. Tang [et al.] // Life Sci. – 2002. – Vol. 71. – P. 1175–1185. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
30. Mori A. Vasodilation of retinal arterioles induced by activation of  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  channels is attenuated in diabetic rats / A. Mori, S. Suzuki, K. Sakamoto [et al.] // Eur J Pharmacol. – 2011. – Vol. 669, N 1–3. – P. 94–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
31. Mueed I. Role of the PKC/CPI-17 pathway in enhanced contractile responses of mesenteric arteries from diabetic rats to  $\alpha$ -adrenoceptor stimulation / I. Mueed, L. Zhang, K. M. MacLeod // Br J Pharmacol. – 2005. – Vol. 146. – P. 972–982. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
32. Nauli S. M. Developmental changes in ryanodine- and IP3-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  pools in ovine basilar artery / S. M. Nauli, J. M. Williams, S. E. Akopov [et al.] // Am J Physiol Cell Physiol. – 2001. – Vol. 281. – P. 1785–1796. Available from: <http://ajpcell.physiology.org>
33. Nelson M. T. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle / M. T. Nelson, J. M. Quayle // Am J Physiol Cell Physiol. – 1995. – Vol. 268. – P. 799–822. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
34. Nobe K. High-glucose enhances a thromboxane A2-induced aortic contraction mediated by an alteration of phosphatidylinositol turnover / K. Nobe, H. Suzuki, H. Nobe [et al.] // J Pharmacol Sci. – 2003. – Vol. 92. – P. 267–282. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
35. Rainbow R. D. Glucose reduces endothelin inhibition of voltage-gated potassium channels in rat arterial smooth muscle cells / R. D. Rainbow, M. E. Hardy, N. B. Standen [et al.] // J Physiol. – 2006. – Vol. 575. – P. 833–844. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
36. Reddy L. S. RNAi in medicine: current and future perspectives / L. S. Reddy, V. Sarojamma, V. Ramakrishna // Biotechnol Mol Biol Rev. – 2006. – Vol. 1, N 4. – P. 103–114. Available from: <http://www.academicjournals.org>
37. Rondinone C. M. Therapeutic potential of iRNA in metabolic diseases / C. M. Rondinone // Biotechniques. – 2006. – Vol. 40. – P. 31–36. Available from: <http://www.biotechniques.com>
38. Schofield A. V. Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) signaling and disease / A. V. Schofield, O. Bernard // Crit Rev Biochem Mol Biol. – 2013. – Vol. 48, N 4. – P. 301–316. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
39. Schubert R. The emerging role of  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity regulation in promoting myogenic vasoconstriction / R. Schubert, D. Lidington, S. S. Bolz // Cardiovasc Res. – 2008. – Vol. 77. – P. 8–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
40. Senba S. Identification of trimeric myosin phosphatase (PP1M) as a target for a novel PKC-potentiated protein phosphatase-1 inhibitory protein (CPI17) in porcine aorta smooth muscle / S. Senba, M. Eto, M. Yazawa // J Biochem (Tokyo). – 1999. – Vol. 125. – P. 354–362. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
41. Sledz C. A. RNA interference in biology and disease / C. A. Sledz, B. R. G. Williams // Blood. – 2005. – Vol. 106, N 3. – P. 787–794. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
42. Smith J. M.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity in vascular smooth muscle from streptozotocin diabetic rat / J. M. Smith, D. J. Paulson, S. M. Solar // Cardiovasc Res. – 1997. – Vol. 34. – P. 137–144. Available from: <http://cardiovascres.oxfordjournals.org>
43. Sobhia M. E. Protein kinase C bII in diabetic complications: survey of structural, biological and computational studies / M. E. Sobhia, B. K. Grewal, J. Bhat [et al.] // Expert Opin Ther Targets. – 2012. – Vol. 16, N 3. – P. 325–344. Available from: <http://www.tandfonline.com>
44. Sobhia M. E. Protein kinase C inhibitors: a patent review (2008–2009) / M. E. Sobhia, B. K. Grewal, S. M. L. Paul [et al.] // Expert Opin Ther Pat. – 2013. – Vol. 23, N 10. – P. 1297–1315. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
45. Soliman H. Diabetes-induced increased oxidative stress in cardiomyocytes is sustained by a positive feedback loop involving Rho-kinase and  $\text{PKC}\beta_2$  / H. Soliman, A. Gador, Y.-H. Lu [et al.] // Am J Physiol Heart Circ Physiol. – 2012. – Vol. 303, N 8. – P. 989–1000. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
46. Somlyo A. P.  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase / A. P. Somlyo, A. V. Somlyo // Physiol Rev. – 2003. – Vol. 83. – P. 1325–1358. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
47. Straub S. V. Regulation of intracerebral arteriolar tone by Kv channels: effects of glucose and PKC / S. V. Straub, H. Girouard,

- P. E. Doetsch [et al.] // Am J Physiol Cell Physiol. – 2009. – Vol. 297. – P. 788–796. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
48. Su W. Hypertension and disrupted blood pressure circadian rhythm in Type 2 diabetic db/db mice / W. Su, Z. Guo, D. C. Randall [et al.] // Am J Physiol Heart Circ Physiol. – 2008. – Vol. 295. – P. 1634–1641. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
49. Swärd K. The role of RhoA and Rho-associated kinase in vascular smooth muscle contraction / K. Swärd, M. Mita, D. P. Wilson [et al.] // Curr Hypertens Rep. – 2003. – Vol. 5, N 1. – P. 66–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
50. Uprichard S. L. The therapeutic potential of RNA interference / S. L. Uprichard // FEBS Lett. – 2005. – Vol. 579. – P. 5996–6007. Available from: <http://www.sciencedirect.com>
51. Wang R. Altered I-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel currents in vascular smooth muscle cells from experimental diabetic rats / R. Wang, Y. Wu, G. Tang [et al.] // Am J Physiol Heart Circ Physiol. – 2000. – Vol. 278. – P. 714–722. Available from: <http://www.ajpheart.physiology.org>
52. White R. E. Vascular contraction induced by activation of membrane calcium ion channels enhanced in streptozotocin-diabetes / R. E. White, G. O. Carrier // J Pharmacol Exp Ther. – 1990. – Vol. 253, N 3. – P. 1057–1062. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
53. Xia P. Identification of the mechanism for the inhibition of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase by hyperglycemia involving activation of protein kinase C and cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> / P. Xia, R. M. Kramer, G. L. King // J Clin Invest. – 1995. – Vol. 96. – P. 733–740. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
54. Xie Z. Up-regulation of CPI-17 phosphorylation in diabetic vasculature and high glucose cultured vascular smooth muscle cells / Z. Xie, W. Su, Z. Guo [et al.] // Cardiovasc Res. – 2006. – Vol. 69. – P. 491–501. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- ### References
1. Aiello LP, Vignati L, Sheetz MJ, Zhi X, Girach A, Davis MD, et al. Oral protein kinase C  $\beta$  inhibition using ruboxistaurin: efficacy, safety, and causes of vision loss among 813 patients (1,392 eyes) with diabetic retinopathy in the protein kinase C  $\beta$  inhibitor-diabetic retinopathy study 2. *Retina* 2011;31:2084–94. PubMed PMID: 21862954.
  2. Akhtar S, Youssif MHM, Dhaunsi GS, Sarkhouth F, Chandrasekhar B, Attur S, et al. Activation of ErbB2 and downstream signalling via Rho kinases and ERK1/2 contributes to diabetes-induced vascular dysfunction. *PLoS One* 2013;8(6):e67813. PubMed PMID: 23826343.
  3. Balasubramanyam M, Balaji RA, Subashini B, Mohan V. Evidence for mechanistic alterations of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in type 2 diabetes mellitus. *Int J Exp Diabetes Res* 2001;1:275–87. PubMed PMID: 11467418.
  4. Bansal D, Badhan Y, Gundala K, Schifano F. Ruboxistaurin for the treatment of diabetic peripheral neuropathy: a systematic review of randomized clinical trials. *Diabetes Metab J* 2013;37:375–84. PubMed Central PMCID: PMC3816139.
  5. Caplen NJ, Parrish S, Imani F, Fire A, Morgan RA. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9742–7. PubMed PMID: 11481446.
  6. Chow WL, Zhang L, MacLeod KM. Noradrenaline-induced changes in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and tension in mesenteric arteries from diabetic rats. *Br J Pharmacol* 2001;134:179–87. PubMed Central PMCID: PMC1572921.
  7. Cicek FA, Kandilci HB, Turan B. Role of ROCK upregulation in endothelial and smooth muscle vascular functions in diabetic rat aorta. *Cardiovasc Diabetol* 2013;12:51. PubMed PMID: 23530857.
  8. Curtis TM, Major EH, Trimble ER, Schofield CN. Diabetes induced activation of protein kinase C inhibits store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  uptake in rat retinal microvascular smooth muscle. *Diabetologia* 2003;46:1252–9. PubMed PMID: 12898009.
  9. Danis RP, Sheetz MJ. Ruboxistaurin: PKC- $\beta$  inhibition for complications of diabetes. *Expert Opin Pharmacother* 2009;10(17):2913–25. PubMed PMID: 19929710.
  10. Davel AP, Rossini LV, Vassallo DV. Effects of ouabain on the pressor response to phenylephrine and on the sodium pump activity in diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 2000;406:419–27.
  11. Dimitrolooulou C, Han G, Miller A, Molero M, Fuchs LC, White RE, et al. Potassium (BK<sub>Ca</sub>) currents are reduced in microvascular smooth muscle cells from insulin-resistant rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282:908–17. PubMed PMID: 11834486.
  12. Eto M. Regulation of cellular protein phosphatase-1 (PP1) by phosphorylation of the CPI-17 family, C-kinase-activated PP1 inhibitors. *J Biol Chem* 2009;284:35273–7. PubMed Central PMCID: PMC2790955.
  13. Feng J, Ito M, Ichikawa K, Isaka N, Nishikawa M, Hartshorne DJ, et al. Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem* 1999;274:37385–90. PubMed PMID: 10601309.
  14. Ishida K, Matsumoto T, Taguchi K, Kamata K, Kobayashi T. Protein kinase C delta contributes to increase in EP3 agonist-induced contraction in mesenteric arteries from type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Eur J Physiol* 2012;463:593–602. PubMed PMID: 22371141.
  15. Geraldes P, King GL. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circ Res* 2010;106:1319–31. PubMed PMID: 20431074.
  16. Ghatta S, Nimmagadda D, Xu X, O'Rourke ST. Large conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications. *Pharm Ther* 2006;110(1):103–16. PubMed PMID: 16356551.
  17. Gupta S, Chough E, Daley J, Oates P, Tornheim K, Ruderman NB, et al. Hyperglycemia increases endothelial superoxide that impairs smooth muscle cell  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282:560–6. PubMed PMID: 11832341.
  18. Gupta S, McArthur C, Grady C, Ruderman NB. Role of endothelium-derived nitric oxide in stimulation of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity by endothelium in rabbit aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1994;266:577–82.
  19. Kizub IV, Pavlova OO, Johnson CD, Soloviev AI, Zhulos AV. Rho kinase and protein kinase C involvement in vascular smooth muscle myofilament calcium sensitization in arteries from diabetic rats. *Br J Pharmacol* 2010;159(8):1724–31. PubMed Central PMCID: PMC2925495.
  20. Klymenko KI, Novokhatska TV, Kizub IV, Parshikov AV, Dosenko VE, Soloviev AI. PKC- $\delta$  isozyme gene silencing restores vascular function in diabetic rat. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2014;1:9. PubMed PMID: 24468620.
  21. Kowluru RA, Jirousek MR, Stramm L, Farid N, Engerman RL, Kern TS. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes or experimental galactosemia: V. Relationship between protein kinase C and ATPases. *Diabetes* 1998;47:464–9. PubMed PMID: 11473058.
  22. Lee J-H, Bahk J-H, Park S-H, Huh J. The diabetes-induced functional and distributional changes of the alpha 1-adrenoceptor of the abdominal aorta and distal mesenteric artery from streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Anesthesiol* 2011;60(4):272–81. PubMed PMID: 21602978.
  23. Loirand G, Guerin P, Pacaud P. Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Circ Res* 2006;98:322–34. PubMed PMID: 23921309.
  24. Lu T, Chai Q, Yu L, d'Uscio LV, Katusic ZS, He T, et al. Reactive oxygen species signalling facilitates FOXO-3a/FBXO-dependent vascular BK channel b1 subunit degradation in diabetic mice. *Diabetes* 2012;61(7):1860–8. PubMed Central PMCID: PMC322788.
  25. Lu T, Lee H-C. Impaired vascular BK channel function in type 2 diabetes mellitus. In: Croniger C, editor. *Medical complications of type 2 diabetes*. InTech; 2011. p. 55–70.
  26. Mahmoudian M, Behnaz F, Rezaei E. Diabetes-induced changes in the contractility of the aorta and pA<sub>2</sub> of nifedipine in the rat. *Acta Diabetol* 1996;33:114–7. PubMed PMID: 8870812.
  27. Matsui T, Amano M, Yamamoto T, Chihera K, Nakafuku M, Ito M, et al. Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO J* 1996;15:2208–16. PubMed Central PMCID: PMC450144.
  28. Mehta NN, Sheetz M, Price K, Comiskey L, Amrutia S, Iqbal N, et al. Selective PKC beta inhibition with ruboxistaurin and endothelial function in type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Drugs Ther* 2009;23:17–24. PubMed PMID: 18949545.
  29. Miao L, Calvert JW, Tang J, Zhang JH. Upregulation of small GTPase RhoA in the basilar artery from diabetic (mellitus) rats. *Life Sci* 2002;71:1175–85. PubMed PMID: 12095538.
  30. Mori A, Suzuki S, Sakamoto K, Nahakura T, Ishii K. Vasodilation of retinal arterioles induced by activation of BK<sub>Ca</sub> channels is attenuated in diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 2011;669(1–3):94–9. PubMed PMID: 21871885.
  31. Mueed I, Zhang L, MacLeod KM. Role of the PKC/CPI-17 pathway in enhanced contractile responses of mesenteric arteries from diabetic rats to  $\alpha$ -adrenoceptor stimulation. *Br J Pharmacol* 2005;146:972–82. PubMed PMID: 16205274.
  32. Nauli SM, Williams JM, Akopov SE, Zhang L, Pearce WJ. Developmental changes in ryanodine- and IP3-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  pools in ovine basilar artery. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;281:1785–96.
  33. Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 1995;268:799–822. PubMed PMID: 7732320.
  34. Nobe K, Suzuki H, Nobe H, Sakai Y, Momose K. High-glucose enhances a thromboxane A<sub>2</sub>-induced aortic contraction mediated by an alteration of phosphatidylinositol turnover. *J Pharmacol Sci* 2003;92:267–82. PubMed PMID: 12890893.
  35. Rainbow RD, Hardy ME, Standen NB, Davies NW. Glucose reduces endothelin inhibition of voltage-gated potassium channels in rat arterial smooth muscle cells. *J Physiol* 2006;575:833–44. PubMed PMID: 16825302.
  36. Reddy LS, Sarojamma V, Ramakrishna V. RNAi in medicine: current and future perspectives. *Biotechnol Mol Biol Rev* 2006;1(4):103–14.
  37. Rondinone CM. Therapeutic potential of iRNA in metabolic diseases. *Biotechniques* 2006;40:31–6.
  38. Schofield AV, Bernard O. Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) signalling and disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2013;48(4):301–16. PubMed PMID: 23601011.
  39. Schubert R, Lidington D, Bolz SS. The emerging role of  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity regulation in promoting myogenic vasoconstriction. *Cardiovasc Res* 2008;77:8–18. PubMed PMID: 17764667.
  40. Senba S, Eto M, Yazawa M. Identification of trimeric myosin phosphatase (PP1M) as a target for a novel PKC-potentiated protein phosphatase-1 inhibitory protein (CP17) in porcine aorta smooth muscle. *J Biochem (Tokyo)* 1999;125:354–62. PubMed PMID: 9990134.
  41. Sledz CA, Williams BRG. RNA interference in biology and disease. *Blood* 2005;106(3):787–94. PubMed Central PMCID: PMC1895153.

42. Smith JM, Paulson DJ, Solar SM. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in vascular smooth muscle from streptozotocin diabetic rat. *Cardiovasc Res* 1997;34:137–44.
43. Sobhia ME, Grewal BK, Bhat J, Rohit S, Punia V. Protein kinase C bII in diabetic complications: survey of structural, biological and computational studies. *Expert Opin Ther Targets* 2012;16(3):325–44.
44. Sobhia ME, Grewal BK, Paul SML, Patel J, Kaur A, Haokip T, et al. Protein kinase C inhibitors: a patent review (2008–2009). *Expert Opin Ther Pat* 2013;23(10):1297–315. PubMed PMID: 23795914.
45. Soliman H, Gador A, Lu Y-H, Lin G, Bankar G, MacLeod KM. Diabetes-induced increased oxidative stress in cardiomyocytes is sustained by a positive feedback loop involving Rho-kinase and PKC $\beta_2$ . *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012;303(8):989–1000. PubMed PMID: 22865386.
46. Somlyo AP, Somlyo AV. Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* 2003;83:1325–58. PubMed PMID: 14506307.
47. Straub SV, Giroard H, Doetsch PE, Hannah RM, Wilkerson MK, Nelson MT. Regulation of intracerebral arteriolar tone by Kv channels: effects of glucose and PKC. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009;297:788–96. PubMed PMID: 19605735.
48. Su W, Guo Z, Randall DC, Cassis L, Brown DR, Gong MC. Hypertension and disrupted blood pressure circadian rhythm in Type 2 diabetic db/db mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;295:1634–41. PubMed PMID: 18708447.
49. Swärd K, Mita M, Wilson DP, Deng JT, Susnjar M, Walsh MP. The role of RhoA and Rho-associated kinase in vascular smooth muscle contraction. *Curr Hypertens Rep* 2003;5(1):66–72. PubMed PMID: 12530938.
50. Uprichard SL. The therapeutic potential of RNA interference. *FEBS Lett* 2005;579:5996–6007.
51. Wang R, Wu Y, Tang G, Wu L, Hanna ST. Altered I-type Ca<sup>2+</sup> channel currents in vascular smooth muscle cells from experimental diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278:H714–22.
52. White RE, Carrier GO. Vascular contraction induced by activation of membrane calcium ion channels enhanced in streptozotocin-diabetes. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;253(3):1057–62. PubMed PMID: 1694242.
53. Xia P, Kramer RM, King GL. Identification of the mechanism for the inhibition of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase by hyperglycemia involving activation of protein kinase C and cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>. *J Clin Invest* 1995;96:733–40. PubMed Central PMCID: PMC185257.
54. Xie Z, Su W, Guo Z, Pang H, Post SR, Gong MC. Up-regulation of CPI-17 phosphorylation in diabetic vasculature and high glucose cultured vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 2006;69:491–501. PubMed PMID: 16336954.

Надійшла до редколегії 25. 10.16

І. Кизуб, канд. біол. наук, О. Харченко, канд. біол. наук,  
 А. Костюк, канд. біол. наук, Л. Остапченко, д-р біол. наук  
 Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,  
 К. Клименко, канд. біол. наук, А. Соловьев, д-р біол. наук  
 ГУ "Інститут фармакології токсикології НАМН України", Київ, Україна

## УЧАСТИЕ ПРОТЕИНКИНАЗЫ С В МЕХАНИЗМАХ НАРУШЕНИЯ СОСУДИСТОГО ТОНУСА ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ. ЧАСТЬ 4

**Сахарный диабет (СД) сопровождается развитием нарушений сосудистого тонуса. В развитие этих нарушений вовлечены регуляторный фермент протеинкиназа С (ПКС). Много данных свидетельствует о том, что сократительные ответы гладких мышц сосудов существенно повышены при СД и эндотелий-независимые механизмы, связанные с ПКС также вовлечены в этот процесс. Такими механизмами являются ПКС-опосредованное угнетение тока через Ca<sup>2+</sup>-зависимые K<sup>+</sup>-каналы большой проводимости (BK<sub>Ca</sub>) в гладкомышечных клетках (ГМК) сосудов и Ca<sup>2+</sup>-сенситизация миофиламентов ГМК. ПКС является потенциальной терапевтической мишенью для лечения диабетических сосудистых нарушений. Среди ингибиторов ПКС уже существует несколько субстанций, в частности рубоксистурин, индолималеимид и его производные. Недавно изобретенный метод РНК-интерференции (РНКи) является важным инструментом для угнетения генов и также может быть использован для угнетения ПКС и устранения сосудистых осложнений при СД.**

**Ключевые слова:** сахарный диабет, протеинкиназа С, сосудистый тонус, гладкие мышцы сосудов, Ca<sup>2+</sup>-сенситизация, РНК-интерференция.

I. Kizub, PhD, O. Kharchenko, PhD, O. Kostiuk, PhD, L. Ostapchenko, DSc  
 Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine,  
 K. Klymenko, PhD, A. Soloviev, DSc  
 State Institution "Institute of Pharmacology and Toxicology of NAMS of Ukraine", Kyiv, Ukraine

## PROTEIN KINASE C PARTICIPATION IN MECHANISMS OF VASCULAR TONE ABNORMALITY IN DIABETES MELLITUS. PFRT 4

*Diabetes mellitus (DM) is accompanied by vascular tone disorders development. Regulatory enzyme protein kinase C (PKC) is involved in mechanisms of these disorders development.*

*Numerous studies have demonstrated that contractile responses of vascular smooth muscle are enhanced in DM and endothelium-independent PKC-mediated mechanisms are involved in this process. Such mechanisms are PKC-mediated inhibition of Ca<sup>2+</sup> activated K<sup>+</sup> channels (BK<sub>Ca</sub>) in vascular smooth muscle cells (SMCs) and SMCs myofilaments Ca<sup>2+</sup> sensitization. PKC is a potential therapeutic target for treating vascular diabetic complications. A few compounds among PKC inhibitors already exist, such as ruboxistaurin, indolylmaleimide and its derivatives. Recently discovered method of RNA-interference (RNAi) is an essential gene-silencing tool and can also be used for PKC inhibition and DM-associated vascular complications elimination.*

**Key words:** diabetes mellitus, protein kinase C, vascular tone, vascular smooth muscle, Ca<sup>2+</sup> sensitization, RNA-interference.

УДК 612.821:612 82/.83

С. Федорчук, канд. біол. наук, Л. Чікіна, пров. інж.,  
 Т. Герасько, магістр, І. Зима, д-р біол. наук, С. Тукаєв, канд. біол. наук  
 Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

## СТАТИЧНІ ЕЛЕКТРИЧНІ ПОТЕНЦІАЛИ ЯК ПОКАЗНИКИ СТАНУ ОЧІКУВАННЯ ЗА УМОВ ФОРМУВАННЯ ЕМОЦІЙНОГО ВИГОРАННЯ У СТУДЕНТІВ

**Статичні електричні потенціали (СТЕП) в біологічно активних зонах шкіри людини (БАЗ) відображають рівень фонової активації мозкових структур і рівень психічного стресу. Мета дослідження полягала в тому, щоб визначити характер розподілу СТЕП в симетричних біологічно активних зонах шкіри обличчя в стані очікування психологічного і нейрофізіологічного тестування за умов різного вихідного рівня емоційного вигорання у студентів. Отримані дані свідчать про те, що формування вигорання сумітєво знижує рівень фонової емоційної напруги в стані очікування емоційно-значущої події, що може позначатися у порушенні адаптаційних можливостей і зниженні ефективності подальшої діяльності.**

**Ключові слова:** статичні електричні потенціали (СТЕП), біологічно активні зони шкіри людини (БАЗ), рівень емоційного вигорання.

**Вступ.** Емоції, як відомо, виконують значущу регулюючу роль у формуванні цілеспрямованої поведінки

людини, як позитивну, так і негативну, що спонукає до глибшого вивчення стану психоемоційної сфери. Про-  
 © Федорчук С., Чікіна Л., Герасько Т., Зима І., Тукаєв С., 2016

блема діагностики різних аспектів психічного стану недостатньо розроблена і є досить актуальним. Це важливо, перш за все, з метою забезпечення ефективної адаптації до постійних змін умов існування, особливо на сучасному етапі розвитку нашого суспільства.

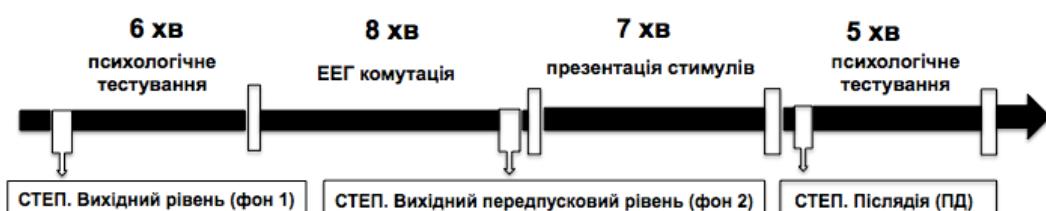
Як відомо, однією з форм стресу є емоційне вигорання (EB) [6, 7, 12, 15]. Вигорання є однією з форм професійного стресу і вже стало значущою проблемою сучасного суспільства. За визначенням В.Бойко, EB – механізм психологічного захисту у вигляді повного або часткового відключення емоцій у відповідь на психотравмуючі впливи [12]. Відповідно до моделі К. Маслач і С. Джексона, EB включає три компоненти: емоційне виснаження, деперсоналізацію і редукцію персональних досягнень [6]. Центральне місце в цій тріаді посідає емоційне виснаження, яке проявляється у відчутті спустошення, емоційного перенапруження, виснаження власних ресурсів [12]. Особливість вигорання як процесу полягає в тому, що воно розвивається поступово, непомітно для людини протягом тривалого проміжку часу. Необхідно відзначити при формуванні вигорання погрішення пам'яті [7]. Вигорання також є фактором ризику для захворювань серцево-судинної системи [15].

Одним із основних критеріїв оцінки емоційного напруження і функціонального стану людини є рівень електричного потенціалу шкіри (ЕП) [1, 3, 4, 9, 11], який застосовується при визначенні рівня активного неспання [8], емпатії та алекситімії [1], сенсомоторної реактивності [2, 3]. Емоційні переживання супроводжуються активацією з різним ступенем вираженості тих ділянок мозку, які мають своє "представництво" (відображення) на тілі [10]. Електродермальні потенціали містять два компоненти: фазовий (SCR) і тонічний (SCL). Останній пов'язаний з тонічними станами симпатичної нервової системи, у тому числі під час перебування людини в стані стресу [4], який погрішує бар'єрну функцію шкіри [5]. На основі зниження рівня SCL також оцінюються ефективність копінгу стресу, поліпшення емоційного

стану людини при застосуванні стимулів (фотографій і відео) зі сценами природи [13, 14]. Досліджено статеві відмінності електрофізіологічних реакцій за умов стресогенного впливу [3].

Отже, можна зробити цілком логічне припущення, що формування вигорання може позначатися на зміні значень статичних електрических потенціалів обличчя в стані очікування будь-якої події, що має важливе інформаційне значення (наприклад – перед проходженням психологічного і нейрофізіологічного тестування). Мета роботи полягала в тому, щоб визначити – чи буде залежати ступінь цього впливу від специфіки окремих фаз емоційного вигорання і які саме фази вигорання будуть позначатися на портреті СТЕП найбільше.

**Об'єкт і методи дослідження.** У проведенному дослідженні брали участь 31 студент І-ІІ курсів факультету психології та Навчально-наукового центру "Інститут Біології" Київського національного університету імені Тараса Шевченка віком 17-23 років обох статей. Для оцінки наявного психічного стану студентів (а саме – вихідного рівня емоційного вигорання) було застосовано тест діагностики рівня емоційного вигорання В.В.Бойка, адаптовану для професійної групи "студенти" [12] з урахуванням особливостей вибірки та ситуації взаємодії в процесі навчання. Методика дозволяє діагностувати механізм психологічного захисту у формі повного або часткового виключення емоцій у відповідь на психотравмуючі впливи і, як наслідок, – здатність людини сприймати і обробляти будь-який вид інформації. Синдром емоційного вигорання класифікується за стадіями (тривожне напруження, опір (резистенція) і виснаження), для яких характерні ті чи інші симптоми, що враховують зміни параметрів психологічної та емоційної активності. Значення кожної з фаз вимірюється за шкалою від 0 до 120 пунктів: від 0 до 36 балів – фаза не сформована, від 37 до 60 балів – фаза перебуває на стадії формування, від 61 до 120 балів – фаза сформована [12].



Малюнок 1. Схема дослідження

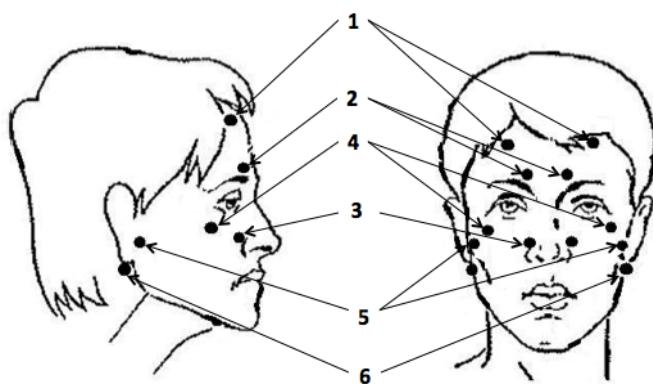
Значення СТЕП у БАЗ шкіри обличчя у досліджуваних заміряли на початку психологічних і нейрофізіологічних обстежень (вихідний рівень – фон 1) і безпосередньо перед проходженням тестів з використанням емоційно негативних стимулів (вихідний передпусковий рівень – фон 2), наприкінці експерименту (післядія – ПД) (малюнок 1). Абсолютні значення статичних електрических потенціалів шкіри в симетричних (правих та лівих) БАЗ шкіри обличчя: лобних (ЛП, ЛЛ), надбровних (НП, НЛ), біляносових (БНП, БНЛ), скроневих (СП, СЛ), білявушних (БВП, БВЛ) та завушних (ЗВП, ЗВЛ) (малюнок 2) реєструвалися неполяризуючими хлорсрібними електродами за допомогою потенціометра постійної напруги "БІО-1" з підвищеним вхідним опором, що перешкоджає виникненню струмів витоку через шкіру, та з вхідним фільтром частот, котрий відсікає всі частоти, вищі за 0.1 Гц, запобігаючи небажаного впливу електричної активності серця та інших внутрішніх органів на

досліджувані потенціали шкіри. Довготривало неполяризованими електродами являлися металеві стрижні, покриті шаром AgCl, що поміщались в фізіологічний розчин, яким наповнювали корпус електроду. Корпус електроду був виготовлений із нейтрального матеріалу. Реєстрація СТЕП проходила наступним чином: обстежуваний знаходився в положенні сидячи. Біологічно активні ділянки шкіри знежирювалися за допомогою спирту. Індиферентний електрод зі змоченим у фізіологічному розчині гнітом довжиною 5 см затискався в долоні обстежуваного (референтна зона). Активним електродом з коротким змоченим у фізіологічному розчині гнітом, з однаковою силою натискання торкалися до шкіри у обраній зоні і проводили вимірювання електричного потенціалу між долонею і вибраною БАЗ [3].

Статистична обробка даних проводилася з використанням методів математичної статистики за допомогою статистичного пакету Statistica 8. Для порівняння незале-

жних і залежних вибірок використовували тест Манна-Уйтні, тест Спірмена застосовували для дослідження ко-

реляційних зв'язків. Для визначення нормальності розподілу даних застосовувався критерій Колмагорова-Смірнова.



**Малюнок 2. Розташування досліджуваних БАЗ шкіри голови:**  
1 – лобні; 2 – надбрівні; 3 – біляносові; 4 – скроневі; 5 – білявушні; 6 – завушні

**Результати та їх обговорення.** За запропонованим тестом В.В.Бойка [12] визначалися окрім фази розвитку синдрому емоційного вигорання – фаза тривожного напруження (для оцінки реакції на зовнішні і внутрішні фактори), фаза резистенції (для оцінки прийомів психологічного захисту) і фаза виснаження (для оцінки стану нервової системи студентів). В залежності від рівня сформованості кожної окремої фази синдрому емоційного вигорання обстежені студенти були розподілені на три групи: 1 – фаза не сформована, 2 – фаза на стадії формування, 3 – фаза сформована.

Виявлені значущі відмінності за тестом Манна-Уйтні ( $p < .05$ ) між виділеними групами студентів у фазі напруження за фоновими значеннями СТЕП (фон 1) у лобних правих (ЛП) БАЗ шкіри обличчя (таблиця 3, малюнок 3); у фазі резистенції – за фоновими значеннями СТЕП (фон 1) у біляносових (БНП, БНЛ), скроневих (СП, СЛ), білявушних правих (БВП) та завушних правих (ЗВП) БАЗ (таблиця 4, малюнок 4); у фазі виснаження – за фоновими значеннями СТЕП (фон 1) у лобних правих (ЛП) БАЗ шкіри обличчя (таблиця 5, малюнок 5).

**Таблиця 3. Статичні електричні потенціали в біологічно активних зонах шкіри за умов різного вихідного рівня емоційного вигорання (фаза "Тривожне напруження") у студентів (n=31), Me [25%, 75%]**

БАЗ шкіри	1 група n=19	2 група n=6	3 група n=6
ЛП-ФОН1	45,0 [44,0; 50,0]	35,0 [34,0; 42,0]*	50,0 [40,0; 52,0]
ЛЛ-ФОН1	49,0 [40,0; 50,0]	42,0 [40,0; 50,0]	48,0 [36,0; 54,0]

Примітки:

\*  $p < .05$  – значущі різниці між 1 і 2 групами за тестом Манна-Уйтні;

ЛП, ЛЛ – абсолютні значення статичних електрических потенціалів (СТЕП, мВ) в симетричних (правих та лівих) лобних БАЗ шкіри обличчя;

ФОН1 – фонові СТЕП;

1 група – фаза не сформована;

2 група – фаза на стадії формування;

3 група – фаза сформована

**Таблиця 4. Статичні електричні потенціали в біологічно активних зонах шкіри за умов різного вихідного рівня емоційного вигорання (фаза "Резистенції") у студентів (n=31), Me [25%, 75%]**

БАЗ шкіри	1 група n=3	2 група n=13	3 група n=15
БНП-ФОН1	61,5 [57,0; 66,0]!!	44,5 [32,0; 48,0]*	45,0 [35,0; 46,0]
БНЛ-ФОН1	60,5 [55,0; 66,0]!!	45,0 [32,0; 45,0]*	42,0 [35,0; 50,0]
СП-ФОН1	63,0 [57,0; 69,0]!!	43,5 [35,0; 49,0]*	45,0 [36,0; 49,0]
СЛ-ФОН1	61,0 [59,0; 63,0]!!	48,0 [36,0; 55,0]*	45,0 [40,0; 50,0]
БВП-ФОН1	62,5 [60,0; 65,0]!!	42,0 [32,0; 50,0]*	43,0 [33,0; 49,0]
БВЛ-ФОН1	59,5 [55,0; 64,0]	45,0 [34,0; 53,0]	40,0 [34,0; 46,0]
ЗВП-ФОН1	60,0 [55,0; 65,0]!!	36,0 [30,0; 41,0]*	38,0 [34,0; 45,0]
ЗВЛ-ФОН1	57,5 [49,0; 66,0]	32,0 [25,0; 44,0]	42,0 [38,0; 46,0]

Примітки:

\*  $p < .05$  – значущі різниці між 1 і 2 групами за тестом Манна-Уйтні;

!!  $p < .05$  – значущі різниці між 1 і 3 групами за тестом Манна-Уйтні;

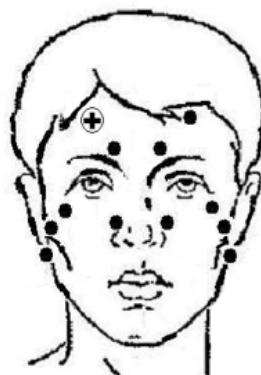
БНП, БНЛ, СП, СЛ, БВП, БВЛ, ЗВП, ЗВЛ – абсолютні значення статичних електрических потенціалів (СТЕП, мВ) в симетричних (правих та лівих) БАЗ шкіри обличчя: відповідно – лобних, надбровних, біляносових, скроневих, білявушних, завушних;

ФОН1 – фонові СТЕП;

1 група – фаза не сформована;

2 група – фаза на стадії формування;

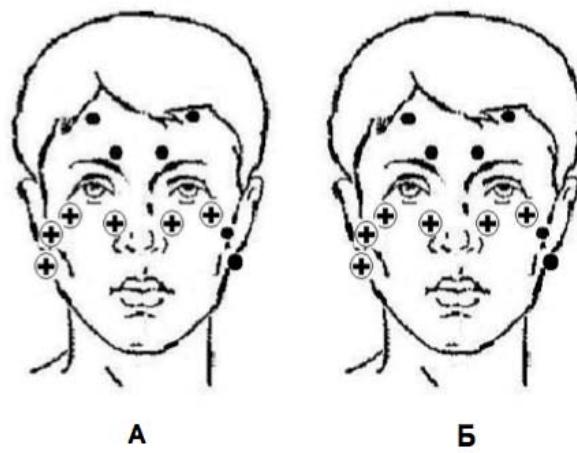
3 група – фаза сформована



**Малюнок 3. Статичні електричні потенціали в біологічно активних зонах шкіри за умов різного вихідного рівня**

**емоційного вигорання (фаза "Тривожне напруження") у студентів (N=31):**

"+" – значуще вищі значення фонових СТЕП (ФОН1) у представників 1-ої групи (фаза не сформована, N=19) в порівнянні з обстежуваними 2-ої групи (фаза на стадії формування, N=6), p < 05



**Малюнок 4. Статичні електричні потенціали в біологічно активних зонах шкіри за умов різного вихідного рівня**

**емоційного вигорання (фаза "Резистенції") у студентів (N=31):**

A "+" – значуще вищі значення фонових СТЕП (ФОН1) у представників 1-ої групи (фаза не сформована, N=3) в порівнянні з обстежуваними 2-ої групи (фаза на стадії формування, N=13), p < 05;

B "+" – значуще вищі значення фонових СТЕП (ФОН1) у представників 1-ої групи (фаза не сформована, N=3) в порівнянні з обстежуваними 3-ої групи (фаза сформована, N=15), p < 05

**Таблиця 5. Статичні електричні потенціали в біологічно активних зонах шкіри за умов різного вихідного рівня**  
**емоційного вигорання (фаза "Виснаження") у студентів (n=31), Me [25%, 75%]**

БАЗ шкіри	1 група n=14	2 група n=10	3 група n=7
ЛП-ФОН1	46,0 [45,0; 52,0]	37,0 [25,0; 42,0]*	43,0 [40,0; 50,0]
ЛЛ-ФОН1	49,0 [40,0; 55,0]	44,5 [30,0; 56,0]	41,0 [40,0; 48,0]

Примітки:

\* p < .05 – значущі різниці між 1 і 2 групами за тестом Манна-Уїтні;

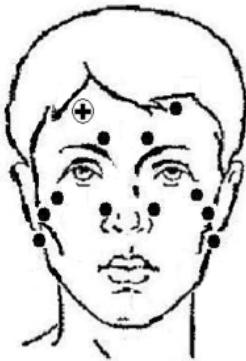
ЛП, ЛЛ – абсолютні значення статичних електрических потенціалів (СТЕП, мВ) в симетричних (правих та лівих) лобних БАЗ шкіри обличчя;

ФОН1 – фонові СТЕП;

1 група – фаза не сформована;

2 група – фаза на стадії формування;

3 група – фаза сформована



**Малюнок 5. Статичні електричні потенціали в біологічно активних зонах шкіри за умов різного вихідного рівня емоційного вигорання (фаза "Виснаження") у студентів (N=31):**

"+" – значуще зменшення фонових СТЕП (ФОН1) у представників 1-ої групи (фаза не сформована, N=14) в порівнянні з обстежуваними 2-ої групи (фаза на стадії формування, N=10), p < 05

На стадії формування фази тривожного напруження відбувалося значуще зменшення величини фонових СТЕП у правих лобних БАЗ шкіри обличчя. Це вказує на те, що формування емоційного вигорання (саме на стадії напруження регуляторних механізмів) знижує передпушкову (до початку експерименту) емоційну напругу. Очевидно, цей факт можна пояснити так званим феноменом "емоційної прямоти, притуплення" (emotional bluntness), гальмуванням емоцій при формуванні вигорання [6, 12]. У студентів зі сформованою фазою напруження на тлі перших двох груп не було виявлено значущих змін СТЕП.

Зменшення фонових СТЕП (у симетричних біляносових, скроневих та правих білявшних і завушних БАЗ) при розвитку фази резистенції може свідчити про те, що використання прийомів психологічного захисту та-кож знижує передпушкову емоційну напругу. Група студентів зі несформованою фазою опору відрізнялась найвищими фоновими СТЕП. Студенти зі сформованою фазою резистенції та на стадії формування системи психологічного захисту, на противагу "беззахисним", продемонстрували нижчий фоновий рівень СТЕП, більш наближений до "фізіологічної норми", що може свідчити про зменшення або відсутність передстартового хвилювання перед тестуванням.

На стадії формування фази виснаження (подібно до фази напруження) відбувалося значуще зменшення величини фонових СТЕП у правих лобних БАЗ шкіри обличчя. Але у студентів зі сформованою фазою виснаження на тлі перших двох груп не було виявлено значущих змін СТЕП. Хоча саме в даному випадку такі зміни були б найбільш очікуваними і прогнозованими. Цілком можливо, що інтенсивність вегетативних зрушень за умов очікування емоційно-значущої події при формуванні емоційного вигорання пов'язана зі статтю обстежуваних, крім того – від типу вегетативного регулювання або індивідуально-типовогічних особливостей чи особистісних характеристик. Проте ці припущення, безумовно, потребують подальших досліджень і підтверджені або спростувань.

**Висновки.** Отже, аналіз отриманих результатів розподілу фонових СТЕП у БАЗ шкіри обличчя перед комплексним психологічним і нейрофізіологічним тестуванням студентів дає можливість підсумувати, що формування емоційного вигорання суттєво знижує рівень передстартової емоційної напруги в стані очікування емоційно-значущої події, що може позначатися у порушенні

адаптаційних можливостей і зниженні ефективності подальшої діяльності.

#### Список використаних джерел

1. Bogdanov V.B. Alexithymia and empathy predict changes in autonomic arousal during affective stimulation / V.B. Bogdanov, O.V. Bogdanova, D.S. Gorlov, Y.P. Gorgo, J.J. Dirckx, M.Y. Makarchuk, H. Critchley // Cognitive and Behavioral Neurology, 26(3), 2013. doi: 10.1097/WNN.0000000000000002
2. Bogdanov V.B. Emotional stress, Gender, and Age Effects on facial skin potential distribution / V.B. Bogdanov, D.S. Gorlov, S.V. Fedorchuk, A.I. Ena, Yu.P. Gorgo // 47th Annual Meeting of Society for Psychophysiological research. – Savannah, Georgia, USA, October 17-21, 2007. – S59.
3. Bogdanov V.B. Differences in the face distribution of skin potential level related to emotional stress and gender / V.B. Bogdanov, D.S. Gorlov, Yu.P. Gorgo // Acta Physiologica. 186 (Suppl. 650). – 2006. – PM13A-15.
4. Dawson M.E. The electrodermal system / M.E. Dawson, A.M. Schell, D.L. Filion // Handbook of psychophysiology / J.T. Cacioppo, L.G. Tassinary, G.G. Bernston, eds. 3rd ed. New York: Cambridge University Press, 2007. – pp. 159-181.
5. Fukuda S. Psychological stress has the potential to cause a decline in the epidermal permeability barrier function of the horny layer / S. Fukuda, S. Baba, T. Akasaka // International journal of cosmetic science, 37(1), – 2015. – 63-69. DOI: 10.1111/ics.12169
6. Maslach C. What have we learned about burnout and health? Psychology and Health, 16. 2001: 607-611.
7. Meier S.F. The burned-out college student: a descriptive profile / S.F. Meier, R.R. Schmeck // Journal of College Student Personal. January. – 1985: 63-69.
8. Nishimura C. Evaluation of the arousal level in motorcar driving using skin potential level II: Its effectiveness compared with other electrophysiological quantities / C. Nishimura, A. Kosaka, K. Terada, S. Yoshizawa, J. Nagumo // Journal of Robotics and Mechatronics, 7(2), 1995. – 112-118.
9. Nishimura C. Feedback control of the level of arousal using skin potential level as an index / C. Nishimura, J.I. Nagumo // Ergonomics, 28(6), 1985. – 905-913. http://dx.doi.org/10.1080/00140138508963211
10. Picard R.W. Multiple arousal theory and daily-life electrodermal activity asymmetry / R.W. Picard, S. Fedor, Y. Ayzenberg // Emotion Review, 8(1), 2016. – 62-75. doi:10.1177/1754073914565517
11. Robin O. Emotional responses evoked by dental odors: an evaluation from autonomic parameters / O. Robin, O. Alaoui-Ismaili, A. Dittmar, E. Vernet-Maury // Journal of Dental Research, 77(8), 1998. – 1638-1646. doi: 10.1177/00220345980770081201
12. Tukaiev S. Does the response to negative TV news depend on the level of emotional burnout? / S. Tukaiev, I. Zyma, S. Sobishchanskyi, Y. Havrylets, M. Makarchuk, V. Rizun, I. Sosiedka, I. Babyn // Program № 268.21/TT34. 2014 Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2014. Online // Neuroscience 2014, SfN's 44st annual meeting, November 15-19, Washington, DC, USA. 1585-1586. DOI:10.1159/000056232
13. Ulrich R.S. Stress recovery during exposure to natural and urban environments / R.S. Ulrich, R.F. Simons, B.D. Losito, E. Fiorito, M.A. Miles, M. Zelson // Journal of environmental psychology, 11(3), 1991. – 201-230. doi:10.1016/S0272-4944(05)80184-7
14. Valtchanov D. Restorative effects of virtual nature settings / D. Valtchanov, K.R. Barton, C. Ellard // Cyberpsychology, Behavior, and Social Networking, 13(5), 2010. – 503-512. doi:10.1089/cyber.2009.0308

15. Zanstra Y.J. Vagal and sympathetic activity in burnouts during a mentally demanding workday / Y.J. Zanstra, J.M.H. Schellekens, C. Schaap, L. Kooistra // Psychosomatic Medicine. 68: 2006. – 583-590.

#### Reference

1. Bogdanov VB, Bogdanova OV, Gorlov DS, Gorgo YP, Dirckx JJ, Makarchuk MY, Critchley H. Alexithymia and empathy predict changes in autonomic arousal during affective stimulation. Cognitive and Behavioral Neurology. 26(3). 2013. doi: 10.1097/WNN.0000000000000002
2. Bogdanov VB, Gorlov DS, Fedorchuk SV, Ena AI, Gorgo YuP. Emotional stress, Gender, and Age Effects on facial skin potential distribution. 47th Annual Meeting of Society for Psychophysiological research. Savannah, Georgia, USA. October 17-21. 2007: S59.
3. Bogdanov VB, Gorlov DS, Gorgo YuP. Differences in the face distribution of skin potential level related to emotional stress and gender. Acta Physiologica. 186(Suppl. 650). 2006: PM13A-15.
4. Dawson ME, Schell AM, Filion DL. The electrodermal system. In: Handbook of psychophysiology. Cacioppo JT, Tassinary LG, Bernston GG, eds. 3rd ed. New York: Cambridge University Press. 2007: 159–181.
5. Fukuda S, Baba S, Akasaka T. Psychological stress has the potential to cause a decline in the epidermal permeability barrier function of the horny layer. International journal of cosmetic science. 37(1). 2015: 63-69. DOI: 10.1111/ics.12169
6. Maslach C. What have we learned about burnout and health? Psychology and Health. 16. 2001: 607-611.
7. Meier SF, Schmeck RR. The burned-out college student: a descriptive profile. Journal of College Student Personal. January. 1985: 63–69.
8. Nishimura C, Kosaka A, Terada K, Yoshizawa S, Nagumo J. Evaluation of the arousal level in motorcar driving using skin potential level II: Its effectiveness compared with other electrophysiological quantities. Journal of Robotics and Mechatronics. 7(2). 1995: 112-118.
9. Nishimura C, Nagumo JI. Feedback control of the level of arousal using skin potential level as an index. Ergonomics. 28(6). 1985: 905-913. <http://dx.doi.org/10.1080/00140138508963211>
10. Picard RW, Fedor S, Ayzenberg Y. Multiple arousal theory and daily-life electrodermal activity asymmetry. Emotion Review. 8(1). 2016: 62-75. doi: 10.1177/1754073914565517
11. Robin O, Alaoui-Ismaili O, Dittmar A, Vernet-Maury E. Emotional responses evoked by dental odors: an evaluation from autonomic parameters / O Robin, // Journal of Dental Research. 77(8). 1998. 1638-1646. doi: 10.1177/00220345980770081201
12. Tukaev S, Zyma I, Sobishchanskyi S, Havrylets Y, Makarchuk M, Rizun V, Sosiedka I, Babyn I. Does the response to negative TV news depend on the level of emotional burnout? Program № 268.21/TT34. 2014 Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience. 2014. Online. Neuroscience 2014. SN's 44st annual meeting. November 15-19. Washington, DC, USA: 1585-1586. DOI:10.1159/000056232
13. Ulrich RS, Simons RF, Losito BD, Fiorito E, Miles MA, Zelson M. Stress recovery during exposure to natural and urban environments. Journal of environmental psychology. 11(3). 1991: 201-230. doi:10.1016/S0272-4944(05)80184-7
14. Valtchanov D, Barton KR, Ellard C. Restorative effects of virtual nature settings. Cyberpsychology, Behavior, and Social Networking. 13(5). 2010: 503-512. doi:10.1089/cyber.2009.0308
15. Zanstra YJ, Schellekens JMH, Schaap C, Kooistra L. Vagal and sympathetic activity in burnouts during a mentally demanding workday. Psychosomatic Medicine. 68. 2006: 583-590.

Надійшла до редакції 08.11.16

С. Федорчук, канд. бiol. наук, Л. Чикина, канд. бiol. наук, Т. Герасько, магістр,  
І. Зима, д-р бiol. наук, С. Тукаев, канд. бiol. наук  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

## СТАТИСТИЧЕСКИЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ПОТЕНЦИАЛЫ КАК ПОКАЗАТЕЛИ СОСТОЯНИЯ ОЖИДАНИЯ В УСЛОВИЯХ ФОРМИРОВАНИЯ ЭМОЦИОНАЛЬНОГО ВЫГОРАНИЯ СТУДЕНТОВ

*Статические электрические потенциалы (СТЕП) в биологически активных зонах кожи человека (БАЗ) отражают уровень фоновой активации мозговых структур и уровень психического стресса. Цель исследования состояла в том, чтобы определить характер распределения СТЕП в симметричных биологически активных зонах кожи лица в состоянии ожидания психологического и нейрофизиологического тестирования в условиях различного исходного уровня эмоционального выгорания у студентов. Полученные данные свидетельствуют о том, что формирование выгорания существенно снижает уровень фонового эмоционального напряжения в состоянии ожидания эмоционально-значимого события, что может сказываться в нарушении адаптационных возможностей и снижении эффективности дальнейшей деятельности.*

**Ключевые слова:** статические электрические потенциалы (СТЕП), биологически активные зоны кожи человека (БАЗ), уровень эмоционального выгорания.

S. Fedorchuk, PhD., L. Chikina, PhD., T. Gerasko, magistr., I. Zima, DSc., S. Tukaev, PhD.  
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

## STATISTICAL ELECTRIC POTENTIAL AS AN INDICATOR OF A WAIT STATE IN THE FORMATION OF EMOTIONAL BURNOUT STUDENTS

*The skin potential level (SPL) of facial biologically active zones (BAZs) reflects the level of background activation of brain structures and the level of mental stress. The aim of the study was to detect the distribution of SPL in symmetric biologically active zones of face skin (frontal, superciliary, paranasal, temporal, periotic and postaural) pending psychological and neurophysiological tests depending on the level of emotional burnout among students. It indicates that the formation of burnout reduced the background initial emotional tension pending emotionally significant events that may affect violating adaptive capacity and reducing the effectiveness of future activities.*

**Key words:** skin potential level (SPL), biologically active zones (BAZs), burnout.

УДК 615.9:616.36-099:576.2.24:577.161.3

О. Ткаченко, асп., В. Коваленко, д-р бiol. наук, проф.  
ДУ "Інститут фармакології та токсикології НАМН України", Київ

## ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ МЕТАБОЛІЧНОГО СИНДРОМУ НА ЕМБРІО-ФЕТАЛЬНИЙ РОЗВИТОК ПОТОМСТВА САМЦІВ ЩУРІВ

*Порівняльні дослідження рівня ембріо-фетальної смертності у самиць, запліднених самцями з метаболічним синдромом (МС), індукованим у дорослому або ювенільному віці виявили, що у потомства дорослих щурів не відбувалося суттєвих порушень ембріо- та фетогенезу. У щурів-самців з МС, що розвинувся в ювенільному віці, доімплантаційні втрати були в 6 разів вищими, ніж в контролі; зафіксовано 4 % післяімплантаційної загибелі; відповідно, загальна смертність потомства зростала у 2,4 рази порівняно з контролем.*

**Ключові слова:** метаболічний синдром, щурі, ювенільний вік, ембріон-фетальний розвиток.

**Вступ.** Сьогодні не викликає сумніву той факт, що корені метаболічних порушень лежать в дитячому та підлітковому віці [1,2]. Стрімкий ріст розповсюдження ожиріння, особливо в розвинених країнах, призводить до суттєвого збільшення кількості дітей та підлітків, що мають ознаки метаболічних порушень ризик та інсульнорезистентності [3]. У розвинених країнах надмірну

масу тіла мають 23,8 % хлопчиків та 22,6% дівчаток [4]. За різними оцінками поширеність МС серед підлітків та молоді складає біля 10 %, зростаючи до 22,1 % при вираженному ожирінні [5,6]. Серед потенційних ризиків для здоров'я, пов'язаних з розвитком МС та ожиріння, на особливу увагу заслуговує те, що вони можуть негативно впливати на репродуктивну систему [7,8].

Репродуктивна функція підлітків – одна з найбільш чутливих систем організму, яка тонко реагує на зовнішні впливи. Оскільки в дитячому та підлітковому віці відбувається становлення репродуктивної функції, захворювання в даний віковий період є причиною майже половини випадків чоловічої інфертильності [9]. Відсутність скарг та діагностичних критеріїв не сприяє вчасному виявленню патології та лікуванню вже в дитячому віці. Варто відзначити, що здатність дитячого організму до репарації ушкоджень набагато вища, ніж у дорослого, оскільки процеси формування функції морфогенезу ще не завершені і фармакотерапія на цьому фоні є більш успішною [9]. Недостатність даних стосовно критеріїв оцінки віддалених наслідків МС на формування репродуктивної функції і застосування лікарських засобів у дитячому і підлітковому віці обумовлює актуальність відповідних експериментальних досліджень.

Метою роботи була оцінка впливу МС, індукованого у дорослих або ювенільних щурів, на ембріо-фетальний розвиток їхнього потомства.

**Об'єкти й методи дослідження.** Для досліджень використовували дорослих самців щурів лінії Вістар з початковою масою тіла 160-180 г та щурят віком 3 тижні з початковою масою тіла 50-70 г. Крім того, для парування з самцями використовували віргінних статевозрілих самиць масою тіла 160-180 г. Тварини були надані розплідником експериментально-біологічної клініки ДУ "Інститут фармакології та токсикології НАМН України" та утримувались в стандартних умовах віварію за температури 22-24 °C та відносної вологості 30-70 %, з вільним доступом до корму та води. План досліджень був розглянутий та схвалений Комітетом з біоетики ДУ "ІФТ НАМН України"; усі процедури, пов'язані з гуманним поводженням із тваринами та їхнім використанням у експериментах, були дотримані.

Тварин було розподілено рандомізацією на 4 групи:

контроль 1 (щурята), контроль 2 (інтактні дорослі), МС 1 (щурята), МС 2 (дорослі щури).

МС відтворювали шляхом заміни питної води на 10%-ний розчин фруктози протягом 60 днів [10]. Використовували фруктозу кристалічну харчову (виробник – Туреччина, постачальник – Голландія, серія LS2P00251506-247).

Через 42 дні експерименту щурів усіх груп парували з інтактними самцями в проеструсі (у співвідношенні самець : самиця = 1 : 2) протягом 14 днів (приблизно 2-3 естральні цикли).

Самиць до самців-щурів, які споживали замість питної води 10%-ний розчин фруктози підсаджували на нічний період, тимчасово замінюючи розчин фруктози

на воду. Вранці після визначення першого дня вагітності (шляхом виявлення у вагінальних мазках сперматозоїдів) самиць розсаджували в індивідуальні клітки, а самцям знову замінювали питну воду на розчин фруктози.

Самиць піддавали евтаназії цервікальною дисплокацією на 20-й день вагітності. Після лапаротомії вилучають роги матки з яєчниками, визначали кількість живих тіл у яєчниках, місце імплантаций у матці, кількість живих плодів та таких, що є в стадії резорбції. Ці дані використовували для визначення показників до- та післяімплантаційної загибелі згідно загальноприйнятим методам [11].

Вплив препаратів на статеву поведінку та запліднюючу здатність самців-щурів визначали за величиною індексу, що виражається співвідношенням:

$$\frac{\text{число вагітних самиць}}{\text{число самиць, парованих самцями}} \times 100$$

**Статистичний аналіз результатів експерименту** проводили з використанням *t*-критерію Стьюдента. Дані представляли як середнє значення ± похибка середнього ( $M \pm m$ ). Різницю між досліджуваними показниками вважали статистично вірогідною при значенні  $p < 0,05$ .

**Результати досліджень та їх обговорення.** Спостереження за самцями щурів, з індукованим у різному віці МС не виявило будь-яких відхилень у їхній статевій поведінці. Однак, підрахунок кількості вагітних інтактних самиць, які були спаровані з самцями дослідних груп виявив значне зниження фертильності самців, у яких МС розвинувся в дорослом віці (табл. 1) З 12-и спарованих самиць завагітніло 8 (66,7 %), в той час як у контролі індекс запліднювальної здатності склав 92 %.

За умов індукції МС у ювенільному віці не спостерігали зниження запліднювальної здатності щурів-самців порівняно з контролем (табл. 1). Подібний феномен може бути проявом певних вікових адаптаційно-компенсаторних можливостей організму, що розвивається.

Важливим показником для тварин з багатоплідною вагітністю, який характеризує стан як материнського, так і батьківського організму, є плодовитість – середня кількість живих плодів на одну самицю. На останній показник можуть впливати як екзогенні, так і ендогенні фактори, змінюючи гормональний статус організму та значно знижуючи цей показник. Оцінка плодючості і результатів вагітності забезпечує оцінку ступеня ураження репродуктивної системи. Дані щодо потенційної плодючості та інших показників репродуктивної системи забезпечують найбільш багатосторонні та безпосередні уявлення стосовно репродуктивної здатності.

**Таблиця 1. Індекс запліднювальної здатності дорослих щурів самців з метаболічним синдромом та щурів з метаболічним синдромом, що розвинувся в ювенільному віці**

Група самців	Кількість спарованих самиць	Кількість вагітних самиць	Індекс запліднювальної здатності,
Дорослі щури			
Контроль	6	6	100%
Метаболічний синдром	12	8	67%
Щури пубертатного віку			
Контроль	20	17	85%
Метаболічний синдром	20	19	95%

Згідно даних, наведених у табл. 2, за умов парування інтактних самиць з самцями, в яких МС розвинувся в дорослом віці, показник їхньої плодовитості залишився на рівні відповідної контрольної групи. На відміну від

цизого показник плодовитості інтактних самиць, парованих із самцями, в яких МС індукували в ювенільному віці, знижувався на 25% порівняно з контролем.

**Таблиця 2.** Плодовитість ін tactних самиць щурів, парованих з дорослими самцями з метаболічним синдромом та щурів з метаболічним синдромом, що розвинувся в ювенільному віці (абс.,  $M \pm m$ )

Експериментальні групи	Показник	
	Загальна кількість плодів	Кількість плодів на одну самицю
<b>Дорослі щури</b>		
Контроль	55	9,2±0,5
Метаболічний синдром	75	9,4±1,3
<b>Щури пубертатного віку</b>		
Контроль	170	10±0,3
Метаболічний синдром	149	7,5±0,7*

Примітка: \* –  $p \leq 0,05$  у порівнянні з контрольною групою.

Для отримання даних стосовно впливу екзогенних та ендогенних факторів корисним є застосування тесту домінантних леталей, у якому самиці піддають евтаназії в середині третього триместру вагітності. У даному тесті визначають до- та післяімплантаційну загибель.

Рівень ембріональної смертності у самиць, запліднених самцями, які мають порушення репродуктивної системи, є одним з інтегральних показників, що характеризують генеративну функцію.

Показники ембріональної смертності в різni періоди ембріонального розвитку потомства самців, в яких в різному віці індукували розвиток метаболічного синдрому, наведені в таблицях 5 та 6.

Результати спостереження засвідчують, що у дорослих щурів з МС не відбувалося суттєвих порушень ембріо- та фетогенезу, які визначались за показниками смертності як в доімплантаційний період, так і в період після імплантації (табл. 5). Відсоток загальної смертності в цих групах знаходився практично на рівні контролю, в той час, як у самиць, спарованих із самцями, які з моменту відлучення від матерів замість питної води отримували 10%-ний розчин фруктози, спостерігали

помітне підвищення рівня доімплантацийної смертності, що склала 18 % (табл. 6). Загалом доімплантацийні втрати в цій групі були в 6 разіввищими, ніж в контролі. Щодо післяімплантацийної загибелі, то в дослідній групі вона склала 4%, на відміну від контролю, де взагалі післяімплантацийна ембріональна смертність не зафікована (табл. 5).

Враховуючи зростання до- та післяімплантацийної летальності, відповідно більшою була і загальна смертність потомства щурів-самців, у яких МС моделювали в ювенільному віці (зростання в 2,4 рази порівняно з контролем).

Варто відзначити, що однією з провідних причин загибелі ембріонів після імплантації є генетичний фактор [12]. Більшість хромосомних порушень не залежать від спадковості і виникають заново в гаметах батьків або на ранніх стадіях поділу зиготи. До 95% хромосомних і геномних мутацій призводять до переривання вагітності на різних термінах. Хромосомні аберрації в зародках можуть виникати під дією найрізноманітніших хімічних (мутагени), фізичних (опромінення, температурний шок) і біологічних (перезрівання гамет, вірусні інфекції) факторів.

**Таблиця 5.** Показники ембріо-фетального розвитку потомства дорослих щурів самців з метаболічним синдромом

Показники	Експериментальні групи	
	контроль	метаболічний синдром
Кількість парованих самиць/вагітних у групі, абс.	6 / 6	12 / 8
Загальна кількість живих тіл, абс.	58	86
Середня кількість живих тіл на самицю	9,7±0,6	10,8±0,8
Загальна кількість випадків доімплантацийної загибелі, абс./%	3 / 5,2	8 / 9,3
Середня кількість випадків доімплантацийної загибелі	0,5±0,2	1,0±0,5
Загальна кількість випадків постімплантацийної загибелі, абс./%	0 / 0	4 / 5,1
Середня кількість випадків постімплантацийної загибелі на самицю	0	0,5±0,03
Загальна смертність, %	5,1	12,8
Загальна кількість живих плодів, абс./ %	55 / 100	75 / 96,2
Середня кількість живих плодів у приплоді	9,1±0,5	9,3±1,3

Примітка: \* –  $p \leq 0,05$  у порівнянні з контрольною групою.

Мутагенез може мати екзогенне (більшість мутагенів будь-якої етіології) або ендогенне походження, головним чином, внаслідок помилок метаболізму, порушені функції генів дезактивації токсичних метаболітів (вільні радикали, перекисні сполуки і інші) або генів репарації ДНК під впливом стресу або порушень гормонального гомеостазу. Серед екзогенних факторів розглядають куріння (активне і пасивне), різні хімічні сполуки і лікарські препарати. Серед факторів ендогенної природи в

першу чергу виділяють аутоімунний тиреоїдит і цукровий діабет [13]. Отримані нами дані свідчать, що одним з подібних чинників може бути і МС.

З огляду на компенсаторні можливості організму, зміни, які можуть спостерігатись на генному рівні, часто вимагають прямого підтвердження на біохімічному та молекулярно-біологічному рівнях. Таким чином, отримані результати обґрунтують необхідність подальших поглиблених досліджень.

**Таблиця 6. Показники ембріо-фетального розвитку потомства щурів самців з метаболічним синдромом, що розвинувся в ювенільному віці**

Показники	Експериментальні групи	
	контроль	метаболічний синдром
Кількість парованих самиць/вагітних у групі, абс.	20/17	20/19
Загальна кількість живих тіл, абс.	187	183
Середня кількість живих тіл на самицю	11,0±0,3	9,6±0,4
Загальна кількість випадків доімплантаційної загибелі, абс./%	5 / 9,1	34 / 18,6
Середня кількість випадків доімплантаційної загибелі	0,3±0,1	1,8±0,4*
Загальна кількість випадків постімплантативної загибелі, абс./ %	0 / 0	6 / 4,0
Середня кількість випадків постімплантативної загибелі на самицю	0	0,3±0,1*
Загальна смертність, %	9	21,9
Загальна кількість живих плодів, абс./ %	170/100	143/95,97
Середня кількість живих плодів у приплоді	10,0±0,3	7,5±0,7*

Примітка: \* –  $p \leq 0,05$  у порівнянні з контрольною групою.

**Висновок.** Порівняльні дослідження рівня ембріональної смертності у самиць, запліднених самцями з МС, індукованим у дорослом або ювенільному віці, виявили більш серйозний вплив даного симптомокомплексу на репродуктивну систему, що розвивається. У потомства дорослих щурів не відбувалося суттєвих порушень показників ембріо- та фетогенезу, в той час як у щурів-самців з МС, що розвинувся в ювенільному віці, зафіксовано зростання рівня до- та післяімплантативної загибелі потомства. Відповідним чином за цих умов знижувалась і кількість приплоду.

#### Список використаних джерел

- Validation of metabolic syndrome score by confirmatory factor analysis in children and adults and prediction of cardiometabolic outcomes in adults / A. Viitasalo, T. A. Lakka, D. E. Laaksonen [et al.] // Diabetologia. – 2014. – V.57, №5. – P. 940–949.
- Russ K. Developmental Exposure to Environmental Chemicals and Metabolic Changes in Children / K. Russ, S. Howard // Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care. – 2016. – V. 46. – P.255-285.
- Evidence of early alterations in adipose tissue biology and function and its association with obesity-related inflammation and insulin resistance in children / K. Landgraf, D. Rockstroh, I.V. Wagner [et al.] // Diabetes. – 2015. – V.64, №4. – P. 1249-1261.
- Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 / Ng M., Fleming T., Robinson M. [et al.] // Lancet. – 2014. – V.30, №384. –P.766-781.
- Joslin E.P. Joslin's Diabetes Mellitus: Edited by C. Ronald Kahn / E.P. Joslin, C.R. Kahn. – New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2005 – 209 p.
- Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents / Weiss R., Dziura J., Burgert T.S. [et al.] // Engl. J. Med. – 2004. – V.350, №23. – P.2362-2374.
- Kumar S. Association of Male Infertility to Metabolic Syndrome and Other Related Disorders / S. Kumar, D. Agrawal, K. Sharma, T.R. Swain // J. Integr. Nephrol. Androl. – 2015. – №2. – P.107-116.
- Pervanidou P. Stress and obesity/metabolic syndrome in childhood and adolescence / P. Pervanidou, G.P. Chrousos // Int. J. Pediatr. Obes. – 2011. – №1. – P.21-28.
- Курашова Н.А. Оцінка репродуктивного потенціала мужського населення / Н.А. Курашова // Бюллетень ВСНЦ СО ПАМН. – 2014. – V.2, №96. – С.104-108.
- (-)-Epicatechin mitigates high fructose-associated insulin resistance by modulating redox signaling and endoplasmic reticulum stress / A. Bettaieb, M.A. Vazquez Prieto, C. Rodriguez Lanzi [et al.] // Free radical biology & medicine. – 2014. – №72. – P.247-256.
- Male reproductive toxicology (Chapter 16). In: Maines MD (Ed.), Current Protocols in Toxicology. – New York: John Wiley & Sons Inc., 2005. – 1099 p.
- Дурнев А.Д. Генотоксические поражения и болезни А.Д. Дурнев, А.К. Жанатаев, О.В. Шредер, В.С. Середенина // Молекулярная медицина. – 2013. – №3. – С.3-19.
- Беспалова О.Н. Генетика невынашивания беременности / О.Н. Беспалова // Журнал акушерства и женских болезней. – 2007. – №1.– С.81-95.
- Reference
- Viitasalo A, Lakka TA, Laaksonen DE, Savonen K, Lakka HM, Hassinen M et al. Validation of metabolic syndrome score by confirmatory factor analysis in children and adults and prediction of cardiometabolic outcomes in adults. Diabetologia. 2014 May; 57(5):940-9.
- Russ K, Howard S. Developmental Exposure to Environmental Chemicals and Metabolic Changes in Children. Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care. 2016 Aug; 46(8):255-85.
- Landgraf K, Rockstroh D, Wagner IV, Weise S, Tauscher R, Schwartzte JT et al. Evidence of early alterations in adipose tissue biology and function and its association with obesity-related inflammation and insulin resistance in children. Diabetes. 2015 Apr;64(4):1249-61.
- Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. Lancet. 2014 Aug 30;384(9945):766-81.
- Joslin EP, Kahn CR. Joslin's Diabetes Mellitus. New York: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
- Weiss R, Dziura J, Burgert TS, Tamborlane WV, Taksali SE, Yeckel CW. Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. N Engl J Med. 2004 Jun 3;350(23):2362-74.
- Kumar S, Agrawal D, Sharma K, Swain TR. Association of Male Infertility to Metabolic Syndrome and Other Related Disorders. J Integr Nephrol Androl. 2015; 2: 107-16.
- Pervanidou P, Chrousos GP. Stress and obesity/metabolic syndrome in childhood and adolescence. Int J Pediatr Obes. 2011 Sep;6 Suppl 1:21-8.
- Курашова Н.А. Оценка репродуктивного потенциала мужского населения. Бюллетень ВСНЦ СО ПАМН. 2014; 2(96): 104-8.
- Bettaieb A, Vazquez Prieto MA, Rodriguez Lanzi C, Miatello RM, Haj FG, Fraga CG, Oteiza PI. (-)-Epicatechin mitigates high fructose-associated insulin resistance by modulating redox signaling and endoplasmic reticulum stress. Free Radic Biol Med. 2014 Jul;72:247-56.
- Male reproductive toxicology (Chapter 16). In: Maines MD (Ed.), Current Protocols in Toxicology. New York: John Wiley & Sons Inc.; 2005.
- Дурнев АД, Жанатаев АК, Шредер ОВ, Середенина ВС. Генотоксические поражения и болезни. Молекулярная медицина. 2013; 3:3-19.
- Беспалова ОН. Генетика невынашивания беременности. Журнал акушерства и женских болезней. 2007; 1:81-95.

Надійшла до редакції 20.10.16

О.Ткаченко, асп., В. Коваленко, д-р біол. наук, проф.  
ГО "Інститут фармакології та токсикології НАМН України", Київ, Україна

## ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА НА ЭМБРИО-ФЕТАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ ПОТОМСТВА САМЦОВ КРЫС

*Сравнительные исследования уровня эмбрио-фетальной смертности у самок, оплодотворенных самцами с метаболическим синдромом (МС), индуцированным во взрослом или ювенильном возрасте обнаружили, что у потомства взрослых крыс не происходило существенных нарушений эмбрио- и фетогенеза. У крыс-самцов с МС, развившимся в ювенильном возрасте, доимплантационные потери были в 6 раз выше, чем в контроле; зафиксировано 4% послеимплантационной гибели; соответственно, общая смертность потомства возрастала в 2,4 раза по сравнению с контролем.*

**Ключевые слова:** метаболический синдром, крысы, ювенильный возраст, эмбрио-фетальное развитие

O. Tkachenko PhD., V. Kovalenko DSc, prof.

State Institution "Institute of Pharmacology and Toxicology of NAMS of Ukraine", Kiev, Ukraine

### AGE FEATURES OF INFLUENCE METABOLIC SYNDROME ON FETAL EMBRYONIC DEVELOPMENT OF THE OFFSPRING OF MALE RATS

*Comparative study of embryo-fetal death in females fertilized by males with metabolic syndrome, induced in adult or juvenile age has shown that the offspring of adult rats did not have significant abnormalities in embryo- and fetogenesis. At the same time it has been revealed 4% post-implantation death of offspring in male rats with metabolic syndrome induced in the juvenile age. The pre-implantation loss in this group was 6 folds higher than in control. Accordingly, the total mortality of the offspring rose 2.4 times in comparison with control.*

**Key words:** metabolic syndrome, rats, embryo- and fetogenesis.

UDK577.121.7:616-056.52

A. Aleksandrov, PhD stud., T.Ishchuk, PhD, V. Konopelnyuk, PhD, O. Scopenko, PhD  
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

### AMINO ACIDSLEVELS IN RATS UNDER PROGESTERONE LONG-TERM ADMINISTRATION

*Amino acids levels in blood serum of rats under progesterone long-term administration have been determined. The studies show that levels of most amino acids content decrease in rats under progesterone long-term administration compared with control group of rats. Obtained data give evidence that progesterone long-term administration significantly influence on amino acids metabolism.*

**Key words:** amino acids, progesterone, obesity.

**Introduction.** The rising prevalence of overweight and obesity is a major global health challenge and concern. Obesity has become a global epidemic and threat to public health [1]. Analysis of the Global Burden of Disease study 2013 revealed that during the last three decades, the prevalence of overweight and obesity rose 27.5 % in adults and 47.1 % in children [2]. The prevalence of obesity is highest in the developed countries; however, almost two thirds of the obese population live in developing countries [3].

The development of obesity requires a persistent state of positive energy balance [4,5]. Antioesity strategies need to overcome the strong homeostatic mechanisms driving reduced energy expenditure. Accordingly, much effort has been devoted in this front during the last two decades, with the recognition of the major metabolic roles of numerous neuropeptides and transmitters, as well as multiple peripheral hormones [6-8], not only in the regulation of feeding, but also in the modulation of energy expenditure.

The use of drugs based on steroid hormones, particularly progesterone, can be one of many factors contributing to obesity. It is known that progesterone, which enters the female body artificially leads to fat accumulation effect. Ovarian steroids, such as progesterone, control a vastness of physiological processes, such as puberty, reproduction, growth, development and metabolic rate. In addition, some reports suggest the use of progesterone-containing preparations as contraceptive or for the hormone replacement therapy to cause sufficient weight gain by causing hyperphagia and increased fat deposition in the body [9]. A lack of the accurate and scientifically recognized explanation of the mechanism of the body fat increase causes a difficult situation being currently present in the obesity treatment.

Amino acids, especially Branched-chain (BCAAs) amino acids, are critical nutrient signals that affect metabolism, either directly or indirectly. It has been shown that a positive association exists between a BCAA-rich diet and metabolic health, including the regulation of body weight, muscle protein synthesis, and glucose homeostasis [10,11]. In spite of the positive effects of BCAAs on metabolic health, an elevation in the level of BCAAs correlates with an increasing risk of insulin resistance (IR) and type 2 diabetes mellitus (T2DM) in humans and in rodent models [12]. Despite the positive effects of BCAAs on metabolism, the strong association of BCAA levels with insulin resistance and metabolic syndrome suggests that increased levels of

BCAAs may cause insulin resistance and T2DM, although this remains a speculation for now. The mechanism underlying that correlation is not yet fully understood.

In this study, we search changes of amino acids levels of rats under progesterone administration.

**Materials and methods.** Research was conducted in compliance with the standards of the Convention on Bioethics of the Council of Europe's 'Europe Convention for the Protection of Vertebrate Animals' used for experimental and other scientific purposes' (1997). The general ethical principles of animal experiments, approved by the First National Congress on Bioethics Ukraine (September 2001) and other international agreements and national legislation in this field. Animals were kept in a vivarium that was accredited in accordance with the 'standard rules on ordering, equipment and maintenance of experimental biological clinics (vivarium)'. Instruments to be used for research are subject to metrological control.

The present study used white nonlinear female rats weighing  $210 \pm 20$  g at the beginning of experiment.. The animals of each experimental group were housed in polypropylene cages in an environmentally controlled clean air room, with a temperature of  $22 \pm 3$  C, a 12 h light/12 h dark cycle and a relative humidity of  $60 \pm 5\%$ . Studies were conducted on 20 rats that were divided into two groups of 10 animals each: 1 – control group; 2 – progesterone-induced obese group.

Progesterone oil solution (Biopharma, Kyiv, Ukraine) was administered in the dorsal neck region of rats (10 mg/kg body weight, treated daily for 28 days) to modulate obesity. Rats belonged to the control group were injected with the oil used for the progesterone administration. To confirm the development of obesity, we have determined the body mass index and Li index. Blood serum was taken after the 28 days of progesterone injection to determine amino acids levels.

Amino acids blood serum levels were determined by using of ion exchange chromatography analyzer (Spekman, Stein, Moore).

Statistical analysis of data was carried out by the software package 'Statistica7.0'. For the analysis of data distribution type, Shapiro-Wilks criterion was used. As the data were normally distributed, we used Student's t test for independent samples. Mean values (M) and standard deviations (SD) were calculated. Significant difference was considered at  $p \leq 0.05$ .

**Results and discussion.** We determined amino acids levels of the rats under progesterone long-term administration. BCAA is about 40% of the essential amino acids and 35% of muscle amino acids. Part of BCAA in hormonal regulation processes is very important. This amino acids increase secretion of insulin by pancreatic  $\beta$ -cells and

activate mTOR signal transduction pathway. Accordingly, measure of serum BCAA levels was the first stage of our investigations. It has been established that valine, leucine levels in the experimental group were in 1.58, 1.5 times lower than that of the control group. Isoleucine level was not significantly changed (Fig. 1).

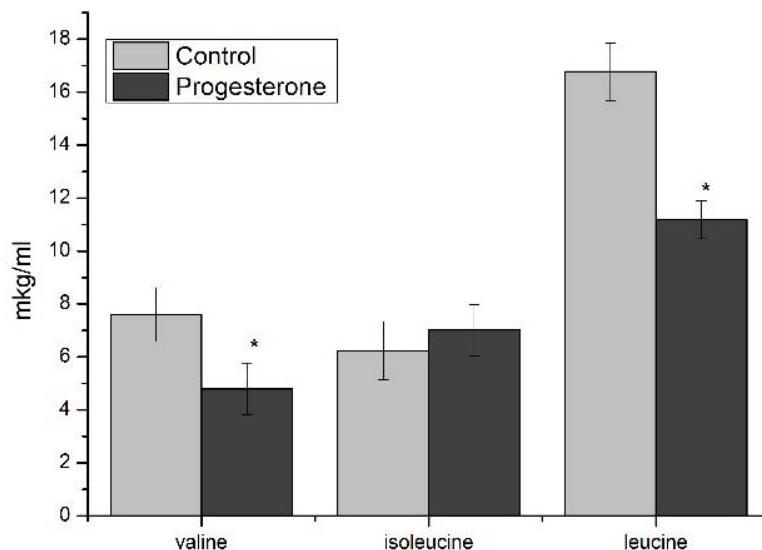


Fig. 1. Valine, isoleucine, leucine levels in serum of rats under progesterone long-term administration compared to the control group

Data are shown as the mean  $\pm$  SD of 10 animals; asterisk (\*),  $p < 0.05$  in comparison with control group

Despite the negative effects of BCAAs on metabolism, the strong association of BCAA levels with insulin resistance and metabolic syndrome elevating the level of BCAA lead to positive effects that improve metabolic parameters such as body composition, glycaemia levels, and satiety. Hypothalamic leucine is a potential nutrient signal that may reduce food intake by activating mammalian target of rapamycin (mTOR) [13]. BCAAs control hormone release in both the gastrointestinal tract and in fat deposits. Treatment with leucine for six weeks increased adiponectin

and decreased cholesterol in the plasma of previously obese mice, without changing body weight or fat mass [14]. Considering that BCAAs are essential amino acids that cannot be synthesized de novo in organisms. The level of circulating BCAAs could be contributed to by dietary intake and by degradation of protein in tissue.

The next stage of our work was to analyze the content of lysine and other essential amino acids. These changes in comprising with control group were shown on the Fig. 2.

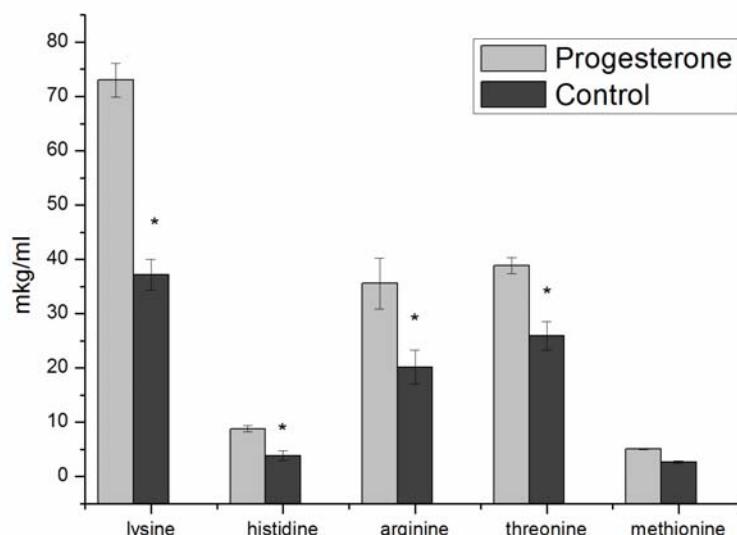


Fig. 2. Lysine, histidine, arginine, threonine, methionine levels in serum of rats under progesterone long-term administration compared to the control group

Data are shown as the mean  $\pm$  SD of 10 animals; asterisk (\*),  $p < 0.05$  in comparison with control group

Investigations were shown decrease concentration of lysine in blood serum of rats that were administrated by progesterone in 1,58 time compared with control group of animals. Also, long-term progesterone administration have led to decreasing of histidine and arginine contains in 1,5 and 1.96 times respectively.

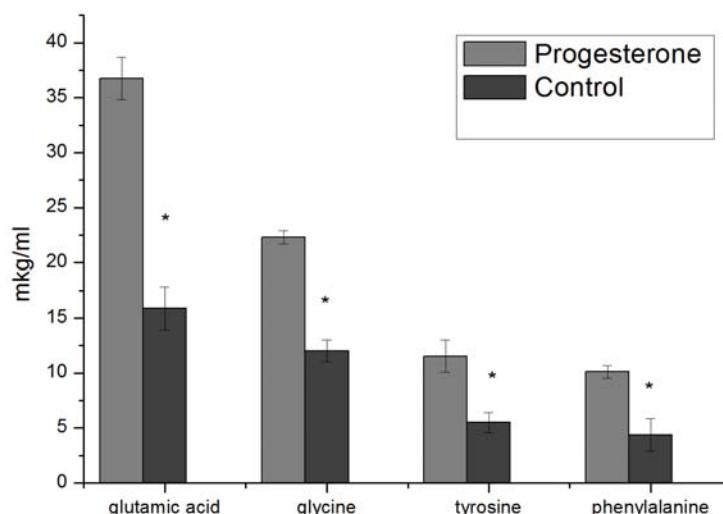
Investigations of threonine blood serum concentration were shown decreasing of this index in group of animal with progesterone induced obesity in 2,27 time compared with control group (Fig.2). Also, decrease of methionine concentration has been shown.

Decrease of essential amino acids levels in blood serum of animals under long-term administration of progesterone correlated with previous studies [15].

Consistent with these results, other studies were shown that total body fat was decreased significantly by deprivation of Phe, Thr, Trp or Met in comparison with the control mice. Deficiency of any of these five EAAs for 7 days resulted in significant reduction in body weight, to the smallest extent by Lys deprivation. Similar changes

were observed for abdominal fat mass [15]. There was report about increase in the concentration of l-homo arginine (hArg) in the maternal plasma during human pregnancy. This observation, along with a well-known function of h-Arg, the methylene homologue of l-arginine (Arg), as a substrate for nitric oxide (NO) synthase, was the ignition for the start of intense research on the physiology and pathology of h-Arg. The circulating concentration of h-Arg was found to be low in patients suffering from various diseases, and h-Arg emerged as a very few years as a novel cardiovascular risk factor [16]. Concentration of progesterone also increases during the pregnancy. This natural correlation can explain effects of progesterone long-term administration on hArg and Arg levels.

Aromatic amino acids contain an important index in diagnostics of numbers of diseases. Thus, the next stage of our work was investigating of aromatic amino acids concentrations in blood serum of rats under artificial progesterone-induced obesity (Fig.3).



**Fig. 3. Glutamic acid, glycine, tyrosine, phenylalanine levels in serum of rats under progesterone long-term administration compared to the control group**

Data are shown as the mean  $\pm$  SD of 10 animals; asterisk (\*),  $p < 0.05$  in comparison with control group

28-days progesterone administration have led to decrease of phenylalanine content at 1,5 compared with control group. Investigation of histidine blood serum content have shown decrease of this index in 1,9 time. Decrease of tyrosine blood serum content at 2,3 time have been shown.

Aromatic amino acids are the substrates for synthesis of neurotransmitters. Changes of content of aromatic amino acids can be as a result of dysfunction of synthesis of this neurotransmitters. Significant decrease of some amino acids, in particular BCAAs and aromatic, can show disorders of transport processes and metabolism of amino acids. This, directly or mediated, leads to disorders in a row of neurotransmitters and hormonal systems. Cut off of increase of content of a row of amino acid, in particular BCAA aromatic, can specify on credible violation of mechanisms of transport and metabolism of amino acid, that straight and mediated can result in a disbalance in process row of neuropeptidornikh and hormonal systems.

Cutoff of increase of content of a row of amino acid, in particular BCAA aromatic, can specify on credible violation of mechanisms of transport and metabolism of amino acid,

that straight and mediated can result in a disbalance in process row of neuropeptidornikh and hormonal systems.

Recent study was shown that dietary methionine restriction produces a highly beneficial metabolic profile by increasing energy expenditure, limiting fat deposition, and enhancing insulin sensitivity [17]. That work makes a compelling case that liver and adipose tissue are key targets of the diet, where the transcriptional responses effectively remodel the integration of lipid metabolism between the two tissues. For example, the MR diet diminishes the capacity of the liver to synthesize and export lipid, while simultaneously increasing these functions in white adipose tissue.

This results show significant influence of long-term progesterone administration on blood serum levels of most amino acids.

#### Reference

1. Swinburn B.A. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments / Swinburn B.A., Sacks G., Hall K.D., McPherson K., Finegood D.T., Moodie M.L. et al. // Lancet. – 2011. – 378(9793). – P. 804–14.
2. Ng M. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 / Ng M., Fleming T., Robinson M.,

- Thomson B., Graetz N., Margono C., et al. // Lancet. – 2014. – 384(9945). – P. 766–81.
3. Alexandratos N. World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision // Alexandratos N., Bruinsma J. // Rome: FAO – 2012.
  4. Friedman J.M. A war on obesity, not the obese / Friedman J.M. // Science. – 2003. – 299. – P. 856–858.
  5. Farooqi S. Genetics of obesity in humans / Farooqi S., O'Rahilly S. // Endocr Rev. – 2006–27. – P. 710–718.
  6. Gautron L. Neural Control of Energy Balance: Translating Circuits to Therapies / Gautron L., Elmquist J.K., Williams K.W. // Cell. – 2015. – 161. – P. 133–145.
  7. Loh K., Herzog H., Shi Y.C. Regulation of energy homeostasis by the NPY system / Loh K., Herzog H., Shi Y.C. // Trends Endocrinol Metab. 2015 – 26. – P. 125–135.
  8. Scott M.M. Central regulation of food intake, body weight, energy expenditure, and glucose homeostasis / Scott M.M., Xu Y., Elias C.F. et al. // Front Neurosci. – 2014 – 8. – P. 384.
  9. Amatayakul K. A study of the mechanism of weight gain in medroxyprogesterone acetate users / Amatayakul K., Sivasomboon B., Thanangkul O. // Contraception – 1980. – 22. – P. 605–22.
  10. Lynch C.J. Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance / Lynch C.J., Adams S.H. // Nat. Rev. Endocrinol. – 2014. – 10. – P. 723–736.
  11. Wang T.J. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes / Wang T.J., Larson, M.G., Vasan R.S., Cheng S., Rhee E.P., McCabe E., Lewis G.D., Fox C.S., Jacques P.F., Fernandez C., et al. // Nat. Med. – 2011 – 17 – P. 448–453.
  12. Giesbertz P. Branched-chain amino acids as biomarkers in diabetes / Giesbertz P., Daniel H. // Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care – 2016 – 19 – P. 48–54.
  13. Cota D. Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake / Cota D., Proulx K., Smith K.A., Kozma S.C., Thomas G., Woods S.C.; Seeley R.J. // Science – 2006 – 312 – P. 927–930.
  14. Torres-Leal F.L. Leucine supplementation improves adiponectin and total cholesterol concentrations despite the lack of changes in adiposity or glucose homeostasis in rats previously exposed to a high-fat diet / Torres-Leal F.L., Fonseca-Alaniz M.H., Teodoro G.F., de Capitani M.D., Vianna D., Pantaleão L.C., Matos-Neto, E.M., Rogero M.M., Donato J., Tirapegui J. // Nutr. Metab. – 2011 – 8 – P. 62.
  15. Fei Xiao. Essential amino acids and lipid metabolism / Fei Xiao, Ying Du, Ziquan Lv, Shanghai Chen, Jianmin Zhu, Hongguang Sheng, Feifan Guo // Society for Endocrinology. – 2016, preprint.
  16. Dimitrios T. Homoarginine, arginine, and relatives: analysis, metabolism, transport, physiology, and pathology / Dimitrios T., Guoyao W. // Amino Acids. – 2015. – 47. – P. 1697–1702.
  17. Kirsten P. Compromised responses to dietary methionine restriction in adipose tissue but not liver of ob/ob mice / Kirsten P., Desiree W., Lucie F., Stephen B., Philipp E., Thomas W. // Obesity (Silver Spring). – 2015. – 23(9). – P. 1836–1844.

#### References (Scopus)

1. Swinburn B.A., Sacks G., Hall K.D., McPherson K., Finegood D.T., Moodie M.L., et al. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. Lancet. 2011;378(9793):804–14.
2. Ng M., Fleming T., Robinson M., Thomson B., Graetz N., Margono C., et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. Lancet. 2014;384(9945):766–81.
3. Alexandratos N., Bruinsma J. World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision. Rome: FAO; 2012.
4. Friedman J.M. A war on obesity, not the obese. Science. 2003;299: 856–858.
5. Farooqi S., O'Rahilly S. Genetics of obesity in humans. Endocr Rev. 2006;27: 710–718.
6. Gautron L., Elmquist J.K., Williams K.W. Neural Control of Energy Balance: Translating Circuits to Therapies. Cell. 2015;161: 133–145.
7. Loh K., Herzog H., Shi Y.C. Regulation of energy homeostasis by the NPY system. Trends Endocrinol Metab. 2015;26: 125–135.
8. Scott M.M., Xu Y., Elias C.F. et al. Central regulation of food intake, body weight, energy expenditure, and glucose homeostasis. Front Neurosci. 2014;8: 384.
9. Amatayakul K., Sivasomboon B., Thanangkul O. A study of the mechanism of weight gain in medroxyprogesterone acetate users. Contraception 1980;22:605–22.
10. Lynch C.J., Adams, S.H. Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. Nat. Rev. Endocrinol. 2014; 10: 723–736.
11. Wang T.J., Larson M.G., Vasan R.S., Cheng S., Rhee E.P., McCabe E., Lewis G.D.; Fox C.S., JacquesP.F., Fernandez C., et al. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. Nat. Med. 2011; 17: 448–453.
12. Giesbertz P., Daniel H. Branched-chain amino acids as biomarkers in diabetes. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. 2016; 19: 48–54.
13. Cota D., Proulx K., Smith K.A., Kozma S.C., Thomas G., Woods S.C., Seeley R.J. Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. Science. 2006; 312: 927–930.
14. Torres-Leal F.L., Fonseca-Alaniz M.H., Teodoro G.F., de Capitani M.D., Vianna D., Pantaleão L.C., Matos-Neto, E.M., Rogero M.M., Donato J., Tirapegui J. Leucine supplementation improves adiponectin and total cholesterol concentrations despite the lack of changes in adiposity or glucose homeostasis in rats previously exposed to a high-fat diet. Nutr. Metab. 2011; 8: 62.
15. Fei Xiao, Ying Du, Ziquan Lv, Shanghai Chen, Jianmin Zhu, Hongguang Sheng and Feifan Guo. Essential amino acids and lipid metabolism. Society for Endocrinology 2016, preprint.
16. Dimitrios Tsikas, Guoyao Wu. Homoarginine, arginine, and relatives: analysis, metabolism, transport, physiology, and pathology. Amino Acids. 2015; 47:1697–1702.
17. Kirsten P. Stone1, Desiree Wanders1, Lucie F. Calderon1, Stephen B. Spurgin2, Philipp E. Scherer2, and Thomas W. Gettys. Compromised responses to dietary methionine restriction in adipose tissue but not liver of ob/ob mice. Obesity (Silver Spring). 2015; 23(9): 1836–1844.

Надійшла до редколегії 25.10.16

А. Александров, асп., В. Конопельнюк, канд. біол. наук, О. Скопенко, канд. біол. наук, Т. Іщук, канд. біол. наук  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

## ВМІСТ АМІНОКИСЛОТ У ЩУРІВ ЗА УМОВ ДОВГОТРИВАЛОГО ВВЕДЕННЯ ПРОГЕСТЕРОНУ

*Було визначено рівень амінокислот у сироватці крові щурів за умов розвитку ожиріння, індукованого введенням прогестерону. Дослідження показали, що має місце зниження рівнів більшості амінокислот сироватки крові щурів хворих ожирінням, яке було індуковане введенням прогестерону, у порівнянні зі здорововою контрольною групою щурів. Отримані дані свідчать про те, що довготривале введення прогестерону значно впливає на метаболізм амінокислот.*

**Ключові слова:** амінокислоти, прогестерон, ожиріння.

А. Александров, асп., В. Конопельнюк, канд. біол. наук, О. Скопенко, канд. біол. наук, Т. Іщук, канд. біол. наук  
Київський національний університет імені Тараса Шевченко, Київ, Україна

## СОДЕРЖАНИЕ АМИНОКИСЛОТ У КРЫС В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ПРОГЕСТЕРОНА

*Было определено уровень аминокислот в сыворотке крови крыс при условиях развития ожирения, индуцированного введением прогестерона. Исследования показали, что имеет место снижение уровней большинства аминокислот в сыворотке крови крыс больных ожирением, которое индуцировалось введением прогестерона, в сравнении со здоровой контрольной группой крыс. Полученные данные свидетельствуют о том, что длительное введение прогестерона значительно влияет на метаболизм аминокислот.*

**Ключевые слова:** аминокислоты, прогестерон, ожирение.

УДК 577.1

К. Дворщенко, д-р біол. наук, А. Драницяна, канд. біол. наук,  
 Є. Торгало, канд. біол. наук, О. Короткий, канд. біол. наук,  
 Т. Берегова, д-р біол. наук  
 Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

## ПОКАЗНИКИ ПРОТЕЇНОВОГО ОБМІNU У КРОВІ ЩУРІВ ПРИ ВИВЧЕННІ ХРОНІЧНОЇ ТОКСИЧНОСТІ КОМПОЗИЦІЇ НА ОСНОВІ МЕЛАНІНУ

**Досліджено хронічну токсичність композиції на основі меланіну на показники протеїнового обміну у сироватці крові щурів обох статей. Встановлено, що при дії меланіну у терапевтичній дозі 0,3 мг×кг<sup>-1</sup> протягом 90 діб у сироватці крові самців і самиць щурів концентрація загального білка, альбуміну, сечовини та активність аланінаміотрансферази і аспартатаміотрансферази залишається в межах контрольних значень. Показано, що при дії меланіну у десятикратній терапевтичній дозі 3 мг×кг<sup>-1</sup> протягом 90 діб у сироватці крові самиць активність аланінаміотрансферази зростає в 1,36 раза, вісі інші досліджені показники у самців та самок знаходяться на контрольному рівні.**

**Ключові слова:** хронічна токсичність, меланін, протеїновий обмін.

**Вступ.** На сьогоднішній день інтерес науковців привертає до себе пошук високоефективних препаратів на основі похідних поліфенольних сполук, які можуть бути використані у лікуванні та профілактиці ряду захворювань [3, 10]. Серед них перспективне місце займають меланіни, які володіють антибактеріальними, протизальпіними та антиоксидантними властивостями. До меланінів належать пігменти різноманітної структури, які в залежності від їх джерела походження поділяють на п'ять основних типів: тваринні, рослинні, грибні, бактеріальні та синтетичні [6, 7, 13]. У наших експериментах було досліджено меланін, продуcentом якого є дріжджеподібні гриби *Nadsoniella nigra* штам X1, що були висіяні із зразків вертикальних скель о. Галіндез (Українська Антарктична станція академік Вернадський).

Одним з перших етапів вивчення нових препаратів є проведення доклінічних досліджень на лабораторних тваринах з метою виявлення можливих загальних токсичних ефектів. Метою нашої роботи було дослідити хронічну токсичність композиції на основі меланіну на ряд показників протеїнового обміну у крові щурів.

**Матеріали та методи.** У роботі дотримувалися міжнародних рекомендацій стосовно проведення медико-біологічних досліджень з використанням тварин згідно Європейської конвенції (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes). У дослідах використовували 60 білих нелінійних статевозрілих щурів обох статей з початковою вагою 180-200 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію.

Для проведення досліджень тварин було поділено на три експериментальні групи: перша – контроль: щурам вводили воду у об'ємі 1 мл×кг<sup>-1</sup> (10 самців і самок), друга – щурам вводили меланін у терапевтичній дозі 0,3 мг×кг<sup>-1</sup>, розчинений у воді у об'ємі 1 мл×кг<sup>-1</sup> (10 самців і самок) та третя група – щурам вводили меланін у десятикратній терапевтичній дозі – 3 мг×кг<sup>-1</sup>, розчинений у воді у об'ємі 1 мл/кг (10 самців і самок). Препарати вводили щоденно протягом 90 діб. В ході експерименту кожний день проводили спостереження за загальним станом тварин, їх поведінкою та споживанням корму та води. Щотижня здійснювали загальний огляд тварин: оцінювали масу тіла щурів, вимірювали температуру, визначали стан шерстного покриву, шкірних і слизових покривів, наявність новоутворень і нехарактерних виділень, чутливості периферійних нервів. На 90-й день після початку введення композиції проводили забій

тварин. Щурів умертвляли методом транслокальної дислокації шийних хребців.

Для біохімічних досліджень використовували сироватку крові, в якій визначали наступні показники. Концентрацію альбуміну вимірювали спектрофотометрично за поглинанням продукту реакції з бромкрезоловим зеленим у слабокислом середовищі [2]. Загальний вміст білку у пробах визначали за методом Лоурі [8]. Концентрацію сечовини встановлювали діацетилмонооксимним колориметричним методом [1]. Активність аланінаміотрансферази (АлАТ) та аспартатаміотрансферази (АсАТ) визначали за методом Райтмана-Френкеля [9].

Статистичну обробку результатів дослідження проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Вірогідність різниці між контрольними та дослідними вимірами оцінювали методом однофакторного дисперсійного аналізу. Вірогідною вважали різницю  $p < 0,05$ . Дані представлено як середнє арифметичне ( $M$ ) та його стандартна похибка ( $m$ ):  $M \pm m$ .

**Результати та їх обговорення.** При дослідженні композиції на основі меланіну на показники протеїнового обміну визначали концентрацію протеїнів плазми (загальний білок, альбумін), вміст яких відображає функціональний стан печінки та її протеосинтетичну здатність, та концентрацію сечовини – кінцевого продукту азотистого обміну, яка дає інформацію про стан екскреторно-видільної функції нирок та детоксикаційної здатності печінки [11].

Результати біохімічних досліджень сироватки крові показали, що за умов введення меланіну щурам у терапевтичній дозі 0,3 мг×кг<sup>-1</sup> та десятикратній терапевтичній дозі 3 мг×кг<sup>-1</sup> протягом 90 діб концентрація загального білку як у самців, так і самок не змінювалася і була в межах контрольних значень (табл. 1). За даних експериментальних умов виявлено, що при дії композиції на основі меланіну у десятикратній терапевтичній дозі 3 мг×кг<sup>-1</sup> концентрація альбуміну у крові щурів самців та самиць залишається в межах фізіологічної норми (табл. 1).

Для дослідження стану функції печінки та нирок було визначено вміст сечовини, яка утворюється в гепатоцитах при зневоджененні аміаку. Аналіз вмісту сечовини у сироватці крові вказує, що введення композиції на основі меланіну у терапевтичній та десятикратній терапевтичній дозі в досліджуваний часовий інтервал суттєво не впливав на функціональну активність даних органів (табл. 1).

**Таблиця 1.** Показники протеїнового обміну у сироватці крові щурів при дослідженні хронічної токсичності композиції на основі меланіну, ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )

Досліджуваний параметр		Загальний білок, $\text{г} \times \text{л}^{-1}$	Альбумін, $\text{г} \times \text{л}^{-1}$	Сечовина, $\text{ммоль} \times \text{л}^{-1}$
Група тварин	самки	$81,75 \pm 7,96$	$33,42 \pm 2,73$	$6,09 \pm 5,16$
	самці	$81,71 \pm 8,04$	$31,94 \pm 2,61$	$7,76 \pm 7,19$
меланін, $0,3 \text{ мг} \times \text{kg}^{-1}$	самки	$84,42 \pm 8,27$	$36,31 \pm 3,49$	$5,54 \pm 5,15$
	самці	$87,23 \pm 8,18$	$32,84 \pm 2,82$	$6,47 \pm 6,16$
меланін, $3 \text{ мг} \times \text{kg}^{-1}$	самки	$87,31 \pm 8,19$	$38,91 \pm 3,47$	$6,02 \pm 5,48$
	самці	$82,67 \pm 7,15$	$36,52 \pm 2,92$	$7,06 \pm 6,82$

Важливими показниками ураження тканин внутрішніх органів є активність цитозольних ензимів у сироватці крові. До цієї групи належать аланінамінотрансфераза та аспартатамінотрансфераза, активність яких дозволяє визначити рівень пошкоджень та встановити комплексну реакцію органів на різноманітні терапевтичні засоби [4]. При пошкодженні або руйнуванні клітин під дією токсичних або інфекційних факторів порушується енергетичний метаболізм, що призводить до зростання проникності клітинних мембрани та вивільненню ензимів у кров. Ступінь підвищення активності ензимів вказує на інтенсивність цитолітичного синдрому. Рівень активності аланінамінотрансферази є більш специфіч-

ним для уражень печінки, тоді як аспартатамінотрансферази – для пошкоджень міокарду [5, 12].

Тому при вивченні хронічної токсичності меланіну на організм щурів ми визначали активність амінотрансфераз в сироватці крові. Виявлено, що при введенні меланіну щурам-самицям у терапевтичній дозі  $0,3 \text{ мг} \times \text{kg}^{-1}$  активність аланінамінотрансферази знаходиться в межах контрольних значень, але при дії досліджуваної композиції у десятикратній терапевтичній дозі  $3 \text{ мг} \times \text{kg}^{-1}$  спостерігається збільшення активності ензиму в 1,36 раза (табл. 2). У самців за даних експериментальних умов не було виявлено суттєвих відхилень в активності аланінамінотрансферази у сироватці крові.

**Таблиця 2.** Активність амінотрансфераз у сироватці крові щурів при дослідженні хронічної токсичності композиції на основі меланіну, ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )

Досліджуваний параметр		Аланінамінотрансфераза, $\text{од} \times \text{л}^{-1} \times \text{мг білка}^{-1}$	Аспартатамінотрансфераза, $\text{од} \times \text{л}^{-1} \times \text{мг білка}^{-1}$
Група тварин	самки	$72,21 \pm 6,46$	$205,13 \pm 18,87$
	самці	$69,32 \pm 5,75$	$217,27 \pm 19,42$
меланін, $0,3 \text{ мг} \times \text{kg}^{-1}$	самки	$73,45 \pm 6,98$	$227,92 \pm 20,79$
	самці	$74,21 \pm 6,84$	$243,63 \pm 22,14$
меланін, $3 \text{ мг} \times \text{kg}^{-1}$	самки	$97,91 \pm 8,45$	$234,61 \pm 21,85$
	самці	$74,75 \pm 6,85$	$219,15 \pm 20,59$

Примітка: \* -  $p < 0,05$  порівняно з контролем.

При визначенні активності аспартатамінотрансферази у сироватці крові щурів обох статей як при введенні терапевтичної, так і десятикратної терапевтичної дози композиції на основі меланіну, не спостерігалось відхилень досліджуваного показника від фізіологічних значень (табл. 2).

Таким чином, на підставі проведених досліджень по вивченню хронічної дії композиції на основі меланіну можна зробити висновок, що меланін у терапевтичній дозі  $0,3 \text{ мг} \times \text{kg}^{-1}$  протягом 90 діб не впливає на функціональну активність печінки та нирок, які відповідають за протеосинтетичну, детоксикаційну та ексcretорно-поглинальну функції. Також встановлено, що досліджувана композиція у терапевтичній дозі при хронічній дії на організм щурів не викликає деструктивних процесів у внутрішніх органах, зокрема в печінці, про що свідчить фізіологічний рівень у крові активності трансаміназних ензимів (АлАТ і АсАТ). Разом з тим, при дії композиції на основі меланіну у десятикратній терапевтичній дозі  $3 \text{ мг} \times \text{kg}^{-1}$  протягом 90 діб у сироватці крові спостерігається гендерні відмінності: у самиць щурів відмічається незначне підвищення активності АлАТ, в той час як у самців всі досліджувані параметри залишаються на контрольному рівні. Отже, композиція на основі меланіну у терапевтичній дозі не виявляє токсичних властивостей по відношенню до фізіологічного функціонування організму та є безпечною у використанні.

#### Список використаних джерел

- Breinek P. Determination of urea using diacetylmonooxim with out deproteinization in a sulfuric acid medium / Breinek P., Bouda J. // Vnitr. Lek. – 1970. – Vol.16, №2. – P. 188-192.

- Doumas B. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromcresol green / Doumas B., Watson W., Biggs H. // Clin. Chim. Acta. – 1971. – Vol.31, №1. – P. 87-96.

- Fukuchi K. Antiviral and antitumor activity of licorice root extracts / Fukuchi K., Okudaira N., Adachi K. et al. // In Vivo. – 2016. – Vol. 11-12, №30(6). – P. 777-785.

- Hoekstra L.T. Physiological and biochemical basis of clinical liver function tests: a review / Hoekstra L.T., de Graaf W., Nibourg G.A. et al. // Ann. Surg. – 2013. – Vol. 257, №1. – P. 27-36.

- Kim W.R. Serum activity of alanine aminotransferase (ALT) as an indicator of health and disease / Kim W.R., Flamm S.L., Di Bisceglie A.M., Bodenheimer H.C // Hepatology. – 2008. – Vol. 47, №4. – P. 1363-1370.

- Kumar C.G. Physicochemical characterization and antioxidant activity of melanin from a novel strain of Aspergillus brigheri ICTF-201/ Kumar C.G., Mongolia P., Pombalaneth S. et al. // Lett. Appl. Microbiol. – 2011. – Vol. 53, №3. – P. 350-358.

- Kurian N.K. Evaluation of Anti-inflammatory property of Melanin from marine Bacillus sp BT CZ31/ Kurian N.K., Nair H.P., Bhat S.G. // Asian Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. – 2015. – Vol. 8, Issue 3. – P. 251-255.

- Lowry O.H. Protein measurement with Folin phenol reagent / Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randal R.I. // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193, №1. – P. 265-275.

- Reitman S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transminases / Reitman S., Frankel S. // Am. J. Clin. Pathol. – 1957. – Vol. 28, №1. – P. 56-63.

- Sharma S. Antioxidant and hepatoprotective effect of polyphenols from apple pomace extract via apoptosis inhibition and Nrf2 activation in mice/ Sharma S., Rana S., Patial V. et al. // Human and Experimental Toxicology. – 2016. – Vol. 35. – P. 1264 – 1275.

- Vernetti L.A. A human liver microphysiology platform for investigating physiology, drug safety, and disease models / Vernetti L.A., Senutovitch N., Boltz R. et al. // Experimental Biology and Medicine. – 2016. – Vol. 241. – P. 101-114.

- Weng S.F. The value of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase in cardiovascular disease risk assessment / Weng S.F., Kai J., Guha I.N., Qureshi N. // Open Heart. – 2015. – Vol. 2. – P. e000272.

- Ye M. Physicochemical characteristics and antioxidant activity of arginine-modified melanin from Lachnum YM-346 / Ye M., Wang Y., Guo G.Y., et al. // Food Chem. – 2012. – Vol. 135, №4. – P. 2490-2497.

**Reference**

1. Breinek P., Bouda J. Determination of urea using diacetylmonooxim without deproteinization in a sulfuric acid medium // Vnitr. Lek. – 1970. – Vol.16, №2. – P. 188-192.
2. Doumas B., Watson W., Biggs H. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromcresol green // Clin. Chim. Acta. – 1971. – Vol.31, №1. – P. 87-96.
3. Fukuchi K., Okudaira N., Adachi K. et al. Antiviral and antitumor activity of licorice root extracts // In Vivo. – 2016. – Vol. 11-12, №30(6). – P. 777-785.
4. Hoekstra L.T., de Graaf W., Nibourg G.A. et al. Physiological and biochemical basis of clinical liver function tests: a review // Ann. Surg. – 2013. – Vol. 257, №1. – P. 27-36.
5. Kim W.R., Flamm S.L., Di Bisceglie A.M., Bodenheimer H.C. Serum activity of alanine aminotransferase (ALT) as an indicator of health and disease // Hepatology. – 2008. – Vol. 47, №4. – P. 1363-1370.
6. Kumar C.G., Mongolla P., Pombalaneth S. et al. Physicochemical characterization and antioxidant activity of melanin from a novel strain of Aspergillus bridgeri ICTF-201 // Lett. Appl. Microbiol. – 2011. – Vol. 53, №3. – P. 350-358.
7. Kurian N.K., Nair H.P., Bhat S.G. Evaluation of Anti-inflammatory property of Melanin from marine Bacillus sp BTCZ31 // Asian Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. – 2015. – Vol. 8, Issue 3. – P. 251-255.
8. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randal R.I. Protein measurement with Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol.193, №1. – P. 265-275.
9. Reitman S., Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transminases // Am. J. Clin. Pathol. – 1957. – Vol.28, №1. – P. 56-63.
10. Sharma S., Rana S., Patial V. et al. Antioxidant and hepatoprotective effect of polyphenols from apple pomace extract via apoptosis inhibition and Nrf2 activation in mice // Human and Experimental Toxicology. – 2016. – Vol. 35. – P. 1264 - 1275.
11. Verneti L.A., Senutovich N., Boltz R. et al. A human liver microphysiology platform for investigating physiology, drug safety, and disease models // Experimental Biology and Medicine. – 2016. – Vol. 241. – P. 101-114.
12. Weng S.F., Kai J., Guha I.N., Qureshi N. The value of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase in cardiovascular disease risk assessment // Open Heart. – 2015. – Vol. 2. – P. e000272.
13. Ye M., Wang Y., Guo G.Y., et al. Physicochemical characteristics and antioxidant activity of arginine-modified melanin from Lachnum YM-346 // Food Chem. – 2012. – Vol. 135, №4. – P. 2490-2497.

Надійшла до редколегії 23.11.16

Е. Дворщенко, д-р бiol. наук, А. Дранцина, канд. бiol. наук, Е. Торгало, канд. бiol. наук,  
А. Короткий, канд. бiol. наук, Т. Береговская, д-р бiol. наук  
Київський національний університет ім. Тараса Шевченка, Київ

**ПОКАЗАТЕЛИ ПРОТЕИНОВОГО ОБМЕНА В КРОВІ КРЫС****ПРИ ИЗУЧЕНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ МЕЛАНИНА**

*Исследовано хроническую токсичность композиции на основе меланина на показатели протеинового обмена в сыворотке крови крыс обоих полов. Установлено, что при действии меланина в терапевтической дозе 0,3 мг/кг<sup>-1</sup> в течение 90 дней в сыворотке крови самцов и самок крыс концентрация общего белка, альбумина, мочевины и активность аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы остается в пределах контрольных значений. Показано, что при действии меланина в десятикратной терапевтической дозе 3 мг/кг<sup>-1</sup> в течение 90 дней в сыворотке крови самок активность аланинаминотрансферазы увеличивается в 1,36 раза, все остальные исследуемые показатели у самцов и самок находятся на контролльном уровне.*

**Ключевые слова:** хроническая токсичность, меланин, протеиновый обмен.

K. Dvorshchenko, DSc., A. Dranitsina, PhD., Ie. Torgalo, PhD., A. Korotkiy, PhD., T. Beregovaya, DSc.  
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

**INDICES OF PROTEIN METABOLISM IN BLOOD OF RATS  
IN THE STUDY OF CHRONIC TOXICITY BASED ON MELANIN**

*The chronic toxicity of the drug based on melanin was investigated on the basis of indices of protein metabolism in blood serum of rats of both sexes. It is found that by action of melanin in the therapeutic dose of 0.3 mg × kg<sup>-1</sup> during 90 days the concentration of total protein, albumin, urea, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase remained within the control values in the serum of male and female rats. It was shown that by action of melanin in ten-fold therapeutic dose of 3 mg × kg<sup>-1</sup> for 90 days serum alanine aminotransferase was 1.36 times higher of the control value in females; at the same time all other analyzed parameters remained at the control level in both males and females.*

**Key words:** chronic toxicity, melanin, protein metabolism.

УДК 576.31.577.151.6

А. Білюк, асп., А. Негеля, асп., Л. Гарманчук, д-р бiol. наук  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ,  
О. Скачкова, канд. бiol. наук  
Національний Інститут раку, Київ

**АКТИВНІСТЬ ЦИТОХРОМОКСИДАЗИ ТА СУКЦИНАТДЕГІДРОГЕНАЗИ  
В ПЕРВІННІЙ КУЛЬТУРІ ПЕРЕЩЕПЛЮВАНОЇ КАРЦИНОМИ ЛЕГЕНЬ ЛЬЮЇС  
НА РІЗНИХ ЕТАПАХ РОСТУ ПУХЛИНИ**

*В клітинах первинної культури карциноми Льюїс активність цитохром оксидази на 14 добу росту первинної пухлини становила 2,4±0,15 мкмоль окисленого цит.с/мг<sup>2</sup>хв., на 25 добу даний показник знизився майже в 7 разів ( $p<0.01$ ); активність сукцинатдегідрогенази на 25 добу знизилась до 21,7±2,3 мкмоль К<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]/мг<sup>2</sup>хв., що у 1,6 разів менше, ніж сукцинатдегідрогеназа активність на 14 добу.*

**Ключові слова:** цитохромоксидаза, сукцинатдегідрогеназа, карцинома легенів Льюїса, пухлина, рак, мітохондрія, окислювальний стрес, анеуплойдія.

**Вступ.**

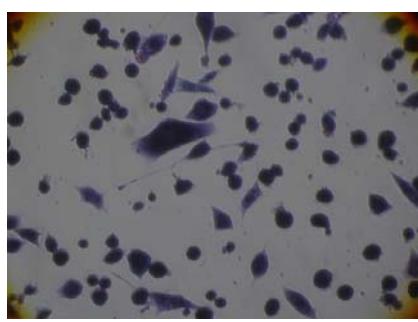
Найважливішими функціями мітохондрій є окиснення проміжних метаболітів вуглеводного, ліпідного та білкового обмінів, таких як піруват, жирні кислоти, ацетоацетат тощо, і використання енергії, що вивільняється при розпаді цих сполук для біосинтезу АТФ. Інша важлива функція мітохондрій полягає у механізмах утворення-поптосом та запограмованої смерті клітин [5, 9].

Мітохондріальні дисфункції, пов'язані з процесами окисного фосфорилювання, структурною цілісністю мітохондрій та інформаційною ідентичністю їх генетичного апарату, виникають за умов оксидативного стресу, при хворобах, викликаних метаболічними порушеннями, а також канцерогенезі [5, 10]. Характерними ознаками трансформованих клітин є підвищення рівня активних форм кисню (АФК), неефективність транспорту електронів в дихальному ланцюзі, посилення метаболі-

зму, послаблення процесів нейтралізації АФК, онкоген-індукований реплікативний стрес (який проявляється у зупинці реплікації ДНК під впливом онкогенів та може призводити до нестабільноті геному, анеуплоїдії, раку чи старіння клітини), зміни мітохондріальної динаміки. Необоротні порушення і структурі та функціонуванні мітохондрій, спричинені дією надмірних кількостей АФК, зумовлюють зсув енергетичного метаболізму в бік зростання інтенсивності гліколізу та пригнічення окисного фосфорилювання [4]. Основними маркерними ферментами, задіяними в порушенні окисного фосфорилювання, є сукцинатдегідрогеназа (СДГ) та цитохромоксидаза (ЦО). Зміна активності цих ферментативних систем спряжена також із порушеннями регуляції клітинного циклу [10]. А нечутливість пухлинних клітин до проапоптичних стимулів корелюють із нарощанням анеупloidії [3]. Тому, метою нашого дослідження було визначення активності СДГ та ЦО на моделі первинної культури карциноми легень Льюїса, виділеної з пухлин на різних етапах їх росту.

**Матеріали та методи.** Отримання первинної культури із перешеплюваної карциноми легень Льюїса. Для

отримання первинної культури клітин проводили послідовну трипсинізацію вилученої від миші C57Black пухлини на 14 та 25 добу після інокуляції пухлинних клітин в стегновий м'яз. Для цього в стерильних умовах пухлини вилучали, відмивали в фосфатно-сольовому буфері, подрібнювали та поміщали вrozчин 0,12% трипсина. Дезінтеграцію тканини проводили при 37°C при постійному помішуванні на магнітній мішалці протягом 15 хвилин, після чого відбирали надросад, в який додавали сироватку для інактивації дії трипсина. Клітини центрифугували, осад перерозчиняли в середовищі Ігла, підраховували співвідношення живих та мертвих клітин та повторювали процедуру виділення клітин. Четверта порція виділених клітин містила найменшу кількість мертвих клітин, тому в подальшому вона була використана для культивування в первинній у культурі. Пухлинні клітини субкультивували в середовищі RPMI (Sigma, США) з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки (Sigma, США), 2 mM L-глутаміну та 40 мкг/мл гентаміцину при 37°C у вологих умовах, 5% CO<sub>2</sub> (рис.1).



A



B

Рис. 1. Морфологічні особливості клітин первинних культур карциноми Льюїса, виділених на 14 (А) та 25 (Б) добу після її перешеплення (Х200)

**Вимірювання рівня апоптозу та вмісту анеуплоїдних та диплоїдних клітин.**

Визначення біологічних властивостей клітин первинної культури проводили за рівнем апоптозу вмістом анеуплоїдних та диплоїдних клітин [7].

Клітини для аналізу рівня апоптозу фарбували флюорохромним барвником прорідій йодистим (PI), що селективно з'єднується з інтеркалуючими сайтами в ДНК. Метод визначення рівня апоптозу базується на відомому факті втрати клітинами в процесі програмованої клітинної загибелі частини ДНК внаслідок її міжнуклеосомної фрагментації.

Фарбування клітин за допомогою флюорохромного барвника PI включало наступні етапи: клітини у кількості  $1 \times 10^6$  на пробу після однократного відмивання в 5 мл PBS при 1000 об/хв протягом 10 хв ресуспендували в 1 мл гіпотонічного лізуючого буфера (0,1 % цитрат натрію, 0,1 % Triton X-100, 5 мкг/мл PI). Всі реагенти фірми "SigmaChemicalCo", США. Після обережного струшування, клітини інкубували при 22-25 °C протягом 30 хв у темряві. Визначення вмісту анеуплоїдних клітин проводили за обрахуванням гістограм в гіподиплоїдній області.

Цитометричний аналіз проводили на приладі FACS Calibur ("Becton Dickinson", США), що оснащений двома лазерами (з  $\lambda = 488$  та 625 нм), з використанням спеціалізованих математичних програм CellQuest та ModFit LT 2.0 (BDIS, США) для комп'ютерів Macintosh для отримання та аналізу даних. Для виміру флюоресценції PI використовували вузькосмуговий фільтр 585/42 нм.

**Виділення мітохондрій із клітин первинної культури карциноми легень Льюїса.**

Для отримання мітохондрій, клітини концентрували шляхом центрифугування при 1000g протягом 10 хв. У суспензії вимірювали кількість клітин та їхню життєздатність за допомогою камери Горяєва з використанням 0,4% розчину трипанового синього, приготованого на фосфатно-сольовому буфері. Процедуру виділення проводили, використовуючи попередньо охолоджені реактиви, посуд та інструменти. Надалі клітини поміщали у 10 мл середовища виділення I (250 мМ сахароза, 3 мМтрилон Б, 20 мМтрист-НСl (pH 7,4 при 4°C)). Далі проводили гомогенізацію на гомогенізаторі Патерсона для руйнування плазматичних мембрани клітин. Після центрифугування на холоду при 600g протягом 20 хв для видалення ядер та уламків клітин, супернатант обережно відбирали, профільтровували через 3 шари марлі. Потім знову центрифугували при 11000g 20 хв при 4°C, а отриманий осад ресуспендували в середовищі виділення II (250 мМ сахароза, 30 мМтрист-НСl (pH 7,4 при 4°C)) в об'ємі 1 мл. Для одержання субмітохондріальних частинок (СМЧ) проводили процедуру дворазового заморожування-відтаювання суспензії мітохондрій, що призвело до порушення цілісності мітохондрій [11, 12]. Після відтаювання, суспензію гомогенізували в невеликому об'ємі середовища II, поступово доводили об'єм середовищем II до 50 мл і центрифугували при 25000-27000 g 30 хв. Осад, який містив фракцію СМЧ (везикули внутрішньої мембрани мітохондрій), ресуспендували в невеликому об'ємі середовища II і надалі використовували для досліджень. Аналіз чистоти СМЧ

проводили біохімічним методом, оцінюючи активність 5'-нуклеотидази (5'-рибонуклеотид-фосфогідролаза, КФ 3.1.3.5.) – маркерний фермент плазматичної мембрани згідно [12], та сукцинатдегідрогенази (сукцинат:оксидоредуктаза, КФ 1.3.99.1.) – маркерний фермент внутрішньої мембрани мітохондрій [12].



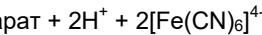
До супензії мітохондріальних мембрани в об'ємі, що містив 0,2 мг білка, додавали середовище інкубації (10 мМ фосфатний буфер (рН=7,8), 5 мМ бурштинову кислоту, 1,25 мМ ЕДТА, 7,5 мМ азид натрію). Проби інкубували при кімнатній температурі протягом 5 хв для інгібування цитохромоксидази азидом натрію. Реакцію розпочинали додаванням до проб 1,25 мМ розчину ферицианіду калію. Проби інкубували протягом 10 хв при +30 С.

Після інкубації реакцію зупиняли зниженням температури проб до 0°C шляхом опускання проб улід і додаванням 0,1% додецилсульфату натрію (ДСН). В контрольні проби, які містили всі компоненти інкубаційної суміші, ДСН додавали перед внесенням супензії мітохондріальних мембрани. Після зупинки реакції і охолодження проби фотометрували на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі  $\lambda = 420$  нм проти дистильованої  $\text{H}_2\text{O}$ . Для визначення вмісту ферицианіду в пробах, що містили від 100 до 1000 мкг ферицианіду в 4 мл розчину, будували калібрувальну криву. За різницю в показниках екстинкції ( $E_{\text{пр}}-E_{\text{к}}$ ), застосовуючи калібрувальну криву, розраховували кількість ферицианіду, який відновлювався за час інкубації. Активність сукцинатдегідрогенази в препаратах мітохондрій збільшувалася в середньому в 6-7 разів порівняно з гомогенатами, що свідчить про достатній ступінь їх чистоти.

**Визначення активності цитохромоксидази.** Цитохромоксидаза (КФ 1.9.3.1.) є термінальним ферментом дихального ланцюга, який безпосередньо взаємодіє з оксигеном. Окиснена форма цитохромоксидази ( $\text{Fe}^{2+}$ ) приймає електрони від відновленого цитохрому *c*, переходячи у відновлену форму ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Метод визначення активності ЦО [2] оснований на окисненні цитохрому *c* цитохромоксидазою.

До середовища інкубації, що складалось з: 20 мМ калій-фосфатного буфера (рН 7,2) та 50 мкМ цитохрому *c*, вносили супензію СМЧ з вмістом білка 0,2 мг. В одну паралельну реакційну середовищу додавали

Визначення активності сукцинатдегідрогенази. Визначення активності СДГ проводили згідно методу [12], принцип якого полягає у відновленні ферицианіду калію ( $K_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ) до фероцианіду калію ( $K_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ) сукцинатомза участі ферменту. Активність визначали за кількістю відновленого ферицианіду. Реакція протикає за наступною схемою:



25 мМ  $\text{NaN}_3$  (інгібтору цитохромоксидази). Реакції починали внесенням 2 мМ НАДН. Реакційну суміш інкубували при кімнатній температурі протягом 3 хв. Проби фотометрували на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі  $\lambda = 550$  нм проти дистильованої  $\text{H}_2\text{O}$ .

Активність розраховували в мкмоля хцитохрому *c*, окисненого за час інкубації за хвилину на 1 мг білка:

$$A = (V \times \Delta\varepsilon) / (K \times c \times L)$$

де  $V$  – загальний об'єм роби;  $\Delta\varepsilon$  – різниця екстинкцій ( $E_{\text{к}}-E_{\text{пр}}$ ), одиниці оптичної щільності;  $K$  – мілімолярний десятковий коефіцієнт поглинання цитохрому *c* ( $21.0 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ );  $c$  – вміст білка в пробі, мг;  $L$  – довжина оптичного шляху, см ( $L=1$  см);  $t$  – час інкубації проби, хв.

Концентрацію білка визначали за методом Бретфорда [1].

Статистичну обробку результатів проводили з використанням "Origin 6.1" і *t*-критерія Стьюдента. Всі дані приведені у вигляді середніх арифметичних та стандартних відхилень.

#### Результати та їх обговорення.

Виділення та аналіз первинної культури перещеплюваної карциноми легень Льюїс із пухлини проводили на 14 та 25 добу після її перещеплення експериментальним тваринам. Ці терміни було відібрано з метою визначення біологічних властивостей пухлинних клітин на початковому етапі метастазування (14 доба) та на етапі формування метастазів васкулярної фази (25 доба) [8]. Згідно морфологічного аналізу представленого на типовому фото (рис. 1), на 25 добу виявлено переважання субпопуляції клітин меншого розміру та з більшим ядерно-цитоплазматичним відношенням. Okрім цього, спостерігається переважання анеуплойдних клітин. При цитофлуориметричному аналізі в популяції первинної культури, виділеної на 25 добу вміст анеуплойдних клітин переважав аналогічний на 14 добу в 1,6 рази ( $p < 0.05$ , рис. 2).

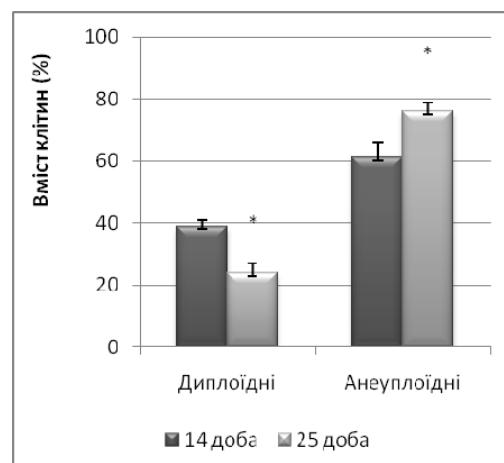


Рис. 2. Вміст диплоїдних та анеуплойдних клітин в первинній культурі карциноми Льюїс, виділених на 14 та 25 добу після її перещеплення.

\* – різниця достовірна ( $p < 0.05$ )

При аналізі рівня апоптичних клітин було виявлено, що на 25 добу цей показник був меншим, ніж на 14 добу (рис.3), що могло бути асоційовано із зменшеннем чутливості первинної культури на 25 добу до проапоптичних стимулів, пов'язаної з переважанням анеуплоїдних клітин.

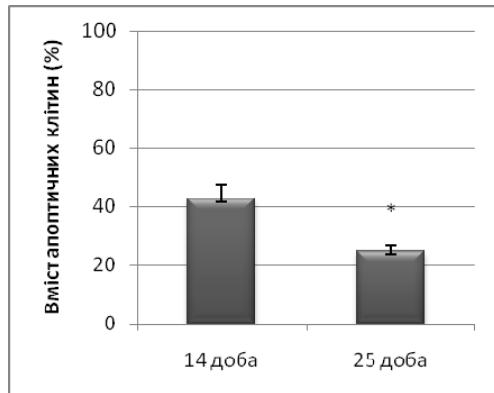


Рис. 3. Рівень апоптичних клітин в первинній культурі карциноми Льюїс, виділених на 14 та 25 добу після її перещеплення.

\* – різниця достовірна ( $p < 0.05$ )

При визначенні активності СДГ та ЦО в мітохондріях, виділених із первинної культури карциноми Льюїс на 14 та 25 добу після її перещеплення було виявлено односпрямоване зменшення активності цих ферментів на 25 добу, порівняно з 14 добою. Так, на 14 добу активність ЦО становила  $2,4 \pm 0,15$  мкмоль окисненого цит.с/мг<sup>\*</sup>хв., тоді як на 25 добу даний показник знишився майже в 7 разів ( $p < 0.01$ , рис.4А), порівняно з 14 добою і склав  $0,34 \pm 0,17$  мкмоль окисненого цит.с/мг<sup>\*</sup>хв. Щодо

показників сукцинатдегідрогеназної активності, то вона також зменшувалася в первинній культурі, виділеній на 25 добу порівняно з 14 добою, однак не так виражено (рис.4Б). Було встановлено, що на 14 добу її активність складала  $36,6 \pm 3,4$  мкмоль К<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]/мг<sup>\*</sup>хв, тоді як на 25 добу цей показник знизився до  $21,7 \pm 2,3$  мкмоль К<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]/мг<sup>\*</sup>хв, що у 1,6 разів менше, ніж СДГ активність на 14 добу.

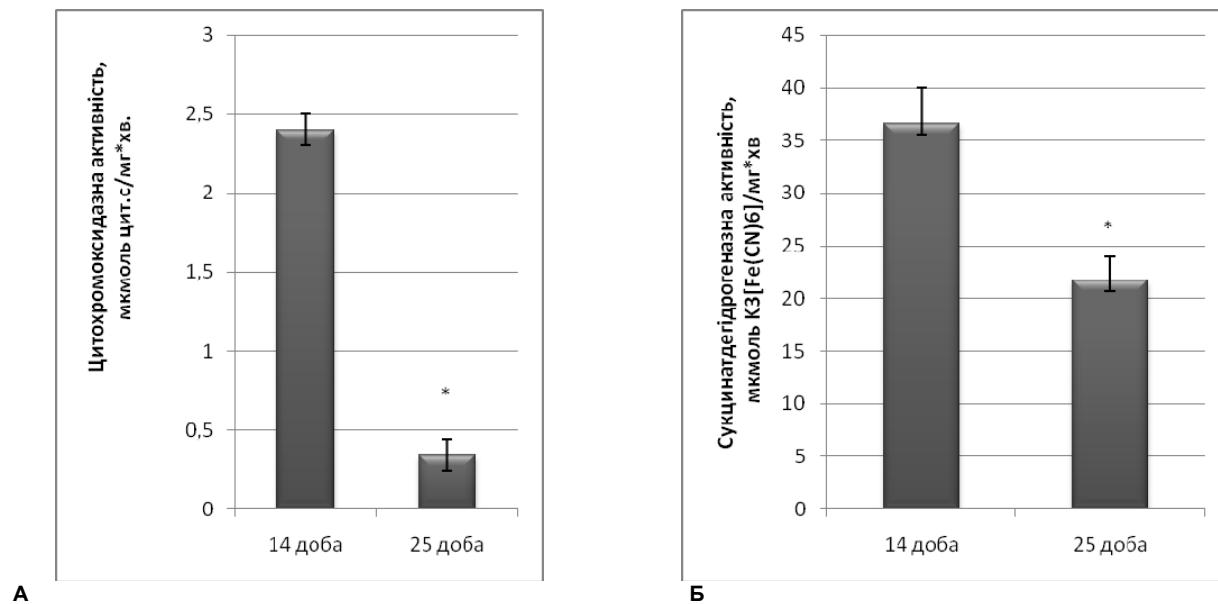


Рис. 4. Активність мітохондріальних ферментів в первинній культурі перещеплюваної карциноми легені Льюїс на 14 та 25 добу:

А – цитохромоксидазна активність (мкмоль цит.с/мг<sup>\*</sup>хв.);  
Б – сукцинатдегідрогеназна активність (мкмоль К<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]/мг<sup>\*</sup>хв). \* -різниця достовірна ( $p < 0.05$ )

Таким чином, проведене дослідження на первинній культурі карциноми легені Льюїс вказує на нарощання пульси анеуплоїдних клітин в популяції зі збільшенням терміну росту пухлини. На етапі активного метастазування в легені (25 доба після перещеплення) та формування метастазів васкулярної фази виявлено значне переважання анеуплоїдних клітин, які менш чутливі до апоптичних стимулів, про що свідчать дані рівня апоп-

тичних клітин: даний показник зменшується на 25 добу, порівняно з 14 добою в 1,6 рази. При визначенні активності ключових мітохондріальних ферментів – сукцинатдегідрогенази та цитохромоксидази виявлено зниження їх активності на 25 добу, порівняно з 14 добою. Такий ефект зумовлений гіпоксією, яка властива пухлині даної експериментальної моделі на 25 добу після перещеплення, що призводить до пригнічення системи

ферментів окисного фосфорилювання та переважного переходу пухлинних клітин на гліколітичне анаеробне поповнення енергетичних субстратів.

#### Список використаних джерел

- Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding // Analytical Biochemistry. – 1976. – №72. – P. 248-254.
- Francois M. Isolement Proprietes des Membranes Externes et Internes de Mitochondries Vegetales / Francois M., Claude L. // Biochimie. – 1972. – №54. – P.1335-1348.
- Gentic, G. Oxidative stress promotes pathologic polyploidization in nonalcoholic fatty liver disease /Gentic, G., Maillet, V., Paradis, V. et al. // The Journal of clinical investigation. – 2015. – №125(3). – P. 981-992.
- Gorrini C. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy /Gorrini C., Harris I., Mak T. // Nature Reviews Drug Discovery. – 2013. – № 12. – P. 931-947.
- Lee J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signaling /Lee J., Giordano S., Zhang J. // Biochemical Journal. – 2012. – № 441(2). – P. 523-540.
- Navarro-Yepes J. Oxidative Stress, Redox Signaling, and Autophagy: Cell Death Versus Survival /Navarro-Yepes J., Burns M., Anandhan A, et al. // Antioxidants & Redox Signaling. – 2014. – №21(1). – P.66-85.
- Nicoletti I. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry/ Nicoletti I. // Journal Immunology Methods. – 1991. – №139. – P. 271-80.
- Pyaskovskaya O. Changes in VEGF level and tumor growth characteristics during lewis lung carcinoma progression towards cis-DDP resistance /Pyaskovskaya O., Dasyukevich O., Kolesnik D. // Experimental Oncology. – 2007. – №29(3). – P. 197-202.
- Scatena R. Mitochondria and Cancer: A Growing Role in Apoptosis, Cancer Cell Metabolism and Dedifferentiation /Scatena R. // Advances in Experimental Medicine and Biology. – 2012. – № 942. – P. 287-308.
- Sinha, K. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis /Sinha, K., Das, J., Pal, P.B. et al. // Archive Toxicology. – 2013. – №87:1157.
- Vyas S. Mitochondria and Cancer /Vyas S., Zaganjor E., Haigis M. // Cell. – 2016. – № 166(3). – P. 555-566.
- Ещенко Н. Определение количества янтарной кислоты и активности сукцинатдегидрогеназы / Ещенко Н.Д., Вольський Г.Г., // Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен). – Л: Из-во Ленингр. ун та, 1982. – С.207-212.

#### Reference

А. Білюк, асп., А. Негеля, асп., Л. Гарманчук, д-р бiol. наук  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,  
О. Скачкова, канд. бiol. наук  
Національний Інститут рака, Київ, Україна

#### АКТИВНОСТЬ ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ И СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЫ ПРЕВИТОЙ КАРЦИНОМЫ ЛЕГКИХ ЛЬЮИС НА РАЗЛИЧНЫХ ЭТАПАХ РОСТА ОПУХОЛИ

*В клетках первичной культуры карциномы Льюис активность цитохромоксидазы на 14 сутки составляла  $2,4 \pm 0,15$  мкмоль окисленного цит.c/мг\*мин, на 25 сутки данный показатель снизился почти в 7 раз ( $p < 0,01$ ); активность сукцинатдегидрогеназы на 25 сутки снизилась до  $21,7 \pm 2,3$  мкмоль K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>/мг\*мин, что в 1,6 раза меньше, чем сукцинатдегидрогеназа активность на 14 сутки.*

*Ключевые слова: цитохромоксидаза, сукцинатдегидрогеназа, карцинома легких Льюиса, опухоль, рак, митохондрия, окислительный стресс, анеуплоидия.*

A. Biluk, PhD stud., A.Nehelia, PhD stud., L. Garmanchuk, DSc  
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,  
O. Skachkova, PhD  
National Cancer Center, Kyiv, Ukraine

#### THE ACTIVITY OF SUCCINATEDEHYDROGENASE AND CYTOCHROMEOXIDASE IN PRIMARY CULTURE IN OCULATED LEWIS LUNG CARCINOMA IN VARIOUS STAGES OF TUMOR GROWTH

*It was established that cytochromeoxidase activity of Lewis carcinomaprimary culture at 14<sup>th</sup>day was  $2,4 \pm 0,15$  mmolcyt.c/mg\*min, and it was decrease dalmostat 7-fold ( $p <0,01$ ) at 25<sup>th</sup>day, where as succinate dehydrogenase activity at 25<sup>th</sup>day was decreased to  $21,7 \pm 2,3$ mmolK<sub>3</sub>[Fe (CN)<sub>6</sub>]/mg\*min, which was at 1,6 fold less than at 14<sup>th</sup>day.*

*Keywords: cytochrome oxidase, succinate dehydrogenase, Lewis lung carcinoma, tumor, cancer, mitochondria, oxidative stress, aneuploidy.*

1. Bradford, M. M. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding // Analytical Biochemistry. – 1976. – №72. – P. 248-254.

2. Francois M., Claude L. Isolement Proprietes des Membranes Externes et Internes de Mitochondries Vegetales // Biochimie. – 1972. – №54. – P.1335-1348.

3. Gentic, G., Maillet, V., Paradis, V. et al. Oxidative stress promotes pathologic polyploidization in nonalcoholic fatty liver disease // The Journal of clinical investigation. – 2015. – №125(3). – P. 981-992.

4. Gorrini C., Harris I., Mak T. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy // Nature Reviews Drug Discovery. – 2013. – № 12. – P. 931-947.

5. Lee J., Giordano S., Zhang J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signaling // Biochemical Journal. – 2012. – № 441(2). – P. 523-540.

6. Navarro-Yepes J., Burns M., Anandhan A, et al. Oxidative Stress, Redox Signaling, and Autophagy: Cell Death Versus Survival // Antioxidants & Redox Signaling. – 2014. – №21(1). – P.66-85.

7. Nicoletti I. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry // Journal Immunology Methods. – 1991. – №139. – P. 271-80.

8. Pyaskovskaya O., Dasyukevich O., Kolesnik D. Changes in VEGF level and tumor growth characteristics during lewis lung carcinoma progression towards cis-DDP resistance // Experimental Oncology. – 2007. – №29(3). – P. 197-202.

9. Scatena R. Mitochondria and Cancer: A Growing Role in Apoptosis, Cancer Cell Metabolism and Dedifferentiation // Advances in Experimental Medicine and Biology. – 2012. – № 942. – P. 287-308.

10. Sinha, K., Das, J., Pal, P.B. et al. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis // Archive Toxicology. – 2013. – №87:1157.

11. Vyas S., Zaganjor E., Haigis M. Mitochondria and Cancer // Cell. – 2016. – № 166(3). – P. 555-566.

12. Ещенко Н.Д., Вольський Г.Г., Определение количества янтарной кислоты и активности сукцинатдегидрогеназы // Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен). – Л: Из-во Ленингр. ун та, 1982. – С.207-212.

#### Надійшла до редколегії 28.11.16

*Стаття Білюк та співавтори виконана За часткової фінансової підтримки гранту 0114U003877 "Альтернативні моделі для тестування клітинних препаратів на онкогенність" Відділення цільової підготовки Київського національного університету імені Тараса Шевченка при Національній Академії наук України*

УДК 577.3.

С. Гончаревський, асп., В. Мартинюк, д-р біол. наук, проф.  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

## ДОБОВА ДИНАМІКА ТЕМПЕРАТУРИ РЕПРЕЗЕНТАТИВНИХ ЗОН ШКІРИ ЛЮДИНИ

*Досліджували температурні варіації репрезентативних зон краніального відділу вегетативної нервової системи шкіри людини протягом доби. До краніального відділу відносяться зони: гіпоталамуса, середнього мозку, варолієвого мосту, довгастого мозку та блукаючого нерва. Дослідження проводилось за допомогою вимірювання температури інфрачервоним термометром нового покоління Medisana FTO D-53340. В ході дослідження були виявлені мінімуми та максимуми температури для репрезентативної зони протягом доби: гіпоталамус – 13 (максимум), 3 (мінімум) година, середній мозок – 15 (максимум), 5 (мінімум) година, варолієві міст – не виявлені, довгастий мозок – 9, 15 (максимум), 3,21 (мінімум) година, блукаючий нерв (права сторона) – 15 (максимум), 5 (мінімум) година, блукаючий нерв (ліва сторона) – 15 (максимум), 21 (мінімум) година. Наявність мінімумів та максимумів температури в репрезентативних зонах свідчить про різну активність у зв'язаніх з ними структурах головного мозку.*

**Ключові слова:** репрезентативні зони, біоритми, вегетативна нервова система, температура шкіри.

### Вступ

В останнє десятиліття отримала бурхливий розвиток хронобіологія (хрономедицина) – наука про часові закономірності функціонування організму, про біологічні ритми та часові тренди, їх залежності від стану біологічної системи, про фізіологічні механізми, що лежать в їх основі. Біоритми – це функціональна властивість всіх живих систем. У різних живих систем може бути широкий спектр біоритмів: хвилинні, годинні, добові, тижневі, річні. Циклічність змін характерна для переважної більшості біофізичних, біохімічних, фізіологічних, психічних і соціальних процесів [1,1].

Біологічні об'єкти, включаючи людський організм, являють собою складні нелінійні відкриті термодинамічні системи, стан яких залежать від динаміки параметрів навколошнього середовища (температури, тиску, вологості, освітленості, електромагнітних полів, тощо). Добре відомо, що такі геофізичні фактори, що мають сталі періоди, як фотoperіодизм, добові коливання атмосферного тиску і температури, є факторами синхронізації біологічних ритмів. На цей час аналіз хроноструктури біоритмів являє собою об'єктивний процес оцінки стану фізіологічних функцій, що є корисним в діагностиці, а також при визначенні часу лікування і перевірці його результатів [8].

Проте одноразове вимірювання температури в окремих зонах не може бути достатнім для встановлення будь-яких системних змін в організмі людини. Більш інформативним є дослідження часової динаміки температури шкіри протягом як мінімум доби. З іншого боку отримання великих масивів даних про температурну динаміку протягом більш тривалих часових інтервалів в різni сезони року може дозволити оцінити стабільність добових (циркадіанних) періодів і виявити багатоденні (інфрадіанні) ритми, пов'язані з динамикою факторів навколошнього середовища. У зв'язку з цим метою дослідження було з'ясування особливостей часових змін температури в репрезентативних зонах краніального відділу ВНС шкіри людини, температурний стан яких пов'язаний з функціональною активністю різних відділів головного мозку, протягом доби.

### Матеріали та методи

Аналізу стану репрезентативних зон шкіри людини, які пов'язані з функціональною активністю окремих відділів головного мозку, проводили згідно [3,4] по температурним показникам:

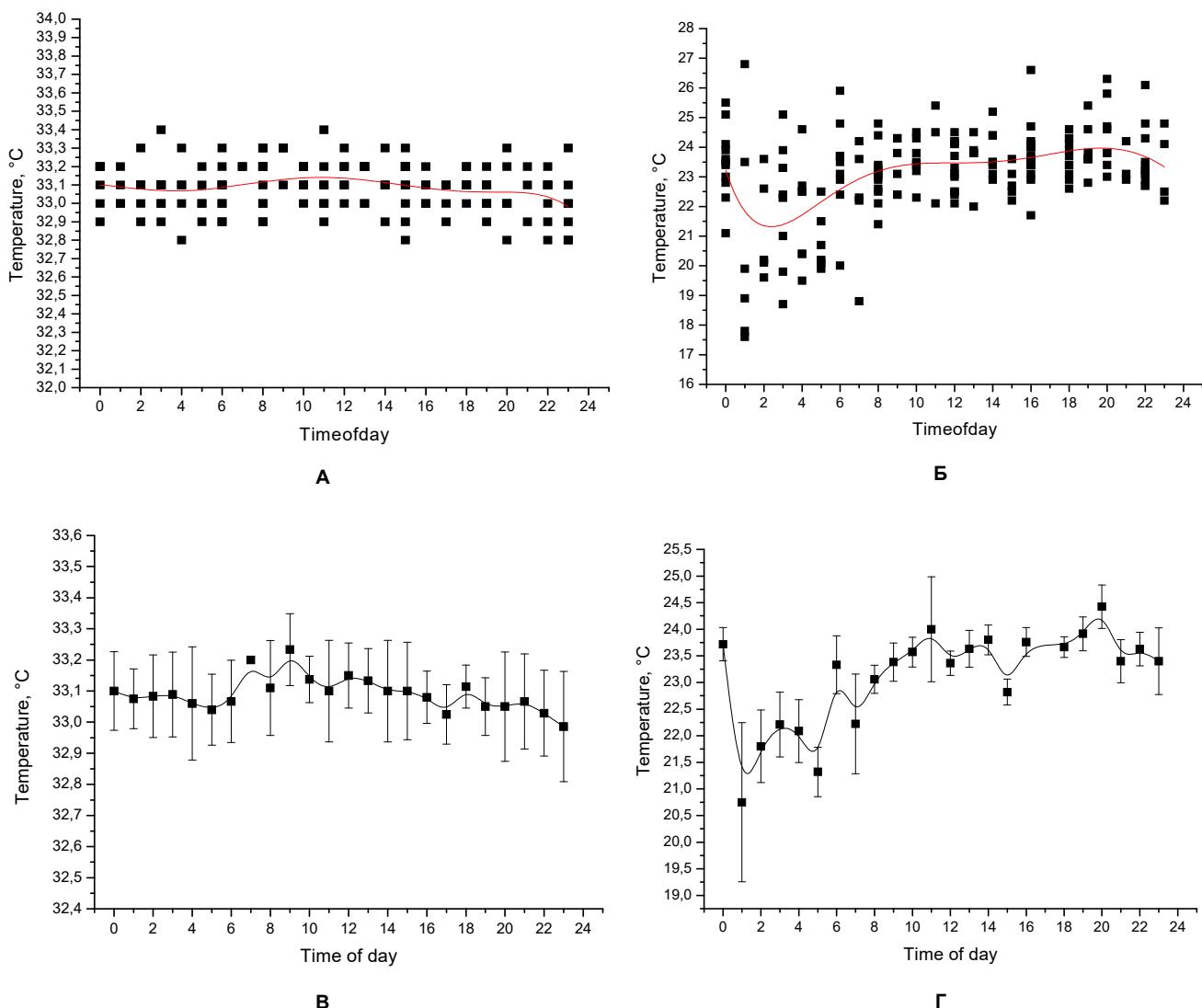
- білатеральні температурні показники барабанної перетинки, що мають спільний басейн кровообігу з гіпоталамусом;
- білатеральні показники температури війкового вузла, де представлені парасимпатичні волокна окорухового нерва (III пара), ядра яких знаходяться в середньому мозку;
- білатеральні показники температури вушного вузла, де представлені парасимпатичні волокна язикоглоткового нерва (IX пара), ядра якого знаходяться в довгастому мозку;
- білатеральні температурні показники блукаючого нерву, який розгалужується в районі нижньої щелепи [6,7].

Температуру у репрезентативних ділянках шкіри людини вимірювали інфрачервоним термометром фірми Medisana FTO D-53340, з похибкою приладу 0,1 ° Цельсія. Прилад вимірює температуру на основі реєстрації потоку інфрачервоного випромінювання, яке генерується в шкірі людини відповідно до температури тієї частини тіла, з якої реєструються температурні показники. Статистичний аналіз проводили у пакеті Origin 8.5 [5].

Температура репрезентативних точок вимірювались з інтервалом 2-3 години протягом 3 тижнів. Загалом було обстежено 19 умовно здорових людей віком 20-22 роки, з яких 12 чоловіків та 7 дівчат.

### Результати та їх обговорення

На рис. 1-6 наведено результати дослідження температурних варіацій навколошнього середовища, індиферентної точки, РТ гіпоталамуса, середнього мозку, варолієвого міста, довгастого мозку та блукаючого нерва.



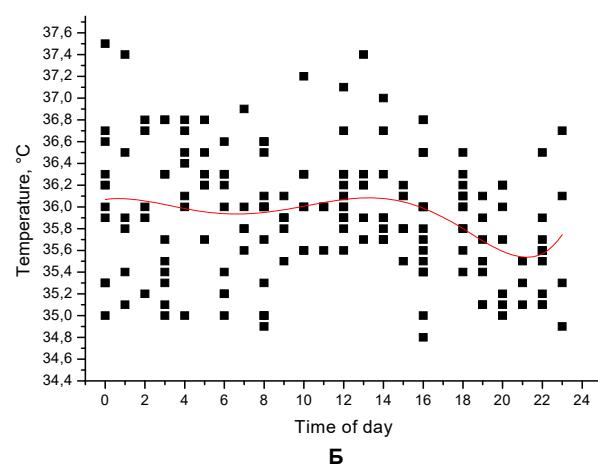
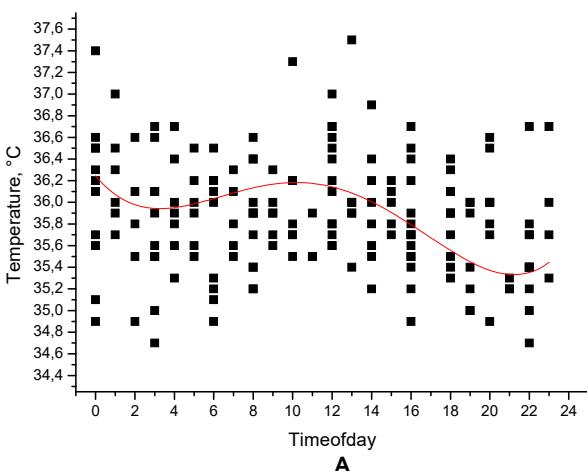
**Рис. 6. Добавий хід температури індиферентної точки (А, В) та температури у приміщеннях(Б,Г), де здійснювали вимірювання температури репрезентативних точок.**

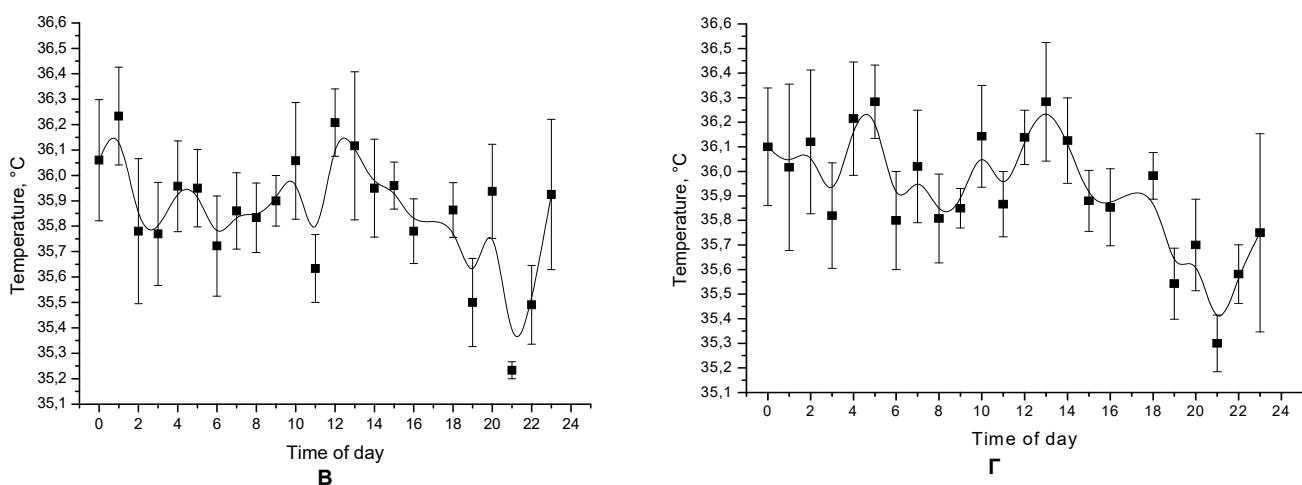
Примітки: А, Б – фітування поліномом 4-го порядку загального масиву даних,  
В, Г – добавий груповий хід за середніми значеннями

Аналіз температури навколошнього середовища підтверджив літературні данні, щодо циркадного ритму зміни температури протягом дня з максимумом о 21 годині, а мінімум – 3 годині.

У індиферентної точки не було виявлено значущої різниці у групових коливаннях температури протягом дня.

Таким чином, результати досліджень свідчать про відсутність сталого групового синхронного ритму варіацій температури в індиферентній точці шкіри людини. Скоріше за все ми маємо справу зі значними індивідуальними особливостями температурного ритму кожної людини.





**Рис. 7. Добовий груповий хід температури у репрезентативній точці гіпоталамусу.**  
А, В – ліва сторона обличчя. Б, Г – права сторона обличчя

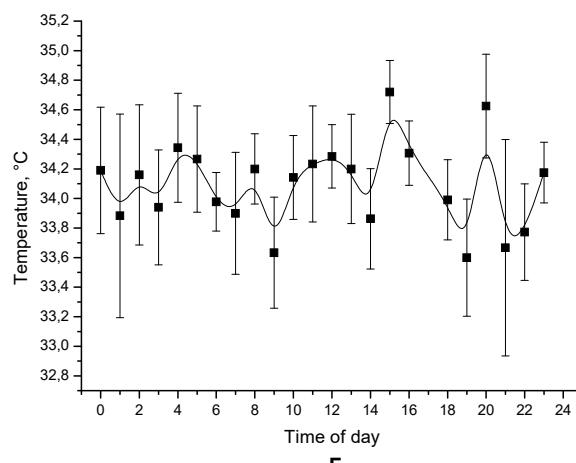
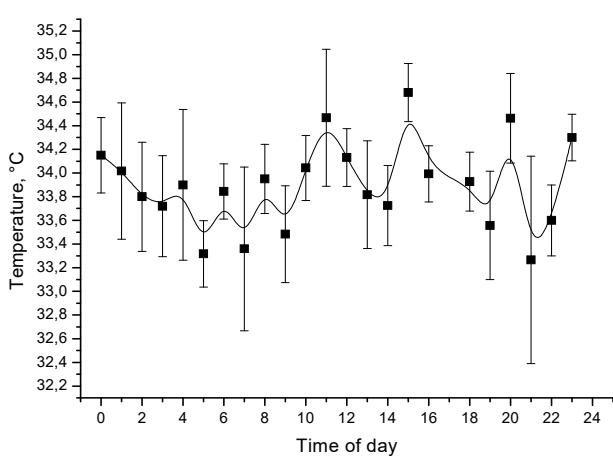
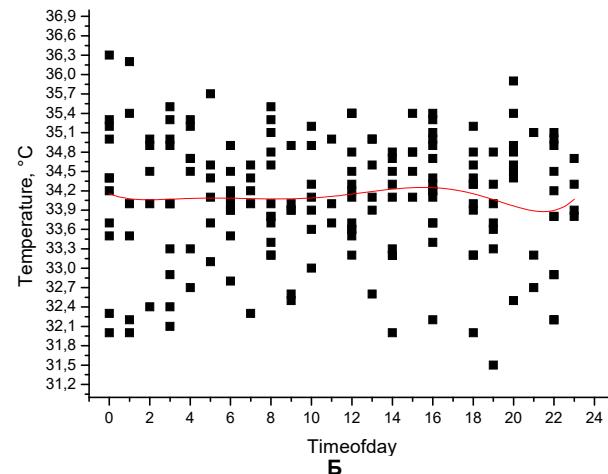
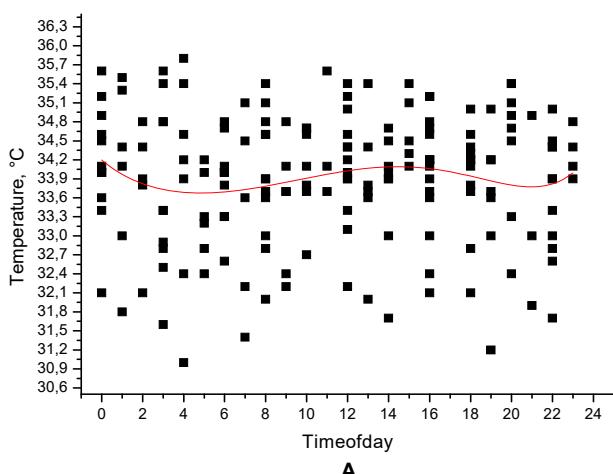
Примітки: А, Б – фітування поліномом 4-го порядку загального масиву даних, В,Г – добовий груповий хід за середніми значеннями.(Так само для наступних графіків)

Середній добовий груповий хід температури Г.П. має максимум о 13 годині ( $37^{\circ}\text{C}$ ), а мінімум – 3 годині ( $34,3^{\circ}\text{C}$ ). Середнє значення –  $35,9^{\circ}\text{C}$ . Середнє значення амплітуди коливання –  $2,7^{\circ}\text{C}$ .

Середній добовий груповий хід температури Г.Л. має максимум о 13 годині ( $36,8^{\circ}\text{C}$ ), а мінімум – 3 годині

( $34,1^{\circ}\text{C}$ ). Середнє значення –  $35,9^{\circ}\text{C}$ . Середнє значення амплітуди коливання –  $2,7^{\circ}\text{C}$ .

В цілому для групи характерна поява у репрезентативній точці гіпоталамуса максимумів о 10-13, 17, 19, 20 та 23 годині. Мінімуми в свою чергу о – 3-5, 14-16 та 23 годині.



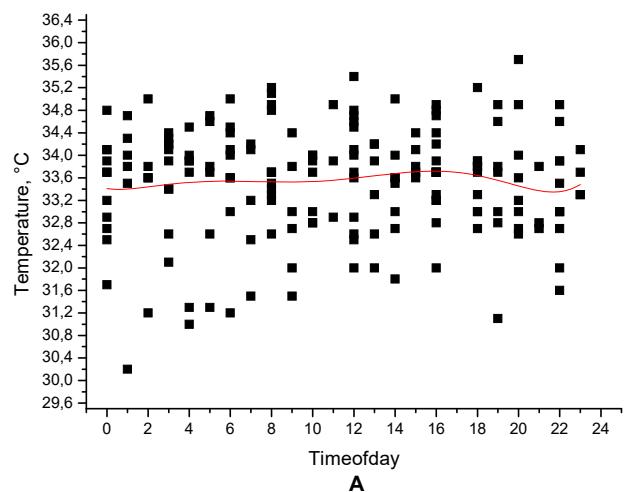
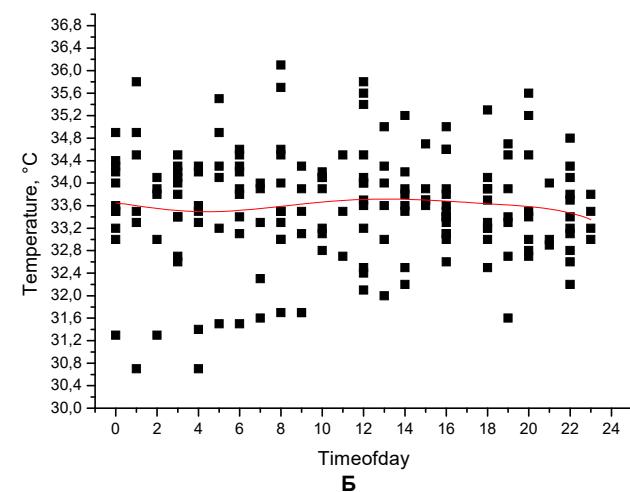
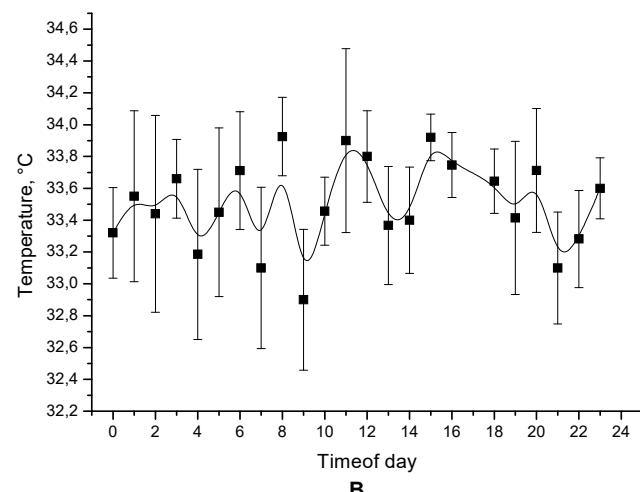
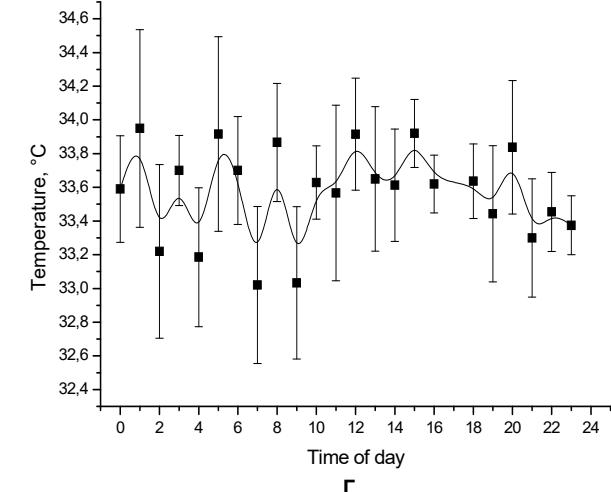
**Рис. 8. Добовий груповий хід температури у репрезентативній точці середнього мозку.**  
А, В – ліва сторона обличчя. Б, Г – права сторона обличчя

Середній добовий груповий хід температури С.П. має максимум о 15 годині ( $35,9^{\circ}\text{C}$ ), а мінімум – 5 годині ( $31,9^{\circ}\text{C}$ ). Середнє значення –  $33,9^{\circ}\text{C}$ . Середнє значення амплітуди коливання –  $4^{\circ}\text{C}$ .

Середній добовий груповий хід температури Г.Л. має максимум о 15 годині ( $35,7^{\circ}\text{C}$ ), а мінімум – 4 годині

( $31,2^{\circ}\text{C}$ ). Середнє значення –  $34^{\circ}\text{C}$ . Середнє значення амплітуди коливання –  $4,7^{\circ}\text{C}$ .

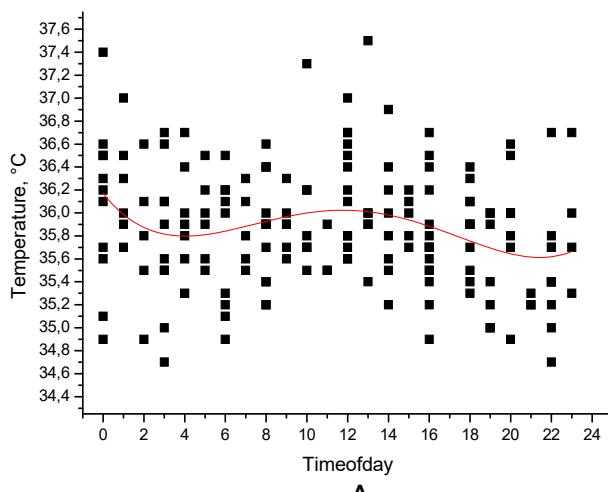
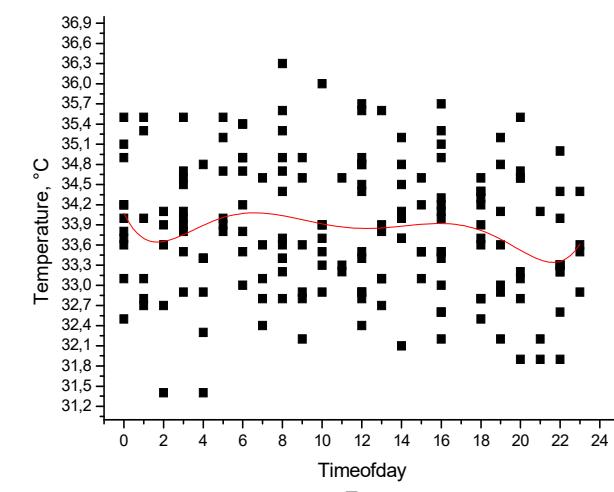
В цілому для групи характерна поява у репрезентативній точки середнього мозку максимумів о 0-3, 15-18, 20, 22 годині. Мінімуми в свою чергу о – 2-6, 10, 13, 16, 17 годинах.

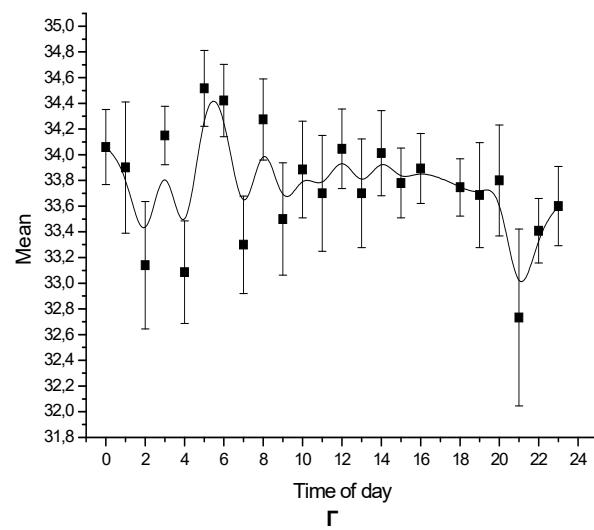
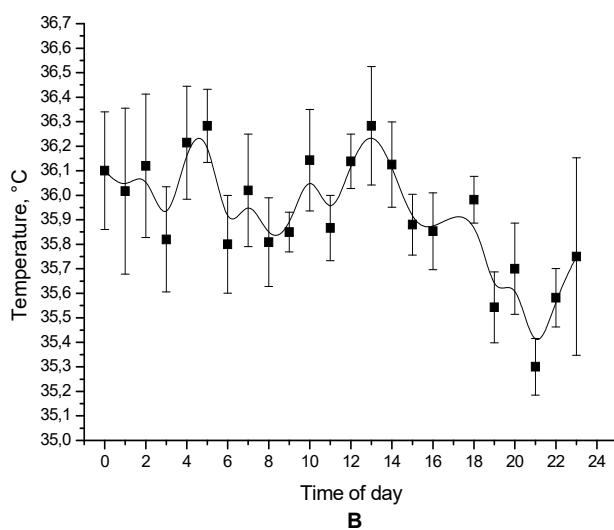
**A****B****C****D**

**Рис. 9. Добовий груповий хід температури у репрезентативній точці вароліївого міста.**  
А, В – ліва сторона обличчя. Б, Г – права сторона обличчя

Не було виявлено значущої різниці середнього добового групового ходу температури РТ В.П. та В.Л., що свідчить про індивідуальні особливості коливань температури протягом дня для кожного обстежуваного і потребує подальших досліджень.

В цілому для групи характерна поява у репрезентативній точці вароліївого міста максимумів о 7-9, 20-22 годині. Мінімуми в свою чергу у – 1-5, 10, 12, 17, 18, 23 годинах.

**E****F**



**Рис. 10. Добовий груповий хід температури у репрезентативній точці довгастого мозку.**

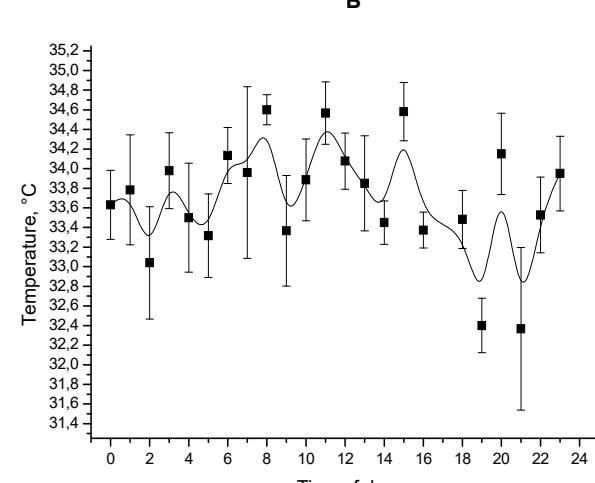
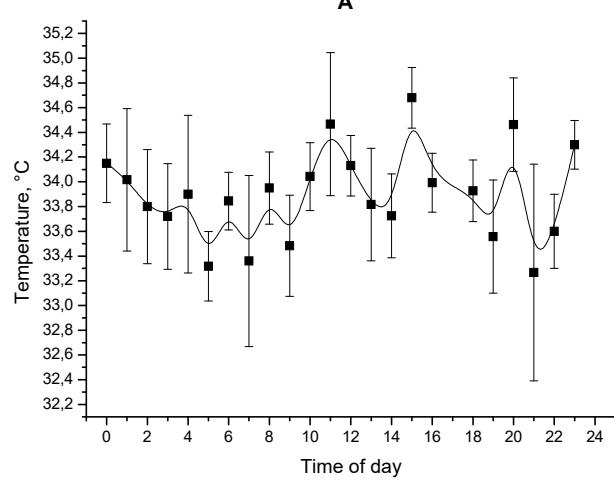
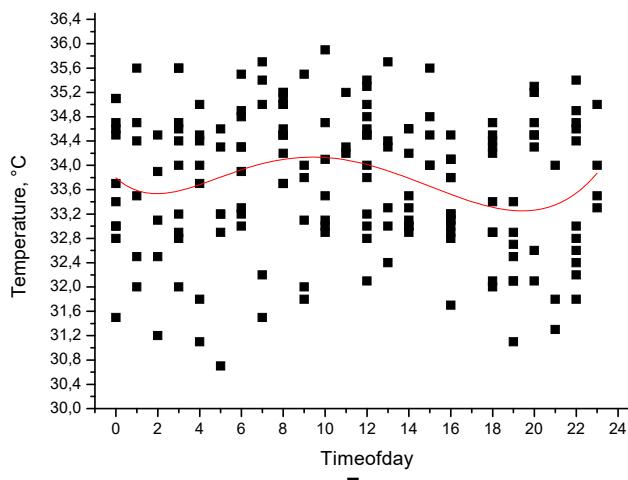
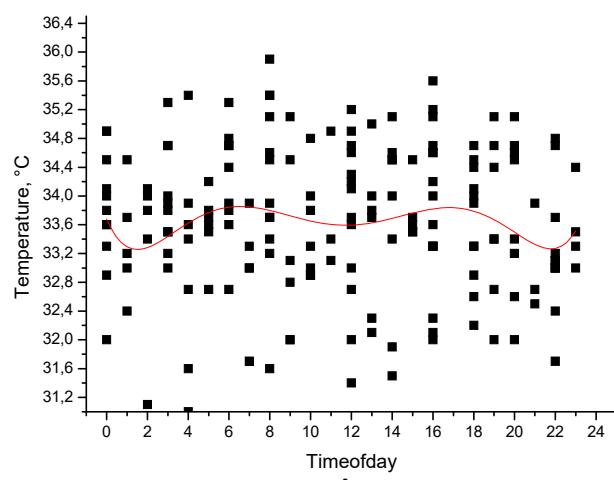
А, В – ліва сторона обличчя. Б, Г – права сторона обличчя

Середній добовий груповий хід температури Д.П. має максимум о 5 та 14 годині ( $35,6^{\circ}\text{C}$ ), а мінімум – 3 та 21 годині ( $31,1^{\circ}\text{C}$ ). Середнє значення –  $33,3^{\circ}\text{C}$ . Середнє значення амплітуди коливання –  $4,5^{\circ}\text{C}$ .

Середній добовий груповий хід температури Д.Л. має максимум о 9 та 15 годині ( $35,6^{\circ}\text{C}$ ), а мінімум – 3 та 21 годині ( $31,1^{\circ}\text{C}$ ). Середнє значення –  $33,4^{\circ}\text{C}$ . Середнє значення амплітуди коливання –  $4,5^{\circ}\text{C}$ .

В цілому для групи характерна поява у репрезентативній точці довгастого мозку максимумів о 16-18, 20-23 годині. Мінімуми в свою чергу о – 0-3, 6, 16-19 годинах.

Виявлення двох максимумів та мінімумів свідчить про більш виражений внутрішньо добовий ультрадіаний ритм (багаточасовий) репрезентативної точки довгастого мозку.



**Рис. 10. Добовий груповий хід температури у репрезентативній точці блукаючого нерва.**

А, В – ліва сторона обличчя. Б, Г – права сторона обличчя

Середній добовий груповий хід температури Б.П. має максимум о 15 годині ( $36,1^{\circ}\text{C}$ ), а мінімум – 5 годині ( $31,8^{\circ}\text{C}$ ). Середнє значення –  $33,5^{\circ}\text{C}$ . Середнє значення амплітуди коливання –  $4,3^{\circ}\text{C}$ .

Середній добовий груповий хід температури Б.Л. має максимум о 15 годині ( $36,2^{\circ}\text{C}$ ), а мінімум – 21 годині ( $31,1^{\circ}\text{C}$ ). Середнє значення –  $33,6^{\circ}\text{C}$ . Середнє значення амплітуди коливання –  $5,2^{\circ}\text{C}$ .

Поява мінімумів в різний час свідчить про асиметрію у функціонуванні правої та лівої гілки блукаючого нерва та потребує подальших досліджень індивідуальних характеристик цієї точки для кожного обстежуваного.

В цілому для групи характерна поява у репрезентативної точки блукаючого нерва максимумів о 17-23 годині. Мінімуми в свою чергу о – 2-4, 9-11, 16,17, 23 годинах.

Наявність максимумів та мінімумів в різний час може свідчити про гендерну різницю активності репрезентативних точок краніального відділу ВНС, а також про різну активність залежності від пори року, що є підставою для подальших досліджень цього явища.

## Висновки

Виходячи з теоретичного і експериментального вивчення температури в репрезентативних точках вегетативної нервової системи можна зробити наступні висновки:

1. Аналіз температурних варіацій індиферентної точки шкіри свідчить про відсутність групового синхронного сталого добового а ультрадіаного ритму температури, порівняно з репрезентативними точками окремих відділів головного мозку, які в переважній більшості мають відносно сталі добові і ультрадіані ритми.

2. Температура репрезентативних точок залежить від часу доби. Для досліджених точок характерні наступні характерні максимуми та мінімуми:

Для репрезентативних точок гіпоталамуса: максимум – 13 годинна, мінімум – 3 годинна.

Для репрезентативних точок середнього мозку: максимум – 15 годинна, мінімум – 5 годинна.

Для репрезентативних точок вароліївого міста не було виявлено значущих змін, що свідчить про індивідуальні властивості цієї структури.

Для репрезентативних точок довгастого мозку: максимум – 9, 15 години, мінімум – 3 та 21 години. Виявлення двох максимумів та мінімумів свідчить про більш виражений внутрішньо добовий ультрадіаний ритм (багаточасовий) репрезентативної точки довгастого мозку.

Для репрезентативної точки блукаючого нерва (права сторона): максимум – 15 годинна, мінімум – 5 годинна. Для репрезентативної точки блукаючого нерва (ліва

сторона): максимум – 15 годинна, мінімум – 21 годинна. Поява мінімумів в різний час свідчить про асиметрію у функціонуванні правої та лівої гілки блукаючого нерва та потребує подальших досліджень індивідуальних характеристик цієї точки для кожного обстежуваного.

## Список використаної літератури

1. Дехтярев Ю.П., Нечипорук В.И., Мироненко С.А. и др. Место и роль дистанционной инфракрасной термографии среди современных диагностических методов // Электроника и связь. Тематический выпуск "Электроника и нанотехнологии". – 2010. – № 2. – С. 192–196.

2. Иванецкий Т.П. Температурные показатели тепловой "машины" человека / IX Международная школа-конференция "Биология – наука XXI века" – Пущино, 2005-С.9-12.

3. Остапченко Л.І., М.Ю. Макарчук, О.С. Мартинчук, Л.А. Криворучко. Факторний аналіз температур репрезентативних точок вегетативної нервової системи людини // Фізика живого – 2007. Т.15, – С. 37 – 49.

4. Остапченко Л.І., Макарчук М.Ю., Мартинчук О.С., Криворучко Л.А. "Способ діагностики стану організму людини" Деклараційний патент на корисну модель №3932 (7 А61Н39/00) від 15.12.2004 р.

5. Філімонова Н. Б. Статистичний аналіз даних відповідно до зasad науково обґрунтованої медицини. Первінний аналіз кількісних даних, подання результатів експерименту / Н. Б. Філімонова, І. О. Філь, Т. С. Михайлова // Медицина залізничного транспорту України. – 2004. – № 4. – С. 30 – 38.

6. Janig W.C., Brooks C.M. The autonomic nervous system in health and disease: neurobiology and pathophysiology. J. auton. Nerv. Syst. – 2003. – 415 p.

7. Gabella G. Structure of the autonomic nervous system. London. Chapman and Hall. – 2006. – 312 p.

8. Knobel R.B., Guenther B.D., Rice H.E. Thermoregulation and thermography in neonatal physiology and disease. // Biological research for nursing. – 2011. – Vol. 13. – № 3. – P. 274–282.

## Reference

1. Dehtyarev Yu.P., Nechiporuk V.I., Mironenko S.A. i dr. (2010). Mesto i rol distantsionnoy infrakrasnoy termografii sredi sovremennyih diagnosticheskikh metodov. Elektronika i svyaz. Tematicheskiy vyipusk "Elektronika i nanotekhnologii", 2, 192-196 (inRus.)

2. Ivanetskiy T.P. (2005). Temperaturnye pokazateli teplovoy "mashiny" cheloveka. IX Mezhdunarodnaya shkola-konferentsiya "Biologiya – nauka XXI veka".Puschno, 9-12 (inRus.).

3. Ostapchenko L.I., Makarchuk M. U., Martynchuk O.S., Kryvoruchko L.A. (2007). Faktornyy analiz temperatury reprezentatyvnykh tochok vechetatyvnoy i nervovoy systemy lyudyny. Fizika zhyvoho, 15,37-49 (inUkr.).

4. Ostapchenko L.I., MakarchukM.Yu., Martynchuk O.S.,Kryvoruchko L.A. "Sposob diagnostyky stanu orhanizmu lyudyny" Deklaratsiyny patent na korysnu model' #3932 (7 A61N39/00) vid 15.12.2004 r. (inUkr.)

5. Filimonova, N. B., Fil, I. O., Mikhailova, T. S. (2004). Statistic analanalysis of data pursuant to the science-based medicine. Initialanalys is of quantitative data, experimental results presentation. Medytsyna zalyzny chnohotran sportu Ukrayiny (MedicineRailwayTransportofUkraine), 4, 30-38. (inUkr.)

6. Janig W.C., Brooks C.M. (2003). The autonomic nervous system in health and disease: neurobiology and pathophysiology. J. auton. Nerv. Syst.

7. Gabella G. (2006). Structure of the autonomic nervous system. London: Chapman and Hall.

8. Knobel R.B., Guenther B.D., Rice H.E. (2011). Thermoregulation and thermography in neonatal physiology and disease. Biological research for nursing, 3,274-282.

Надійшла до редколегії 28.11.16

С.Гончаревский, асп., В. Мартынюк, д-р биол. наук, проф.  
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

## СУТОЧНА ДИНАМІКА ТЕМПЕРАТУРЫ РЕПРЕЗЕНТАТИВНИХ ЗОН КОЖІ ЧЕЛОВЕКА

*Исследованы температурные вариации репрезентативных зон краинального отдела вегетативной нервной системы кожи человека в течение суток. К краинальному отделу относятся зоны: гипоталамуса, среднегомозга, варолиевого моста, продолговатого мозга и блуждающего нерва. Исследование проводилось с помощью измерения температуры инфракрасным термометром нового поколения Medisana FTO D-53340. В ходе исследования были выявлены минимумы и максимумы температуры репрезентативных зон в течение суток: гипоталамус – 13 (максимум), 3 (минимум) часа, средний мозг – 15 (максимум), 5 (минимум) часа, варолиев мост – не обнаружены, продолговатый мозг – 9, 15 (максимум), 3,21 (минимум) часа, блуждающий нерв (левая сторона) – 15 (максимум), 5 (минимум) часа, блуждающий нерв (правая сторона) – 15 (максимум), 21 (минимум) часа.*

*Наличие минимумов и максимумов температуры в репрезентативных зонах свидетельствует о различной активности в связанных с ними структурах головного мозга.*

*Ключевые слова: репрезентативные зоны, биоритмы, вегетативная нервная система, температура кожи.*

S. Goncharevskyi Phd stud., V. Martynuk, PhD, prof.  
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

## DAILY DYNAMICS TEMPERATURE REPRESENTATIVE ARE A SOFT HUMAN SKIN

*The main aim of our research was to study the temperature variation of representative areas a soft the cranial part of the autonomic nervous system of the human skin during the day. The temperature of representative areas a soft the thoracic autonomic nervous system we measured by infrared thermometer (Medisana FTO D-53340, with an accuracy of 0.1 degree Celsius). During the study identified minimums and maximums temperatures for representative areas are as during the day: the hypothalamus – 13 (maximum), 3 (minimum) an hour, midbrain – 15 (maximum), 5 (minimum) an hour, pons - not found, the medulla oblongata – 9, 15 (maximum), 3,21 (minimum) an hour, the vagus nerve (right side) – 15 (maximum), 5 (at least) an hour, the vagus nerve (left side) – 15 (maximum), 21 (minimum) an hour. The presence of minimums and maximums temperature in representative areas indicates different activity related to their brain structures.*

*Key words: representative areas, biorhythms, the autonomic nervous system, skin temperature.*

**Наукове видання**



## **ВІСНИК**

**КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

### **ПРОБЛЕМИ РЕГУЛЯЦІЇ ФІЗІОЛОГІЧНИХ ФУНКЦІЙ**

**Випуск 2(21)**

**Друкується за авторською редакцією**

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

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



Формат 60x84<sup>1/8</sup>. Ум. друк. арк. 10,8. Наклад 300. Зам. № 216-7988.  
Гарнітура Arial. Папір офсетний. Друк офсетний. Вид. № Б 7.  
Підписано до друку **08.07.16**

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