ВІСНИК
КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ISSN 1728-2624

ПРОБЛЕМИ РЕГУЛЯЦІЇ ФІЗІОЛОГІЧНИХ ФУНКЦІЙ 1(22)/2017

Засновано 1958 року

Наведено експериментальні дані про особливості будови, розвитку і функціонування рослинних і тваринних організмів, флору і фауну України, одержаних науковцями НДІ фізіології імені академіка Петра Богача та ННЦ "Інститут біології і 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 Петра Богача и УНЦ "Институт биологии и медицины" и других научных учреждений. Изложены также новые данные о патофизиологических закономерностях и биохимических механизмах регуляции процессов на клеточном и органном уровнях после воздействия различных физико-химических факторов.

Для преподавателей, научных сотрудников, аспирантов и студентов.

The experimental dates development and function of the plant and animal organisms of 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

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

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ

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";
☎ (38044) 521-35-98; www.biovestnik.com; bulletin.vestnik@gmail.com

Затверджено

Вченою радою ННЦ "Інститут біології та медицини "
10.04.17 (протокол № 10)

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

Журнал входить до наукометричних баз / Abstracted and Indexed:

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

© Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ,
ВПЦ "Київський університет ", 2017

ЗМІСТ

Табурець О., Дворщенко К., Тимошенко М., Верещака В., Берегова Т., Остапченко Л.
Глутатіонова система в сироватці крові щурів у динаміці різаної рани
та при дії фармакологічної композиції на основі меланіну 5

Дворщенко К., Ашпін М., Короткий О., Торгало Є., Фалалєєва Т.
Дія хондроїтин сульфату на рівень цитокінів та активність форм кисню у сироватці крові
за умов карагінан-індукованого запалення 9

Голота Ю., Базан А., Толстанова Г.
Окисно-антиоксидантна рівновага в слизовій оболонці товстої кишки щурів у різні терміни
після введення цефтриаксону 11

Бєлінська І.
Мегакаріоцитопоез щурів під впливом інгібітора протеїнкіназ похідного малеаміду
з протипухлинною активністю 16

Драницина А., Дворщенко К., Гребінник Д., Остапченко Л.
Експресія гена AQP8 в епітеліоцитах дванадцятипалої кишки щурів при діареї
за умов тривалої шлункової гіпохлоргідрії 20

Лилик М., Сорочинська О., Манюх О., Байляк М.
Вікові фізіолого-біохімічні зміни *DROSOPHILA*
при утриманні на середовищі з альфа-кетоглутаратом 25

Мотрук Н.
Вікові особливості активності компонентів системи протеолізу
в новоутвореннях молочної залози 31

Коваль Т., Іщук Т., Раєцька Я.
Зміни білкового складу сироватки крові та гомогенату стравоходу
при розвитку кислотного опіку стравоходу статевонезрілих щурів 36

Присяжнюк А., Довбинчук Т., Копияк Б., Толстанова Г.
Роль центральних і периферичних Д2-рецепторів
у механізмі ендотеліальної проникності товстої кишки щурів за умов експериментального коліту 39

Голобородько Є., Конопельнюк В., Остапченко Л.
Стан гіперглікемії тварин в умовах споживання висококалорійної дієти
з додаванням біонанокомпозиту 43

Тіхова Є., Тимошенко М., Ковельська Ю., Дворщенко К.
Стан глутатіонової системи у сироватці крові щурів при експериментальному артозі
та при введенні хондроїтина сульфату 47

Храбко М., Федорук Р., Кропивка С.
Показники стану імунної та антиоксидантної систем
у крові вагітних самиць щурів F_1 під дією різних доз цитрату германію 50

Чорненька Н., Валецька К., Раєцька Я., Остапченко Л.
Корекція меланіном протеолітичної активності за умов лужного опіку стравоходу 53

Катрій Т., Шабанова Н., Остапчук С., Савчук О.
Характеристика розчинних фібрин мономерних комплексів у хворих інсультом
у гостру фазу та через рік після перенесеної гострої фази 58

Опейда Є., Рудик М., Святецька В., Сківка Л., Федорчук О.
Реакція лімфоїдних органів щурів на ріст гліоми С6 61

СОДЕРЖАНИЕ

Табурец О., Дворщенко К., Тимошенко М., Верещака В., Береговая Т., Остапченко Л.,
Глутатионовая система в сыворотке крови крыс в динамике резаной раны
и при действии новой фармакологической композиции на основе меланина 5

Дворщенко Е., Ашпин Н., Короткий А., Торгало Е., Фалалеева Т., Остапченко Л.
Действие хондроитин сульфата на уровень цитокинов и активных форм кислорода
в сыворотке крови при каррагинан-индуцированном воспалении 9

Голота Ю., Базан А., Толстанова А.
Окислительно-антиоксидантное равновесие в слизистой оболочке толстой кишки крыс
в разные сроки после введения цефтриаксона..... 11

Белинская И.
Мегакариоцитопоэз крыс при воздействии ингибитора протеинкиназ
производного малеамида с противоопухолевой активностью 16

Драницина А., Дворщенко Е., Гребиник Д., Остапченко Л.
Экспрессия гена AQP8 в эпителиоцитах двенадцатиперстной кишки крыс при диарее
в условиях длительной желудочной гипохлоргидрии 20

Лилик М., Сорочинская О., Манюх О., Байляк М.
Возрастные физиолого-биохимические изменения *DROSOPHILA*
при содержании на среде с альфа-кетоглутаратом..... 25

Мотрук Н.
Возрастные особенности активности компонентов системы протеолиза
в новообразованиях молочной железы 31

Коваль Т., Ищук Т., Раецкая Я.
Изменение белкового состава сыворотки крови и гомогената пищевода
при развитии кислотного ожога неполовозрелых крыс..... 36

Присяжнюк А., Довбинчук Т., Копыяк Б., Толстанова А.
Роль центральных и периферических Д2-рецепторов
в механизме эндотелиальной проницаемости толстого кишечника крыс
с экспериментальным колитом..... 39

Голобородько Е., Конопельнюк В., Остапченко Л.
Состояние гипергликемии животных в условиях потребления высококалорийной диеты
с добавлением бионанокомпозита..... 43

Тихова Е., Тимошенко Н., Ковельская Ю., Дворщенко К.
Состояние глутатионовой системы в сыворотке крови крыс
при экспериментальном артрозе и при введении хондроитина сульфата..... 47

Храбко М., Федорук Р., Кропивка С.
Показатели состояния иммунной и антиоксидантной систем
в крови беременных самок крыс F1 под действием различных доз цитрата германия 50

Черненькая Н., Валецкая К., Раецкая Я., Остапченко Л.
Коррекция меланином протеолитической активности в условиях щелочного ожога пищевода 53

Катрий Т., Шабанова Н., Остапчук С., Савчук А.
Характеристика растворимых фибрин мономерных комплексов
у больных ишемическим инсультом в острую фазу
и через год после перенесенной острой фазы..... 58

Опейда Е., Рудик М., Святецкая В., Скивка Л., Федорчук А.
Реакция лимфоидных органов крыс на рост глиомы С6 61

CONTENTS

Taburets O., Dvorshenko K., Tymoshenko M., Vereschaka V., Beregova T., Ostapchenko L.
Glutation system in the serum of blood rats in the dynamics of full-thickness wounds
and with the influence of the new pharmacological composition which contain melanin 5

Dvorshchenko K., Ashpin M., Korotkyi O., Torgalo Ye., Falalyeyeva T., Ostapchenko L.
Action of chondroitin sulfate on the level of cytokines
and reactive oxygen species in blood serum at carrageenan-induced inflammation 9

Holota Y., Bazan A., Tolstanova G.
Oxidation-antioxidant balance in the colon mucosa of rats
at different times points after ceftriaxone administration 11

Byelinska I.
Effect of maleamide derivative protein kinases inhibitor with antitumor activity
on megakaryocytopoiesis of rats 16

Dranitsina A., Dvorshchenko K., Grebinyk D., Ostapchenko L.
Expression of AQP 8 gene in rat duodenal
with diarrhea upon long-term gastric hypochlorgidria 20

Lylyk M., Sorochynska O., Maniukh O., Bayliak M.
Age-related physiological and biochemical changes *DROSOPHILA* on alpha-ketoglutarate 25

Motruk N.
Age characteristics of activity some components of proteolysis in breast tissues 31

Koval T., Ischuk T., Raetska Ya.
The protein content changes of blood serum and esophageal homogenate
under acid burn development in immature rats 36

Prysiazhniuk A., Dovbynchuk T., Kopiyak B., Tolstanova G.
The role central and peripheral D2R receptors in the mechanisms
of colonic vascular permealibity during experimental colitis in rats 39

Goloborodko Ie., **Konopelniuk V., Ostapchenko L.**
State of hyperglycemia animals in the consumption of high-calorie diet
with the bionanocomposite addition 43

Tikhova E., Tymoshenko N., Kovelska Y., Dvorshenko K.
Condition of glutathione system in the serum of rats in experimental osteoarthritis
and administration of chondroitin sulphate 47

Khrabko M., Fedoruk R., Kropuvka S.
The indicators of the immune system and antioxidant
in the blood of pregnant female rats F1 by action
of different doses of germanium citrate 50

Chornenka N., Valetska K., Rayetska Ya., Ostapchenko L.
Correction of melanin proteolytic activity in the conditions
of modeling alkali burns of the esophagus 53

Katrii T., Shabanova N., Ostapchuk S., Savchuk O.
The characterization of the soluble fibrin monomer complex
in patients with acute and one year post acute ischemic stroke 68

Opeida I., Rudyk M., Svyatetska V., Skivka L., Fedorchuk O.
Reaction of lympoidal organs of rats to the growth of glioma C6 61

УДК 616-001.4-085.33:615.03.032:612-092

О. Табурець, асп., К. Дворщенко, д-р біол. наук,
М. Тимошенко, канд. біол. наук, В. Верещака, д-р мед. наук,
Т. Берегова, д-р біол. наук, Л. Остапченко, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ГЛУТАТІОНОВА СИСТЕМА В СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ У ДИНАМІЦІ РІЗАНОЇ РАНИ ТА ПРИ ДІЇ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ КОМПОЗИЦІЇ НА ОСНОВІ МЕЛАНІНУ

Досліджено активність ферментів глутатіонової ланки антиоксидантної системи у щурів з експериментальними різаними площинними ранами. Встановлено, що у сироватці крові за умов експериментальної моделі різаної рани знижується рівень відновленого глутатіону та глутатіонредуктазна активність і зростає глутатіонпероксидазна й глутатіонтрансферазна активності. За умов використання нової фармакологічної композиції на основі меланіну, показано нормалізацію вмісту даних показників.

Ключові слова: різана рана, меланін, глутатіонова система.

Вступ. Незначний асортимент на фармацевтичному ринку України вітчизняних лікарських засобів з дерматотропною дією, які не тільки попереджують інфікування рани і прискорюють гоєння раневої поверхні, але і запобігають утворенню келоїдного рубця, обумовлюють пошук і розробку нових препаратів. Актуальність таких досліджень обумовлена наявністю великої кількості хворих з ранами та ушкодженнями шкіри, які потребують як хірургічного, так і місцевого лікування. Число таких хворих зростає в зв'язку з підвищенням кількості побутових і виробничих травм [1, 2, 3], збільшенням дорожньо-транспортного травматизму [4, 5] та числа хворих і синдромом діабетичної стопи. На особливу увагу заслуговують поранені на Сході України, у яких первинна обробка рани часто обмежена лише бактерицидними засобами.

Раніше нами було показано, що меланін, продуцентом якого є антарктичні мікроорганізми Pseudonadsoniella brunea (Nadsoniella nigra sp. X-1) [6], висіяні із зразків вертикальних скель острова Галіндез (Українська антарктична станція "Академік Вернадський"), володіє вираженою цитопротекторною дією, сприяє швидкому загоєнню ран різної етіології без утворення колоїдного рубця і може бути запропонований в якості субстанції для нового дерматотропного препарату. Нами була створена нова фармакологічна композиція, до складу якої входить речовина природного походження – меланін (0,1 % Melanin), розчинений в (0,5 % карбополі (Carbopol 980)). Меланін – стабільний полімерний макрорадикал. Карбопол – це ціла група сполук, що являють собою карбоксиакрилові чи карбоксивінилові полімери, які використовують як основу для гелів та крем-гелів [7]. Протягом усього терміну придатності гель з карбополом не розшаровується, не висихає, не змінює колір. Запропонована фармакологічна композиція фактично являє собою рідку пов'язку, яка не спричиняє алергічну та подразнювальну дії, проте потребує подальшого вивчення механізмів дерматотропної дії.

Останнім часом накопичена достатня кількість доказів важливої ролі вільнорадикального окиснення в загоєнні ран. Перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ) – основний шлях утворення вільних радикалів – регулює перебіг тканинних метаболічних процесів, що впливають на хід регенерації. Надлишок вільних радикалів, які накопичуються в результаті ланцюгової реакції (активних форм кисню (АФК) – синглетний кисень, гідроксильний і супероксидний радикали, перекис водню), викликає окисну модифікацію макромолекул, що призводить до стуктурно-функціональних змін клітинних структур [8]. Важливе місце у формуванні антиоксидантного захисту організму виконує глутатіонова система, яка здійснює антиоксидантні функції, бере участь у біотрансформації екзогенних та ендогенних сполук, підтримує редокс-гомеостаз.

Метою нашої роботи було з'ясувати роль глутатіонової ланки ферментативної антиоксидантної системи в патогенезі лінійної різаної рани під впливом нової фармакологічної композиції на основі меланіну в сироватці крові щурів.

Об'єкт та методи досліджень. Для моделювання ранового процесу використовували білих нелінійних лабораторних щурів-самців віком 3–5 міс., масою 200–250 г. Утримання тварин та експерименти проведені згідно етичним принципам, ухваленими Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 року), міжнародними угодам та національним законодавством у цій галузі [9] та біоетичною комісією ННЦ "Інститут біології" Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Перед початком експерименту щурів утримували на карантині та маркували нанесенням надсічок на вушні раковини. За добу до проведення експерименту тварин піддавали харчовій депривації з вільним доступом до води.

Усіх тварин розділяли на чотири експериментальні групи: I – контрольна, модель різаної рани, яка гоїлась самостійно шляхом епітелізації; II група – тваринам, починаючи з наступного дня після моделювання різаної рани, двічі на добу впродовж усіх термінів спостереження наносили на ранову поверхню карбопол за допомогою металевого шпателя, який перед кожним використанням фламбували; III – після моделювання рани, тваринам двічі на добу впродовж усього експерименту наносили фармакологічну композицію на основі меланіну. Окрему групу склали інтактні тварини, у яких визначали фізіологічний рівень досліджуваних показників.

Площинні рани відтворювали на попередньо депільованій ділянці шкіри, у наркотизованих щурів (тіопентал натрію (BiochemieGmbH/Austria), 5мг/100 г). Для моделювання рани використовували попередньо виготовлений квадратний трафарет, за допомогою хірургічних скальпеля та пінцету вирізали шкіру розміром 1Ч1 $см^2$ [10]. Нанесення фармакологічної композиції починали одразу після відтворення ран і до повного загоєння.

Оскільки при виконанні роботи досліджувався характер перебігу експериментального ранового процесу м'яких тканин, то термінами спостереження було обрано його ключові етапи загоєння – 3, 6, 9, 14 доби та день епітелізації рани, коли послідовно змінюється фаза гострих запальних явищ з вираженою гідратацією, фазами деградації та некролізу, початком розвитку грануляцій, повним заповненням поверхні рани грануляційною тканиною, початком краєвої епітелізації та закриттям дефекту рани шкірою [11].

Для біохімічних досліджень використовували сироватку крові. Вміст білка вимірювали за методом Лоурі [12]. Активність глутатіонпероксидази визначали по накопиченню окисненого глутатіону, глутатіон-S-трансферазну активність оцінювали за швидкістю

© Табурець О., Дворщенко К., Тимошенко М., Верещака В., Берегова Т., Остапченко Л., 2017

утворення хромогенного глутатіонового кон'югату 3 1-хлор-2,4-динітробензолом [13]. Активність глутатіонредуктази визначали по перетворенню окисненого глутатіону у відновлену форму з використанням водню нікотинамідних коферментів [13]. Вміст відновленого та окисненого глутатіону оцінювали згідно методу [14].

Статистичну обробку результатів досліджень проводили на комп'ютері з використанням програмного пакету Statistica 10 (StatSoft, Inc.) [15]. Отримані дані тестували на нормальне розподілення за допомогою тесту Шапіро-Вілка та перевіряли рівність дисперсій за тестом Левена. Подальший обрахунок результатів відбувався за допомогою двофакторного дисперсійного аналізу (two-way ANOVA) із пост тестом Бонферонні. Отримані результати наведені у вигляді середнього арифметичного ± середньоквадратичне відхилення (дисперсія) – SD. Результати вважали значущими при $p \le 0,05$.

Результати та обговорення. При дослідженні ферментів глутатіонової системи у сироватці крові показано, що активність глутатіонпероксидази (ГЛП) у І групі тварин з різаними ранами зростала в 1,7, 1,4, 1,6, 1,4 та 2,2 раза ($p < 0,05$) на 3, 6, 9, 14 добу та в день повної епітелізації рани відповідно, порівняно з інтактними тваринами. В ІІІ групі щурів, яким наносили фармакологічну композицію, цей показник був в 1,7, 1,3, 1,5 ($p < 0,05$) раза більшим на 3, 6 та 9 добу щодо інтактних тварин та статистично достовірно не відрізнявся від інтактиних щурів на 14 добу та в день повної епітелізації рани, проте знижувався у ІІІ групі тварин в 1,8 та 3,2 раза ($p < 0,05$) на 14 добу та в день повної епітелізації рани, порівняно з І групою тварин (тварини з різаними ранами). При використанні карбополу (ІІ група тварин) не було виявлено статично достовірних змін на 3, 6 та 9 добу відносно групи тварин з фармакологічною композицією (ІІІ група), але на 14 добу та в день повної епітелізації рани показано зростання даного показника в 2,2 та 2,4 раза ($p < 0,05$) відповідно, в порівнянні з ІІІ групою тварин (табл. 1).

Протягом усього експерименту спостерігалось підвищення глутатіонтрансферазної активності (ГЛТ) в сироватці крові І групи тварин на 3, 6, 9, 14 добу та в день повної епітелізації рани в 1,4, 1,9, 1,6, 1,8, та 1,9 раза ($p < 0,05$) стосовно інтактних тварин. Показано збільшення досліджуваного показника в ІІІ групі тварин на 6 та 9 добу загоєння в 1,6 і 1,7 раза ($p < 0,05$) відповідно, відносно інтактних тварин. Водночас показано зниження активності ГЛТ у ІІІ групі тварин на 3, 6, 14 та в день повної епітелізації рани в 1,5, 1,2, 1,7 та 2,0 раза ($p < 0,05$) відповідно, в порівнянні з І групою тварин.

Таблиця 1. **Показники глутатіонової системи у сироватці крові щурів при різаній рані в динаміці, (M±m, n=7)**

Групи тварин	Час, доба	ГЛП-на активність, нмоль GSSG Ч хв$^{-1}$ Ч мг білка$^{-1}$	ГЛТ-на активність, нмоль Ч хв$^{-1}$ Ч мг білка$^{-}$	ГЛР-на активність, мкмоль НАДФН Ч хв$^{-1}$ Ч мг білка$^{-1}$
Інтактні тварини	–	30,02 ± 2,75	6,65 ± 0,61	0,32 ± 0,03
І група (контроль)	3	52,49 ± 5,02*	9,56 ± 0,89*	0,17 ± 0,01*
	6	41,54 ± 3,87*	12,81 ± 1,05*	0,17 ± 0,01*
	9	47,48 ± 4,37*	10,71 ± 0,93*	0,21 ± 0,03*
	14	43,02 ± 4,01*	11,99 ± 1,02*	0,18 ± 0,02*
	Повна епітелізація	66,89 ± 6,19*	12,75 ± 1,13*	0,21 ± 0,02*
ІІ група (карбопол)	3	49,11 ± 4,43*	10,55 ± 0,89*	0,20 ± 0,01*
	6	47,21 ± 4,17*	9,82 ± 0,91*	0,23 ± 0,02*
	9	45,59 ± 4,02*	12,01 ± 1,05*	0,22 ± 0,02*
	14	52,47 ± 5,07*	12,49 ± 1,13*	0,22 ± 0,02*
	Повна епітелізація	50,61 ± 4,79*	10,19 ± 0,87*	0,23 ± 0,02*
ІІІ група (фармакологічна композиція)	3	52,05 ± 5,03*	6,56 ± 0,58#	0,19 ± 0,02*
	6	40,42 ± 3,81*	10,74 ± 0,85*#	0,22 ± 0,02*
	9	43,88 ± 4,05*	11,24 ± 1,03*	0,25 ± 0,02*
	14	24,15 ± 2,17#	7,18 ± 0,64#	0,28 ± 0,02#
	Повна епітелізація	20,71 ± 1,98#	6,12 ± 0,54#	0,29 ± 0,03#

*Примітка: *-p< 0,05 порівняно з інтактними тваринами, #-p< 0,05 порівняно з контрольними тваринами.*

При використанні карбополу (ІІ група тварин) показано підвищення досліджуваного показника в 1.6, 1.7 та 1.7 раза ($p < 0,05$) на 3, 6 добу та в день повної епітелізації рани відповідно, порівняно з ІІІ групою тварин (табл.1).

При пошкодженні шкіри активність ГЛР суттєво знижувалась на 3, 6, 9, 14 доби та в день повної епітелізації рани в 1,9, 1,9, 1,5, 1,8 та 1,5 раза ($p < 0,05$) порівняно з інтактними тваринами. Схожа картина спостерігалась у групі тварин, яким наносили досліджувану композицію (ІІІ група), даний показник знижувався на 3, 6 та 9 добу експерименту в 1,7, 1,5 та 1,3 раза ($p < 0,05$) відповідно, в порівнянні з інтактними тваринами, на 14 добу та в день повної епітелізації рани показник повертався до рівня інтактних тварин. У тварин ІІ групи активність ГЛР знижувалась на 14 добу та в день повної епітелізації рани в 1,3 раза ($p < 0,05$) відносно тварин ІІІ групи (табл.1).

Таким чином, встановлено, що при нанесенні на уражену ділянку шкіри досліджуваної фармакологічної композиції активність ферментів системи глутатіону в сироватці крові знижується в меншому ступені і відновлюється швидше відносно контролю. При порівнянні ефективності застосування карбополу та меланіну, що входить до складу фармакологічної композиції, можна зробити висновок, що саме меланін є домінуючим компонентом який зумовлює фармакологічну дію досліджуваної композиції.

Таблиця 2. **Вміст глутатіону в сироватці крові щурів при різаній рані, (M±m, n=7)**

Групи тварин	Час, доба	Вміст відновленого глутатіону, нмоль Ч мг білка$^{-1}$	Вміст окисненого глутатіону, нмоль Ч мг білка$^{-1}$
Інтактні тварини	–	20,55 ± 1,87	5,73 ± 0,54
I група (контроль)	3	12,08 ± 1,09*	8,89 ± 0,81*
	6	13,76 ± 1,11*	8,32 ± 0,76*
	9	15,03 ± 1,38*	7,89 ± 0,72*
	14	15,55 ± 1,47*	7,73 ± 0,63*
	Повна епітелізація	14,97 ± 1,41*	7,61 ± 0,73*
II група (карбопол)	3	13,01 ± 1,25*	8,38 ± 0,81*
	6	14,55 ± 1,39*	8,12 ± 0,77*
	9	15,28 ± 1,46*	7,71 ± 0,72*
	14	15,12 ± 1,37*	7,49 ± 0,64*
	Повна епітелізація	15,93 ± 1,51*	7,55 ± 0,69*
III група (фармакологічна композиція)	3	15,21 ± 1,44*#	6,81 ± 0,63#
	6	15,79 ± 1,36*	6,19 ± 0,58#
	9	17,14 ± 1,62	5,91 ± 0,55#
	14	19,21 ± 1,73#	5,78 ± 0,52#
	Повна епітелізація	23,24 ± 2,05#	5,46 ± 0,51#

*Примітка: *-p< 0,05 порівняно з інтактними тваринами, #-p< 0,05 порівняно з контрольними тваринами.*

Як видно з результатів, представлених у таблиці (табл. 2), за умов моделювання різаної рани змінювався вміст відновленого глутатіону в сировтці крові щурів.

У I групі в сироватці крові вміст відновленого глутатіону знижувався на 3, 6, 9, 14 добу та в день повної епітелізації рани в 4,2, 1,5, 1,4 1,3 та 1,4 раза ($p < 0,05$) відповідно, у порівнянні з інтактними тваринами. Вміст відновленого глутатіону знижувався в 1,4 та 1,3 раза на 3 та 6 добу відносно інтактних тварин, в інші дні ранового процесу даний показник статистично достовірно не відрізнявся від інтактних тварин, однак вміст досліджуваного показника підвищувався в III групі тварин на 3, 14 добу та в день повної епітелізації рани в 1,3, 1,3 та 1,6 раза ($p < 0,05$) відповідно, порівняно з I групою тварин. При дослідженні впливу карбополу (II група) вміст відновленого глутатіону статистично не відрізнявся від III групи тварин, окрім 14 доби та дня повної епітелізації рани, коли даний показник знижувався в 1,3 та 1,4 ($p < 0,05$) раза відносно тварин, яким наносили фармакологічну композицію (табл. 2).

Рівень окисненого глутатіону підвищувався в I групі тварин на 3, 6, 9, 14 добу та в день повної епітелізації рани в 1,5, 1,5, 1,4, 1,3 та 1,3 раза ($p < 0,05$) відповідно, порівняно з інтактними тваринами. У групі тварин, яким наносили досліджувану композицію (III група) концентрація окисненого глутатіону статистично достовірно не відрізнялась від рівня інтактних тварин на усіх етапах ранового процесу, одначе знижувалась в 1,3, 1,4, 1,3, 1,3 та 1,4 раза ($p < 0,05$) на 3, 6, 9, 14 добу та в день повної епітелізації рани, відносно I групи тварин. В II групі тварин досліджуваний показник зростав на усіх етапах ранового процесу в 1.2, 1.3, 1.3, 1.3, 1,4 раза ($p < 0,05$) порівняно з III групою тварин (табл. 2).

Отримані нами результати узгоджуються з даними літератури, Santram Lodhi та інші, у своїх дослідах на моделі експериментальних різаних ран спостерігали значне зниження рівня антиоксидантів (СОД, КАТ, і відновленого глутатіону після поранення шкіри [16].

Іншими дослідниками показано, що вплив на шкіру пошкоджуючих чинників (механічне пошкодження, хімічний та термічний опіки) викликає окисний стрес, обумовлений посиленням перекисних процесів. При цьому відбувається мобілізація ресурсів антиоксидантного захисту, що виражається в підвищенні активності основних антиоксидантних ферментів – супероксиддисмутази і ГЛП. Збільшення активності ГЛП супроводжується зниженням рівня вмісту відновленого глутатіону, який витрачається в глутатіопероксидазній реакції, а також підвищенням активності каталази, що утилізує перекис водню, який утворився при активації СОД. Зниження активності ГЛТ, описане роботі [17], а також спостерігається в проведених нами експериментах, свідчить про те, що при впливі на шкіру пошкоджуючих чинників, стимулюючих розвиток окисного стресу, відбувається порушення процесу детоксикації продуктів ВРО і їх виведення з організму. Накопичення токсичних продуктів ПОЛ може сприяти окисній момодифікації білків і утворенню карбонілпохідних амінокислот в них [17], а також приводити до посилення фрагментації геномної ДНК і індукуванню апоптозу в кератиноцитах [18]

Згідно отриманих нами даних та результатів попередніх досліджень [19], у щурів з експекриментальною моделлю різаної рани порушується рівновага в системі ПОЛ-АОС в бік активації процесів вільнорадикального окиснення на фоні зниження захисних механізмів організму, що призводить до вивільнення у системний кровообіг продуктів ліпопероксидації та ендотоксинів і сприяє розвитку ендогенної інтоксикації, в результаті чого виникає дисбаланс численних біохімічних процесів, що може впливати на важкість перебігу загоєння ран.

За умов застосування нової фармакологічної композиції можна стверджувати про відновлення показників глутатіонової ланки АОС.

Висновок. Таким чином, композиція на основі меланіну проявляє антиоксидантні властивості. Карбопол відіграє лише роль основи для досліджуваної фармакологічної композиції та не впливає на процес загоєння ран, ключовим компонентом є меланін. Зважаючи на те, що меланін – є поліфенольною сполукою, що володіє здатністю нейтралізувати вільні радикали та продукти ліпопероксидації біомембран, запобігає продовженню патологічних ланцюгових реакцій та сприяє швидшому гоєнню ран.

Список використаних джерел

1. *Сергиени Е. В.* Актуальные вопросы медицинской реабилитации инвалидов в Украине / Е. В. Сергиени // Мед. реабилитация, курортология и физиотерапия, 1998. – № 1. – С. 52–53.

2. *Тищенко В. В.* Общая класификация травмы / В. В. Тищенко // Клінічна хірургія, 1999. – №. 1. – С. 41–43.

3. *Zwerling C.* Occupational injuries among workers with disabilities / C. Zwerling, P. Whitten, C. Davis // American Journal of Public Health, 1997. – Vol. 24. – P. 2163–2166.

4. *Журавлев С. М.* Мототранспортные несчастные случаи. Клинико-статистические и профилактические проблемы / С. М. Журавлев, К. А. Теодоридис, П. Е. Новиков // Вестник травматологии, 1997. – Вип. 46, №. 4/5. – С. 8–14.

5. *Корж М. О.* Медичні проблеми автодорожнього травматизму / М. О. Корж, В. О. Танькут, В. А. Філіпенко // Сб. науч. тр. ХГКБСНП, 2001. – Вып. 2, №. 4. – С. 23–26.

6. *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. – P. 291–320.

7. *Зимон А. Д.* Колоидная химия / А. Д. Зимон, А. Д. Лещенко // Химия. – 1995. -– С. 326.

8. *Bretyn-Romero R.* Hydrogen peroxide signaling in vascular endothelial cells / R. Bretyn-Romero, S. Lamas // Redox Biol., 2014. – Vol, 2. – P. 529–534.

9. *Перший* національний конгрес з біоетики // Еженедельник АПТЕКА, 2001. – № 308 (307).

10. *The Effect* of "Melanin-Gel" on the Wound Healing / O. V. Taburets, O. O. Morgaienko, T. O. Kondratyuk et al. // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sci., 2016. – Vol. 7, № 3. – P. 2031-2038.

11. *Schdfer M.* Oxidative stress in normal and impaired wound repair / S. Werner, M. Schdfer // Pharmacological Research, 2008. – Vol. 58. – P. 165–171.

12. *Hartree E. F.* Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response / E. F. Hartree // Analytical biochemistry, 1972. – Vol. 48, №. 2. – P. 422-427.

13. *Власова С. Н.* Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей / С. Н. Власова, Е. И. Шабунина, И. А. Преслегина // Лаб. дело, 1990. – № 8. – С. 19-22.

14. *Mokrasch L. C.* Glutathione content of cultured cells and rodent brain regions: a spesific fluorometric assay / L. C. Mokrasch, E. J. Teschke // Analytical Biochemistry, 1984. – P. 506-509.

15. *Філімонова Н. Б.* Статистичний аналіз даних відповідно до засад науково обгрунтованої медицини. Первинний аналіз кількісних даних, подання результатів експерименту / Н. Б. Філімонова, І. О. Філь, Т. С. Михайлова // Медицина залізничного транспорту України, 2004. – № 4. – С. 85-93.

16. *Lodhi S.* Wound Healing Effect of Flavonoid Rich Fraction and Luteolin Isolated From Martynia Annua Linn. On Streptozotocin Induced Diabetic Rats / S. Lodhi, K. Abhay // Asian. Pac. J. Trop. Med., 2013. – Vol. 6. – P. 253-259.

17. *Svobodova A.* Acute exposure to solar stimulated ultraviolet radiation affects oxidative stress-related biomarkers in skin, liver and blood of hairless mice / A. Svobodova, J. Galandakova, A. Sianska // Biol. Pharm. Bull., 2011. – Vol. 34. – P. 471-479.

18. *Iwasaki K.* Thermal injury induces both necrosis and apoptosis in rat skin / K. Iwasaki, M. Izawa, M. Mihara // J. Dermatol. Sci., 1996. – Vol. 12. – P. 31-35.

19. *Вплив* меланіну на прооксидантно-оксидантний гомеостаз у сироватці крові за умови різаної рани шкіри щурів / О. В. Табурець, О. О. Грінченко, К. О. Дворщенко та ін. // Вісн. проблем біології та медицини, 2017. – № 1. – С. 191–196.

References

1. Сергиени Е.В. Актуальные вопросы медицинской реабилитации инвалидов в Украине. Мед. реабилитация, курортология и физиотерапия.1998;4: 52-53.

2. Тищенко В.В. Общая класификация травмы. Клінічна хірургія 1999;3: 41-43.

3. Zwerling C., Whitten P., Davis C. Occupational injuries among workers with disabilities. American Journal of Public Health. 1997;24:2163-2166.

4. Журавлев С.М, Теодоридис К.А., Новиков П.Е. Мототранспортные несчастные случаи. Клинико-статистические и профилактические проблемы. Вестник травматологии. 1997;46: 8-14.

5. Корж М.О., Танькут В.О., Філіпенко В.А. Медичні проблеми автодорожнього травматизму. Сборник научных трудов ХГКБСНП. 2001;2:23-26.

6. Kondratyuk T.O., Kondratyuk S.Y., Morgaienko O.O., Khimich M.V., Beregova T.V., Ostapchenko L.I. 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. Acta Botanica Hungarica. 2015;57:291-320.

7. Зимон А.Д., Лещенко А.Д. Колоидная химия. Химия.1995: 326.

8. Bretyn-Romero R., Lamas S. Hydrogen peroxide signaling in vascular endothelial cells. Redox Biol. 2014;2:529-534.

9. Перший національний конгрес з біоетики. Еженедельник АПТЕКА. 2001;37.

10. Taburets O.V., Morgaienko O.O., Kondratyuk T.O., Beregova T.V., Ostapchenko L.I. The Effect of "Melanin-Gel" on the Wound Healing. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2016;7:2031-2038.

11. Schdfer M., Werner S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. Pharmacological Research. 2008;58:165-171.

12. Hartree E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Analytical biochemistry. 1972;48:422-427.

13. Власова С. Н., Шабунина Е. И., Преслегина И.А. Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей. Лаб. дело.1990;8:19-22.

14. Mokrasch L. C., Teschke E. J. / Glutathione content of cultured cells and rodent brain regions: a spesific fluorometric assay. Analytical Biochemistry.1984;140:506-509.

15. Філімонова Н. Б., Філь І.О., Михайлова Т. С. Статистичний аналіз даних відповідно до засад науково обгрунтованої медицини. Первинний аналіз кількісних даних, подання результатів експерименту. Медицина залізничного транспорту України.2004;4: 85-93.

16. Lodhi S., Abhay K. Wound Healing Effect of Flavonoid Rich Fraction and Luteolin Isolated From Martynia Annua Linn on Streptozotocin Induced Diabetic Rats. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 2013;6: 253-259.

17. Svobodova A., Galandakova J., Sianska A. Acute exposure to solar stimulated ultraviolet radiation affects oxidative stress-related biomarkers in skin, liver and blood of hairless mice. Biol. Pharm. Bull. 2011;34: 471-479.

18. Iwasaki K., Izawa M., Mihara M. Thermal injury induces both necrosis and apoptosis in rat skin. J. Dermatol. Sci. 1996;12: 31-35.

19. Табурець О.В., Грінченко О.О., Дворщенко К.О., Верещака В.В., Л.І. Остапченко. Вплив меланіну на прооксидантно-оксидантний гомеостаз у сироватці крові за умови різаної рани шкіри щурів. Вісник проблем біології та медицини. 2017;1:191-196.

Надійшла до редколегії 20.03.17

**О. Табурец, асп., К. Дворщенко, д-р биол. наук, М. Тимошенко, канд. биол. наук,
В. Верещака, д-р мед. наук, Т. Береговая, д-р биол. наук, Л. Остапченко, д-р биол. наук,
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина**

ГЛУТАТИОНОВАЯ СИСТЕМА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС В ДИНАМИКЕ РЕЗАНОЙ РАНЫ И ПРИ ДЕЙСТВИИ НОВОЙ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ МЕЛАНИНА

Исследовано активность ферментов глутатионового звена антиоксидантной системы у крыс с экспериментальными резаными ранами. Установлено, что в сыворотке крови крыс в условиях экспериментальной модели резаной раны снижается уровень востановленого глутатиона и глутатионредуктазная активность, возрастает глутатионпероксидазная и глутатионтрансферазная активности. При использовании новой фармакологической композиции на основе меланина, показано нормализацию исследованных показателей.

Ключевые слова: резаная рана, меланин, глутатионовая система.

**O. Taburets, Ph. D. stud., K. Dvorshenko, D. Sci., M. Tymoshenko, Ph. D.,
V. Vereschaka, D. Sci., T. Beregova, D. Sci., L. Ostapchenko, D. Sci.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine**

GLUTATHION SYSTEM IN THE SERUM OF BLOOD RATS IN THE DYNAMICS OF FULL-THICKNESS WOUNDS AND WITH THE INFLUENCE OF THE NEW PHARMACOLOGICAL COMPOSITION WHICH CONTAIN MELANINE

The activity of enzymes of the glutathione link of the antioxidant system in rats with experimental full-thickness wound has been studied. It is established that in the serum of rats under the experimental model of the cut wound the level of recovered glutathione and glutathione reductase activity decreased, glutathione peroxidase and glutathione transferase activity increased. All investigated parameters normalized in dynamics after treatment with melanin.

Key words: full-thickness wound, melanin, glutathione system.

УДК 616.72-002: 571.27.

**К. Дворщенко, д-р біол. наук, М. Ашпін, асп., О. Короткий, канд. біол. наук,
Є. Торгало, канд. біол. наук, Т. Фалалєєва, д-р біол. наук
Київський національний університет ім. Тараса Шевченка, Київ, Україна**

ДІЯ ХОНДРОЇТИН СУЛЬФАТУ НА РІВЕНЬ ЦИТОКІНІВ ТА АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ЗА УМОВ КАРАГІНАН-ІНДУКОВАНОГО ЗАПАЛЕННЯ

Встановлено, що при карагінан-індукованому запаленні задньої кінцівки в сироватці крові зростає концентрація прозапальних цитокінів (ІЛ-1β, ФНП-α) і збільшується вміст активних форм кисню (супероксидного радикалу, перекису водню). При введенні препарату на основі хондроїтин сульфату в сироватці крові знижується рівень прозапальних цитокінів та активних форм кисню, при цьому концентрація ІЛ-10 зростає в 1,7 раза щодо групи тварин з карагінан-індукованим запаленням.

Ключові слова: карагінан-індуковані запалення, сироватка крові, протизапальні цитокіни.

Вступ. За даними статистики Всесвітньої організації охорони здоров'я захворювання опорно-рухового апарату займають третє місце за розповсюдженням серед населення та перше місце – серед причин тимчасової непрацездатності людей. Згідно даних літератури [1, 2] ці хвороби зустрічаються в кожної четвертої людини, а після 60-ти років – у 97 % населення. Серед порушень опорно-рухового апарату провідне місце займають захворювання суглобів різної локалізації, які стають частою причиною звернень пацієнтів до лікаря. Розвиток патології суглобів пов'язаний з цілим рядом факторів: інфекційні захворювання, механічні травми, надлишкова вага, хвороби хребта, аутоумінні процеси, порушення обміну речовин, малорухливий спосіб життя, спадкова схильність, неправильне харчування, хронічний стрес тощо [3]. Соціальна значимість патології суглобів визначається високим ступенем розповсюдженості, багаторічним персистуванням болю і запалення та поступовим погіршенням якості життя хворих.

Тривалі запальні процеси у суглобі здатні призводити до дегенеративних змін хрящової тканини. В зв'язку з цим важливим є пошук препаратів, які б володіли регенераційними та протизапальними властивостями. Дистрофічні зміни хрящової тканини можуть формуватись внаслідок зниження вмісту компоненту міжклітинної речовини хряща – хондроїтин сульфату, який забезпечує його пружність та щільність [4, 5]. Тому дослідження властивостей засобів, основу яких складає хондроїтин сульфат, є перспективним у профілактиці та лікуванні захворювань суглобів. У наших експериментах було досліджено препарат "Драстоп", основною складовою частиною якого є хондроїтин сульфат.

Метою роботи було дослідити дію препарату "Драстоп" на концентрацію цитокінів та активних форм кисню у сироватці крові щурів при карагінан-індукованому гострому запаленні задньої кінцівки.

Об'єкт та методи досліджень. Дослідження проведені на білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях масою 180-240 г з дотриманням загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 року), інших міжнародних угод та національного законодавства у цій галузі.

Усіх тварин розподілили на три експериментальні групи. Перша група – інтактний контроль. Другій групі тварин моделювали гостре запалення кінцівки щурів шляхом субплантарного введення 0,1 мл 1 % розчину карагінану в задню праву лапу [6]. Третій групі тварин за 1 год до введення карагінану внутрішньом'язово вводили у терапевтичній дозі 3 мг/кг препарат "Драстоп" (об'єм речовини становив 1 мл/кг). Сироватку крові щурів отримували через 3 години після введення препаратів.

Концентрацію цитокінів (інтерлейкін (ІЛ)-1, ІЛ-10, фактор некрозу пухлин (ФНП-α)) визначали методом мультиканальної хемілюмінесценції із мультипараметричним імунохімічним біочіпом [7]. Вміст супероксидного радикалу визначали за утворенням ХТТ-формазану [8]. Вміст пероксиду водню вимірювали у системі сорбітол-ксиленол оранж [9]. Статистичну обробку результатів дослідження проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики [10]. Вірогідність різниці між контрольними та дослідними вимірами оцінювали методом однофакторного дисперсійного аналізу.

Результати та їх обговорення. Визначення цитокінового профілю у крові є важливим діагностичним інструментом, що дозволяє оцінити функціональну активність різних типів іммунокомпетентних клітин, важкість запального процесу на системному рівні та прогноз перебігу захворювання. Для дослідження антизапальних властивостей препарату "Драстоп" в умовах розвитку карагінан-індукованого запалення у тварин нами було визначено у крові співвідношення прозапальних (ІЛ-1β, ФНП-α) та протизапальних цитокінів (ІЛ-10).

Встановлено, що у щурів при гострому запаленні задньої кінцівки, індукованого карагінаном, у сироватці крові зростає концентрація ІЛ-1β – в 1,9 раза та ФНП-α – в 5 разів відносно контролю (табл. 1). За даних експериментальних умов концентрація ІЛ-10 залишається в межах контрольних значень. При введенні препарату "Драстоп" щурам з експериментальною моделлю гострого локального запалення в сироватці крові спостерігається зниження рівня ІЛ-1β – в 1,3 раза та ФНП-α – в 1,6 раза порівняно з групою тварин з експериментальною моделлю запалення, індукованого карагінаном (табл. 1). При цьому виявлено, що у групі щурів, яким вводили хондропротектор, зростала концентрація ІЛ-10 – в 1,7 раза відносно групи тварин, яким вводили карагінан.

Таблиця 1. **Концентрація цитокінів у сироватці крові щурів при гострому запаленні задньої кінцівки та при введенні хондропротектора, пг Ч мл$^{-1}$ (M ± m, n = 10)**

Групи тварин / Показник	Контроль	Карагінан	Карагінан + "Драстоп"
інтерлейкін 1β	113,09 ± 10,14	219,18 ± 12,31*	169,05 ± 14,13$^{*/\#}$
фактор некрозу пухлин-α	73,13 ± 8,01	363,25 ± 36,14*	234,17 ± 21,05$^{*/\#}$
інтерлейкін 10	34,72 ± 1,53	37,53 ± 1,92	62,71 ± 8,51$^{*/\#}$

*Примітка: * – p < 0,05 відносно контролю; # – p < 0,05 відносно групи тварин, яким вводили карагінан.*

© Дворщенко К., Ашпін М., Короткий О., Торгало Є., Фалалєєва Т., 2017

Отримані результати свідчать про те, що на фоні карагінанового набряку кінцівки у сироватці крові порушується баланс про- та протизапальних цитокінів у бік розвитку запалення, що є відповіддю організму на патогенні фактори. Під дією препарату "Драстоп" у щурів з експериментальною моделлю гострого локального запалення в сироватці крові рівень прозапальних цитокінів частково знижується, але не досягає значень інтактних тварин. Антизапальний ефект досліджуваного хондропротектора обумовлений посиленою секрецією протизапального цитокіну ІЛ-10.

Збільшення синтезу прозапальних цитокінів ІЛ-1β та ФНП-α у сироватці крові за умов гострого запалення, викликаного карагінаном, відображає ступінь мобілізації запальної відповіді організму при досліджуваній патології суглобів. Гіперпродукція прозапальних цитокінів спричинює підвищення синтезу та експресії матриксних металопротеїназ у тканинах суглобу. Прозапальні цитокіни активують хондроцити, які в свою чергу також здатні продукувати прозапальні цитокіни. В уражених суглобах роль ефекторів запалення, головним чином, виконують клітини синовіальної мембрани. Саме синовіоцити макрофагального типу секретують протеази та медіатори запалення. Цитотоксичні ефекти прозапальних цитокінів, перш за все ФНП-α, обумовлюють основні прояви патологій суглобів, таких як деструктивні ураження хряща та кістки, хронічний синовіт та ін. Секреція даного цитокіну макрофагами та лімфоцитами починається після дії таких індукторів як бактерії та компоненти їх стінки. Під впливом ФНП-α різко зростає утворення макрофагами та нейтрофілами перекису водню та інших вільних радикалів. Біологічна активність ФНП-α опосередковується зв'язуванням зі специфічними рецепторами, які експресуються на нейтрофільних лейкоцитах, ендотеліоцитах, фібробластах та ін. ФНП-α запускає механізм активації факторів транскрипції (NF-kB, AP-1, JNK та ін.), які, в свою чергу, регулюють активність генів, що кодують синтез прозапальних цитокінів (ІЛ-1, ІЛ-6, ІЛ-8 та ІФ-γ) та інших медіаторів запалення [11, 12].

Важливу роль у розвитку та прогресуванні запалення у суглобах відіграє оксидативний стрес, який виникає внаслідок постійної генерації вільних радикалів активованими фагоцитами та за рахунок гіпоксичних процесів при роботі суглобів, що призводить до пошкодження синовіальних клітин, деструкції хрящової тканини, ерозії кісток та суглобових поверхонь [13]. Нами виявлено, що при гострому запаленні задньої кінцівки у сироватці крові вміст активних форм кисню (АФК) зростає: супероксидного радикалу – в 1,6 раза та перекису водню – в 1,5 раза відносно контролю (табл. 2). При введенні препарату "Драстоп" щурам з експериментальною моделлю гострого локального запалення в сироватці крові вміст супероксидного радикалу знижується в 1,3 раза відносно групи тварин з карагінан-індукованим локальним запаленням та спостерігається відновлення до контрольних значень вмісту пероксиду водню (табл. 2).

Таблиця 2. **Вміст активних форм кисню у сироватці крові щурів при гострому запаленні задньої кінцівки та при введенні хондропротектора, (M ± m, n = 10)**

Групи тварин / Показник	Вміст супероксидного радикалу, мкмоль ХТТ-формазану Ч мг білка$^{-1}$	Пероксид водню, мкмоль Ч мг білка$^{-1}$
Контроль	4,31 ± 0,37	0,32 ± 0,03
Карагінан	7,05 ± 0,68*	0,47 ± 0,04*
Карагінан + хондропротектор	5,29 ± 0,46$^{*/\#}$	0,35 ± 0,03$^{\#}$

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

Отримані нами результати свідчать, що маніфестація суглобових уражень відбувається за участю активації цитокінової системи, яка характеризується порушенням балансу між прозапальними (ІЛ-1β, ФНП-α) та антизапальними (ІЛ-10) цитокінами та інтенсифікації вільнорадикальних процесів (збільшення вмісту O_2^- та H_2O_2). Запальні зміни здатні призводити до загибелі хондроцитів, дегенерації суглобового хряща та субхондральної кістки. Для сповільнення прогресування патологічних змін при досліджуваній експериментальній моделі та для стабілізації структурних змін у суглобовому хрящі ефективним було введення препарату "Драстоп", який містить хондроїтин сульфат, що є одним з основних компонентів екстрацелюлярного матрикса хряща та є складовою протеоглікановых комплексів основної речовини хрящової тканини. Виявлене зниження рівня прозапальних цитокінів та вмісту АФК у сироватці крові при введенні хондроїтин сульфату щурам з експериментальною моделлю гострого запалення задньої кінцівки пов'язано з антизапальними та регенераційними властивостями препарату "Драстоп" на хрящову тканину. Хондроїтин сульфат активує анаболічні процеси за рахунок стимуляції синтезу протеогліканів і колагену, а також пригнічує синтез ферментів деструкції хряща (металопротеїнази 3, 9, 13, 14; катепсину-бета, лейкоцитарної еластази) [14]. Таким чином, препарат "Драстоп" є ефективним засобом корекції при експериментальній моделі гострого запалення кінцівки.

Список використаних джерел

1. *Burden* of disability due to musculoskeletal (MSK) disorders/ L. March, E. U. Smith , D. G. Hoy et al. // Best Pract. Res. Clin. Rheumatol., 2014. – Vol. 28, № 3. – P. 353-366.
2. *Андрійчук О. Я.* Аналіз стану захворюваності та поширеності хвороб кістково-м'язової системи в Україні та Волинській області / О. Я. Андрійчук, І. М. Григус // Проблеми фізичного виховання і спорту, 2010. – № 4. – С. 3-7.
3. *Man G. S.* Osteoarthritis pathogenesis – a complex process that involves the entire joint / G. S. Man, G. Mologhianu // J. Med. Life, 2014. – Vol. 7, № 1. – P. 37-41.
4. *Chitosan*, hyaluronan and chondroitin sulfate in tissue engineering for cartilage regeneration: a review / R. A. Muzzarelli, F. Greco, A. Busilacchi et al. // Carbohydr. Polym., 2012. – Vol. 89, № 3. – P. 723-739.
5. *Alterations* in the chondroitin sulfate chain in human osteoarthritic cartilage of the knee / D. Ishimaru, N. Sugiura, H. Akiyama et al. // Osteoarthritis Cartilage, 2014. – Vol. 22, № 2. – P. 250-258.
6. *Morris C. J.* Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse / C. J. Morris // Methods Mol. Biol., 2003. – Vol. 225. – P. 115–121.
7. *Monoclonal* antibody based enzyme-linked and chemiluminescent assays for the human interleukin-1 receptor antagonist. Application to measure hIL-1 receptor antagonist levels in monocyte cultures and synovial fluids / H. Towbin et al. // J. Immunol. Methods, 1994. – Vol. 170, № 1. – P. 125–135.
8. *Able A. J.* Use of new tetrazolium-based assay to study the production of superoxide radicals by tobacco cell cultures challenged with avirulent zoospores of Phytophtora parasitica varnicotianae / A. J. Able, D. I. Guest, M. W. Sutherland // Plant Physiol., 1998. – Vol. 177, № 2. – P. 491–499.
9. *Nourooz-Zadeh J.* Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation – Xylenol Orange assay / J. Nourooz-Zadeh, J. Tajaddini–Sarmadi, S. P. Wolff // Anal. Biochem., 1994. – Vol. 220. – P. 403–409.
10. *Реброва О. Ю.* Статистический анализ медицинских данных / О. Ю. Реброва. – М. : Информполиграф, 2002.
11. *Decreased* expression of microRNA-130a correlates with TNF-α in the development of Osteoarthritis / Z. C. Li, N. Han, X. Li et al. // Int. J. Clin. Exp. Pathol., 2015. – Vol. 8, № 3. – P. 2555–2564.

11. *Regulation* of TNF-α with a focus on rheumatoid arthritis / E. A. Moelants, A. Mortier, Van J. Damme, P. Proost // Immunol. Cell Biol., 2013. – Vol. 91, № 6. – P. 393–401.

13. *Physiology* and pathophysiology of nitrosative and oxidative stress in osteoarthritic joint destruction / C. Ziskoven, M. Jdger, J. Kircher et al. // Can. J. Physiol. Pharmacol., 2011. – Vol. 89, № 7. – P. 455–466.

14. *Discrepancies* in composition and biological effects of different formulations of chondroitin sulfate / J. Martel-Pelletier, A. Farran, E. Montell et al. // Molecules, 2015. – Vol. 20, № 3. – P. 4277–4289.

References

1.March L., Smith E.U., Hoy D.G. et al. Burden of disability due to musculoskeletal (MSK) disorders // Best Pract. Res. Clin. Rheumatol. – 2014. – Vol. 28, №3. – P. 353-366. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25481420

2. Андрійчук О.Я., Григус І.М. Аналіз стану захворюваності та поширеності хвороб кістково-м'язової системи в Україні та Волинській області // Проблеми фізичного виховання і спорту. – 2010. – №4. – С. 3-7. Available from: https://www.researchgate.net/publication/268253810_Analiz_stanu_zahvoruvanosti_ta_posirenosti_hvorob_kistkovo-_m'azovoi_sistemi_v_Ukraini_ta_Volinskij_oblasti

3. Man G.S., Mologhianu G. Osteoarthritis pathogenesis – a complex process that involves the entire joint // J. Med. Life. – 2014. – Vol. 7, №1. – P. 37-41. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3956093/

4.Muzzarelli R.A., Greco F., Busilacchi A., Sollazzo V., Gigante A. Chitosan, hyaluronan and chondroitin sulfate in tissue engineering for cartilage regeneration: a review // Carbohydr. Polym. – 2012. – Vol. 89, №3. – P. 723-739. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861712004092

5. Ishimaru D., Sugiura N., Akiyama H. et al. Alterations in the chondroitin sulfate chain in human osteoarthritic cartilage of the knee // Osteoarthritis Cartilage. – 2014. – Vol. 22, №2. – P. 250-258. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24280246

6. Morris C.J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse // Methods Mol. Biol. – 2003. – Vol. 225. – P. 115–121. Available from: http://link.springer.com/protocol/10.1385/1-59259-374-7 %3A115

7. Monoclonal antibody based enzyme-linked and chemiluminescent assays for the human interleukin-1 receptor antagonist. Application to measure hIL-1 receptor antagonist levels in monocyte cultures and synovial fluids / H. Towbin et al. // J. Immunol. Methods. – 1994. – Vol. 170, № 1. – P. 125–135. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022175994902526

8. Able A.J. Use of new tetrazolium-based assay to study the production of superoxide radicals by tobacco cell cultures challenged with avirulent zoospores of Phytophtora parasitica varnicotianae / A.J. Able, D.I. Guest, M.W. Sutherland // Plant Physiol. – 1998. – Vol. 177, № 2. – P. 491–499. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9625702

9. Nourooz-Zadeh J. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation – Xylenol Orange assay / J. Nourooz-Zadeh, J. Tajaddini–Sarmadi, S.P. Wolff // Anal. Biochem. – 1994. – Vol. 220. – P. 403–409. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269784713571

10.Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. – М.: Информполиграф, 2002. – 305 с. Available from: http://www.twirpx.com/file/1440496/

11.Li Z.C., Han N., Li X. et al. Decreased expression of microRNA-130a correlates with TNF-α in the development of osteoarthritis // Int. J. Clin. Exp. Pathol. – 2015. – Vol. 8, №3. – P. 2555-2564. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4440070/

12.Moelants E.A., Mortier A., Van Damme J., Proost P. Regulation of TNF-α with a focus on rheumatoid arthritis // Immunol. Cell Biol. – 2013. – Vol. 91, №6. – P. 393-401. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23628802

13.Ziskoven C., Jдger M., Kircher J. et al. Physiology and pathophysiology of nitrosative and oxidative stress in osteoarthritic joint destruction // Can. J. Physiol. Pharmacol. – 2011. – Vol. 89, №7. – P. 455-466. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov

14.Martel-Pelletier J., Farran A., Montell E. et al. Discrepancies in composition and biological effects of different formulations of chondroitin sulfate // Molecules. – 2015. – Vol. 20, №3. – P. 4277-4289. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25756648

Надійшла до редколегії 02.03.17

Е. Дворщенко, д-р биол. наук, Н. Ашпин, асп., А. Короткий, канд. биол. наук,
Е. Торгало, канд. биол. наук, Т. Фалалеева, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ДЕЙСТВИЕ ХОНДРОИТИН СУЛЬФАТА НА УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ И АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРИ КАРРАГИНАН-ИНДУЦИРОВАННОМ ВОСПАЛЕНИИ

Выявлено, что при каррагинан-индуцированном воспалении задней конечности в сыворотке крови увеличивается концентрация провоспалительных цитокинов (ИЛ-1β, ФНО-α) и возрастает содержание активных форм кислорода (супероксидного радикала, перекиси водорода). При введении препарата на основе хондроитин сульфата в сыворотке крови снижается уровень провоспалительных цитокинов и активных форм кислорода, при этом концентрация ИЛ-10 увеличивается в 1,7 раза относительно группы животных с каррагинан-индуцированным воспалением.

Ключевые слова: каррагинан-индуцированное воспаление, сыворотка крови, противовоспалительные цитокины.

K. Dvorshchenko, D. Sci., M. Ashpin, Ph. D. stud., O. Korotkyi, Ph. D.,
Ye. Torgalo, Ph. D., T. Falalyeyeva, D. Sci.
Taras Schevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

ACTION OF CHONDROITIN SULFATE ON THE LEVEL OF CYTOKINES AND REACTIVE OXYGEN SPECIES IN BLOOD SERUM AT CARRAGEENAN-INDUCED INFLAMMATION

Increase of concentration of pro-inflammatory cytokines (IL-1β, TNF-α) is fixed in blood serum at* carrageenan-induced rat paw inflammation*, as well as increase of the content of reactive oxygen species (superoxide radical, hydrogen peroxide). At introduction of the preparation on the basis of chondroitin sulfate the level of pro-inflammatory cytokines and reactive oxygen species in blood serum decreases, while the concentration of IL-10 increases in 1,7 times concerning the group of animals with* carrageenan*-induced inflammation.

Key words:* carrageenan*-induced inflammation, blood serum, pro-inflammatory cytokines.

УДК 616.345-008.6-02+615.33.065]:612-092.9

Ю. Голота, асп., А. Базан, студ., Г. Толстанова, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ОКИСНО-АНТИОКСИДАНТНА РІВНОВАГА В СЛИЗОВІЙ ОБОЛОНЦІ ТОВСТОЇ КИШКИ ЩУРІВ У РІЗНІ ТЕРМІНИ ПІСЛЯ ВВЕДЕННЯ ЦЕФТРИАКСОНУ

Встановлено, що введення цефтриаксону впродовж 14 діб (300 мг/кг, в.м.) призводить до підвищення рівня ТБК-активних сполук та зниження активності ферментів антиоксидантного захисту супероксидисмутази і каталази в слизовій оболонці товстої кишки щурів одразу після введення антибіотика. На 29 добу експерименту (через 14 днів після відміни цефтриаксону) вміст ТБК-активних сполук все ще перевищував контрольні значення у 2,5 раза ($P < 0,05$), а активність супероксиддисмутази залишалась нижчою контрольних значень до 72 доби експерименту. Ці зміни супроводжувались зниженням вмісту білкових тіолових груп у 1,9 ($P < 0,05$) та 1,4 раза ($P = 0,08$) на 15 та 29 добу, відповідно. Отже, антибіотикотерапія може призводити до тривалих оксидативних порушень у слизовій оболонці товстої кишки щурів.

Ключові слова: цефтриаксон, товста кишка, оксидативний стрес

Вступ. Мікробіота кишечника бере участь в багатьох структурно-метаболічних процесах макроорганізму, визначаючи при цьому функціональний стан організму людини та, в першу чергу, стан шлунково-кишкового тракту [1, 2]. Сучасні дослідження свідчать, що дисбіотичні зміни складу мікробіоти товстої кишки під впливом різних факторів і несприятливих впливів послаблюють захисні механізми організму [3]. Тривалий потужний дисбіотичний вплив на мікробіоту кишечника можуть здійснювати антибіотики, які дуже широко використовуються в клінічній практиці. Ряд епідеміологічних досліджень підтвердив зв'язок між антибіотикотерапією і підвищеним ризи-

© Голота Ю., Базан А., Толстанова Г., 2017

ком розвитку запалення та метаболічних зрушень [4, 5]. Враховуючи вищенаведене, актуальним є вивчення віддалених наслідків антибіотикотерапії, зокрема механізмів функціональних порушень організму.

Нами [6] та іншими дослідниками [7] встановлено, що введення антибіотиків призводить до стійких тривалих змін в мікробіоті товстої кишки. Порушення у складі мікробіоти супроводжувалось зниженням її метаболічної активності. Так, введення антибіотику цефалоспоринового ряду цефтриаксону викликало тривалі зміни у вмісті коротколанцюгових жирних кислот (КЛЖК) у фекаліях щурів, зокрема зниження масляної, пропіонової та оцтової кислот [8]. Навіть через 56 діб після відміни антибіотика концентрація КЛЖК була нижчою від контрольних значень. Обумовлене введенням антибіотиків, тривале порушення складу та метаболічної активності мікробіоти призводило до руйнування слизового бар'єру товстої кишки щурів [9]. Оскільки масляна кислота відіграє суттєву роль в енергозабезпеченні ентероцитів, бере участь у підтриманні функцій кишкового бар'єру, зниження кількості КЛЖК може призводити до порушень окисно-антиоксидантного балансу в клітинах слизової оболонки товстої кишки [10]. Оксидативний стрес, в свою чергу є одним з основних механізмів, залучених в патогенез запальних захворювань кишечника [11, 12]. Метою даного дослідження було визначити тривалість оксидативних порушень в слизовій оболонці товстої кишки щурів після введення цефтриаксону впродовж 14 днів.

Матеріали і методи. Дослідження проведені на білих лабораторних щурах-самцях (140-160 г, n = 30). Щурів утримували у стандартних умовах віварію ННЦ "Інститут біології та медицини" КНУ імені Тараса Шевченка. Проведення експерименту здійснювали згідно вимог біоетичної комісії КНУ імені Тараса Шевченка (протокол №8 від 2 листопада 2015 р.). Початком експерименту вважався перший день введення діючої або контрольної речовини. Цефтриаксон (ПрАТ Фармацевтична фірма "Дарниця", Україна) у дозі 300 мг/кг (внутрішньом'язово) вводили щоденно впродовж 14 днів. Тваринам контрольної групи вводили 0,1 мл води для ін'єкцій. Щурів умертвляли на 15-й, 29-й та 72-й день від початку експерименту шляхом інгаляції CO_2 з подальшою цервікальною дислокацією. Під час аутопсії видаляли ділянку товстої кишки від анального отвору до сліпої кишки. Скальпелем обережно зішкрябували слизову оболонку товстої кишки щурів та гомогенізували в фізіологічному розчині на диспергаторі T10 basic ULTRA-TURRAX® (IKA, Німеччина). Загальну концентрацію білків визначали за методом Бредфорда з використанням набору Bio-Rad для аналізу білків (Bio-Rad, США) згідно протоколу виробника.

Каталазну активність в товстій кишці визначали колориметрично за зменшенням H_2O_2, який утворює стійкий забарвлений комплекс з молібдатом амонію [13]. Супероксиддисмутазну активність (СОД) у слизовій оболонці товстої кишки щурів визначали методом нативного електрофорезу в поліакриламідному гелі, який базується на здатності СОД конкурувати з нітросинім тетразолієм (НСТ) за супероксидні аніони, що утворюються в результаті фоторедукції рибофлавіну. Супероксидні аніони відновлюють НСТ з утворенням гідразинтетразолію. Оскільки СОД каталізує дисмутацію супероксидних радикалів в кисень і перекис водню, на синьому фоні гелю з'являються ахроматичні смуги, які репрезентують активність СОД [14]. Рівень ТБК-активних сполук визначали у безбілковій фракції згідно методу Стальної [15]. Рівень загальних і небілкових тіолових груп визначали колориметрично за реакцією з реактивом Елмана. Вміст білкових SH-груп розраховували за різницею між показниками вмісту загальних і небілкових SH-груп [16].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням пакету програм Statistica 7.0. Дані представлені у вигляді M ± SEM. Для оцінки вірогідності різниці середніх значень розраховували t-критерій Стьюдента. Статистично достовірною вважали різницю $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення.

Активні форми кисню та оксиду нітрогену постійно утворюються в шлунково-кишковому тракті. Вміст кишечника, а також патогенні мікроорганізми здатні здійснювати прозапальний вплив на епітелій, активуючи поліморфоядерні лейкоцити і макрофаги, які є джерелом прозапальних цитокінів та інших медіаторів, з подальшим розвитком оксидативного стресу [17]. Наслідком неконтрольованого оксидативного стресу може бути активація процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), маркером інтенсивності якого є накопичення ТБК-активних сполук, що утворюються в результаті перекисного окиснення поліненасичених жирних кислот [18]. Ми виявили що введення цефтриаксону призводить до підвищення вмісту ТБК-активних сполук в слизовій оболонці товстої кишки щурів у 6 разів ($P < 0,05$), порівняно з контролем, на 15 добу експерименту (рис. 1). Очевидно, ці зміни є результатом порушення активності ферментів антиоксидантного захисту. На 29 добу вміст ТБК-активних сполук все ще перевищував контрольні значення в 2,5 раза ($P < 0,05$) і лише на 72 добу знижувався до контрольних показників. Активація процесів ПОЛ може прозводити до порушення проникності клітинних мембран, гальмування окисного фосфорилювання в мітохондріях, пригнічення синтезу ДНК та поділу клітин, що сприяє розвитку хронічного рецидивуючого запалення [19].

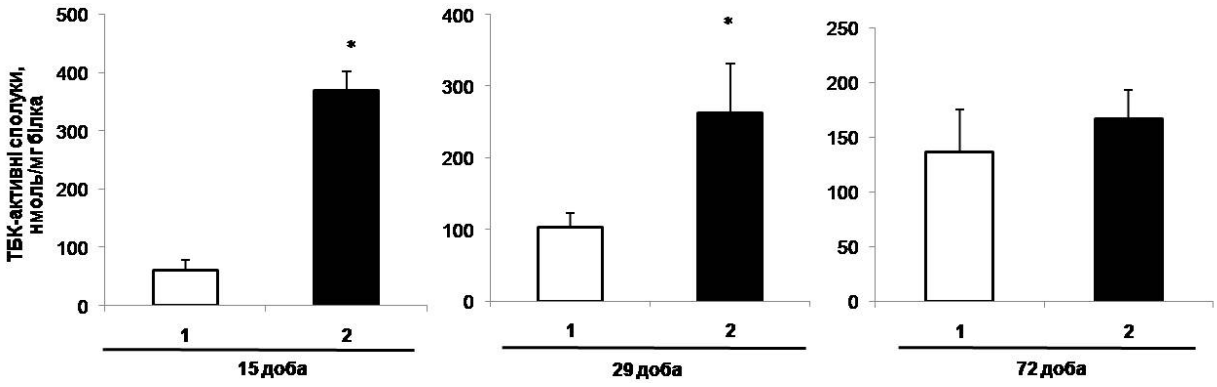


Рис. 1. Вміст ТБК-активних сполук у слизовій оболонці товстої кишки щурів у різні терміни після введення цефтриаксону (300 мг/кг, в. м., 14 днів); M ± SEM; n=30;
1 – контроль, 2 – цефтриаксон; * – P<0,05 відносно показників у контрольній групі

Незважаючи на те, що вільні радикали генеруються конститутивно, організм має здатність захищатись від шкідливих наслідків їх дії за допомогою антиоксидантів, що разом складають систему антиоксидатного захисту. СОД є першою лінією захисту від активних форм кисню в клітині. Введення цефтриаксону впродовж 14 діб призводило до зниження СОД активності в слизовій оболонці товстої кишки щурів на 43,4 % (P = 0,08) порівняно з контрольними значеннями на 15 добу експерименту (рис. 2). СОД активність залишалася зниженою на 48,3 % (P < 0,05) навіть на 72 добу експерименту (через 56 діб після відміни антибіотика). Каталазна активність в слизовій оболонці товстої кишки після введення цефтриаксону знижувалась на 30,5 % (P < 0,05) (15 доба) однак на 29 добу відмічалось збільшення активності на 44,4 % (P < 0,05) порівняно з контролем (рис. 3). На 72 добу тенденція до підвищення каталазної активності у слизовій оболонці товстої кишки зберігалась, проте різниця не була статистично вірогідною. У відповідь на оксидативні порушення, тканини часто спочатку відповідають підвищенням активності ферментів антиоксидантної системи. Проте тривалий оксидативний стрес виснажує ресурси організму, що призводить до зниження активності ферментів антиоксидантного захисту [20].

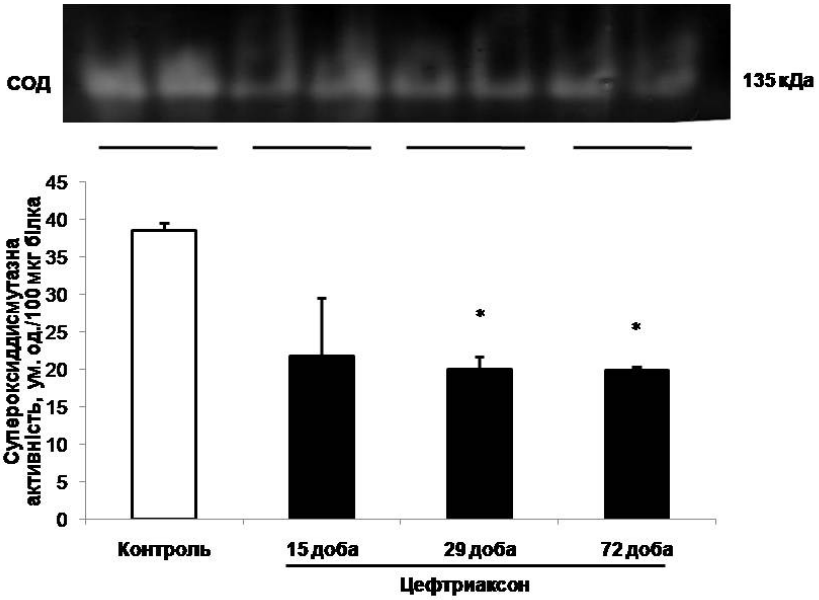


Рис. 2. Супероксиддисмутазна активність у слизовій оболонці товстої кишки щурів у різні терміни після введення цефтриаксону (300 мг/кг, в.м., 14 днів); M ± SEM; n=16;
* – P<0,05 відносно показників у контрольній групі

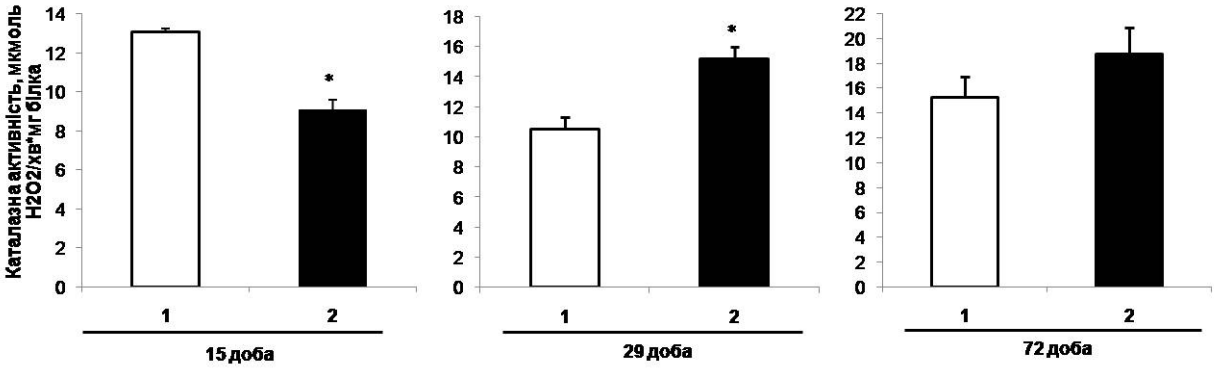


Рис. 3. Каталазна активність у слизовій оболонці товстої кишки щурів у різні терміни після введення цефтриаксону (300 мг/кг, в.м., 14 днів); M ± SEM; n=30;
1 – контроль, 2 – цефтриаксон; * – P < 0,05 відносно показників у контрольній групі

Останнім часом стає все більш очевидним, що окисники, крім цитотоксичності, можуть модулювати численні редокс-чутливі сигнальні шляхи, які залучені до регуляції дегенеративних патофізіологічних станів [20]. Активні форми кисню змінюють активність редокс-чутливих транскрипційних факторів шляхом окиснення SH груп цистеїну білкової молекули [21]. Введення цефтриаксону впродовж 14 діб призводило до зниження вмісту білкових тіолових груп у 1,9 раза (P < 0,05) на 15 добу експерименту (рис. 4). На 29 добу кількість білкових SH груп у слизовій оболонці товстої кишки щурів була в 1,4 раза нижчою від контролю (P = 0,08), проте на 72 добу достовірних змін не спостерігалось. Зниження вмісту білкових тіолових груп після введення антибі-

отика разом із порушенням оксидантно-антиоксидантного балансу може свідчити про зміни окисно-відновного потенціалу в слизовій оболонці товстої кишки, що передбачає активацію редокс-чутливих транскрипційних факторів та сигнальних шляхів. Раніше нами встановлено, що кроткотривале введення цефтриаксону (5 днів) призводить до активації редокс-чутливих транскрипційних факторів Egr-1 та Sp-1 [22].

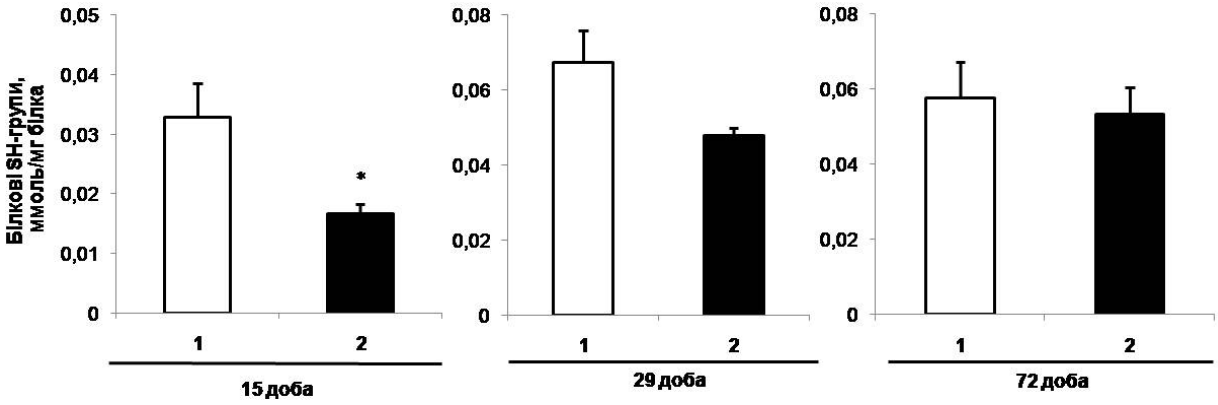


Рис. 4. Вміст білкових тіолових груп у слизовій оболонці товстої кишки щурів у різні терміни після введення цефтриаксону (300 мг/кг, в. м., 14 днів); M ± SEM; n=30;
1 – контроль, 2 – цефтриаксон; * – P<0,05 відносно показників у контрольній групі

Таким чином, отримані результати свідчать про порушення окисно-антиоксидантного балансу клітин слизової оболонки товстої кишки та можуть призводити до незворотного пошкодження клітин, включаючи розриви ДНК, агрегацію або фрагментацію білків, а також дисфункцій клітинних мембран [12]. Наслідком такого впливу є порушення бар'єрної функції, яке, зокрема, може спричинити підвищення проникності слизової оболонки товстої із наступним розвитком запалення [17]. Згідно даних Фоменко І.С. [23], оксидативні реакції (зростання концентрації ТБК-активних сполук та коливання активності ферментів антиоксидантного захисту) створюють передумови для розвитку деструктивних ушкоджень слизової оболонки товстої кишки за умов водно-іммобілізаційного та адреналін-індукованого стресу.

Наші спостереження розширюють розуміння ролі мікробіоти кишечника в підтриманні гомеостазу клітин слизової оболонки та взаємозв'язку тривалого використання антибіотиків і розвитку запалення товстої кишки. Дисбіотичні порушення мікробіоти, обумовлені введенням антибіотика, можуть призводити до порушень енергетичного метаболізму колоноцитів через зниження продукції масляної кислоти [8]. Дефіцит енергії призводить до змін окисно-відновного стану клітин слизової оболонки товстої кишки та зниження інтенсивності окисного фосфорилювання і, як результат, розвитку оксидативного стресу [24], що відповідає змінам, виявленим у мишей-гнотобіонтів [10]. Оксидативний стрес, е свою чергу, може асоціюватись з розвитком запалення в кишечнику [25].

Висновки. Встановлено, що введення цефтриаксону, призводить до порушення окисно-антиоксидатного балансу в слизовій оболонці товстої кишки щурів, яке спостерігається впродовж тривалого часу після відміни антибіотика.

Список використаних джерел

1. *Sommer F.* The gut microbiota – masters of host development and physiology / F. Sommer, F. Backhed // Nature Reviews Microbiology, 2013. – Vol. 11, N 4. – P. 227–238.

2. *Donaldson G. P.* Gut biogeography of the bacterial microbiota / G. P. Donaldson, S. M. Lee, S. K. Mazmanian // Nature Reviews Microbiology, 2016. – Vol. 14, N 1. – P. 20–32.

3. *Gut* microbiota in health and disease: an overview focused on metabolic inflammation / R. Nagpal, M. Kumar, A. K. Yadav et al. // Beneficial Microbes, 2016. – Vol. 7, N 2. – P.181–94.

4. *Kronman M. P.* Antibiotic exposure and IBD development among children: a population-based cohort study / M. P. Kronman, T. E. Zaoutis, K. Haynes // Pediatrics, 2012. – Vol. 130. – P. 794–803.

5. *Administration* of antibiotics to children before age 2 years increases risk for childhood obesity / F. I. Scott, D. B. Horton, R. Mamtani et al. // Gastroenterology, 2016. – Vol. 151, N 1. – P. 120–129.

6. *Long-term* effect of antibiotic therapy on colonic levels of short-chain fatty acids (SCFA), FFA2 and FFA3 receptors / Y. Holota, N. Dzyubenko, A. Ostapchuk et al. // The 15th Int. Conf. of Ulcer Research. – Ottawa, Canada, 2015. – P. 48.

7. *Reproducible* community dynamics of the gastrointestinal microbiota following antibiotic perturbation / D. A. Antonopoulos, S. M. Huse, H. G. Morrison et al. // Infection and Immunity. – 2009. – Vol. 77, N 6. – P. 2367-2375.

8. *Fecal* short-chain fatty acids at different time points after ceftriaxone administration in rats / Y. V. Holota, O. O. Holubenko, A. M. Ostapchuk et al. // Ukrainian Biochemical Journal, 2017. – Vol. 89, № 1. – P. 51-58.

9. *Carbohydrate* composition of rat intestine surface mucus layer after ceftriaxone treatment / Y. V. Holota, Y. A. Olefir, T. V. Dovbynchuk et al. // Ukrainian Biochemical Journal, 2016. – Vol. 88, № 6. – P. 35–44.

10. *The microbiome* and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon / D. R. Donohoe, N. Garge, X. Zhang et al. // Cell Metabolism, 2011. – Vol. 13, N 5. – P. 517–526.

11. *Antioxidant* therapy for treatment of inflammatory bowel disease: Does it work? / F. A. Moura, K. Q. de Andrade, J. C. Santos et al. // Redox Biology, 2015. Vol. 6. – P. 617–639.

12. *Intestinal* oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants / L. Kruidenier, I. Kuiper, C. B. Lamers, H. W. Verspaget // The Journal of Pathology, 2003. Vol. 201, N 1. – P. 28–36.

13. *Метод* определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев // Лабораторное дело, 1988. – № 1. – С. 16–18.

14. *Bertrand R. L.* Modifying polyacrylamide background color for the nitroblue tetrazolium-based superoxide dismutase staining assay / R. L. Bertrand, E. M. Okechukwu // Advances in Enzyme Research, 2014. – Vol. 2, N 2. – P. 77–81.

15. *Стальная И. Д.* Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И. Д.Стальная, Т. Г. Гаришвили // Современные методы в биохимии ; под ред. В. Н. Орехович. – Москва : Медицина, 1977. – С. 66–68.

16. *Ellman G. L.* Tissue sulfhydryl groups / G. L. Ellman // Archives of Biochemistry and Biophysics, 1959. – Vol. 82, N 1. – P. 70–77.

17. *Oxidative* stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases / A. Bhattacharyya, R. Chattopadhyay, S. Mitra, S. E. Crowe // Physiological Reviews, 2014. – Vol. 94, N 2. P. 329–354.

18. *Effects* of dexpanthenol on acetic acid-induced colitis in rats / Y. F. Cagin, H. Parlakpinar, N. Vardi et al. // Experimental and Therapeutic Medicine, 2016. – Vol. 12, N 5. – P.2958–2964.

19. *Role* of oxygen-derived free radicals in gastric mucosal injury induced by ischemia or ischemia-reperfusion in rats / T. Yoshikawa, S. Ueda, Y. Naito et al. // Free radical research communications, 1989. – Vol. 7, N 3–6. – P. 285–291.

20. *Different* profile of peripheral antioxidant enzymes and lipid peroxidation in active and non-active inflammatory bowel disease patients /

D. Achitei, A. Ciobica, G. Balan et al. // Digestive Diseases and Sciences, 2013. – Vol. 58, N 5. – P.1244–1249.

21. *Marinho H. S.* Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors / H. S. Marinho, C. Real, L. Cyrne // Redox Biology, 2014. – Vol. 2. – P. 535–562.

22. *The disturbance* of oxidant-antioxidant balance in rat colonic mucosa after antibiotic therapy / Y. Holota, O. Tjapko, T. Dovbynchuk et al. // Studia Biologica, 2015. – Vol. 9, № 3-4. – P. 49–56.

23. *Фоменко І. С.* Роль процесів ліпопероксидації у формуванні виразкових ушкоджень слизової оболонки товстої кишки щурів при різних моделях стресу / І. С. Фоменко // Вісн. проблем біології та медицини, 2015. – Т. 1(122), № 3. – С. 223–226.

24. *Harty R. F.* Energy, oxidative stress, and inflammation in the colon / R. F. Harty // Digestive Diseases and Sciences, 2013. Vol. 58. – P. 3386–3388.

25. *Khan R.* Farnesol attenuates 1,2-dimethylhydrazine induced oxidative stress, inflammation and apoptotic responses in the colon of Wistar rats / R. Khan, S. Sultana Chem // Chemico-Biological Interactions, 2011. – Vol. 192, N 3. – P. 193–200.

References

1. Sommer F, Backhed F. The gut microbiota – masters of host development and physiology. Nat Rev Microbiol. 2013;11(4):227–238.

2. Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota. Nat Rev Microbiol. 2016;14(1):20-32.

3. Nagpal R, Kumar M, Yadav AK, Hemalatha R, Yadav H, Marotta F, Yamashiro Y. Gut microbiota in health and disease: an overview focused on metabolic inflammation. Benef Microbes. 2016;7(2):181-94.

4. Kronman MP, Zaoutis TE, Haynes K, et al. Antibiotic exposure and IBD development among children: a population-based cohort study. Pediatrics. 2012;130:794–803.

5. Scott FI, Horton DB, Mamtani R, Haynes K, Goldberg DS, Lee DY, Lewis JD. Administration of antibiotics to children before age 2 years increases risk for childhood obesity. Gastroenterology. 2016;151(1):120–129.

6. Holota Y, Dzyubenko N, Ostapchuk A, Dovbynchuk T, Serhiychuk T, et al. Long-term effect of antibiotic therapy on colonic levels of short-chain fatty acids (SCFA), FFA2 and FFA3 receptors. The 15th Int. Conf. of Ulcer Research. Ottawa, Canada. 2015:48.

7. Antonopoulos DA, Huse SM, Morrison HG, Schmidt TM, Sogin ML, Young VB. Reproducible community dynamics of the gastrointestinal microbiota following antibiotic perturbation. Infect Immun. 2009;77(6):2367-2375.

8. Holota Y, Holubenko O, Ostapchuk A, Serhiychuk T, Zakordonets L, Tolstanova G. Fecal short-chain fatty acids at different time points after ceftriaxone administration in rats. Ukr Biochem J. 2017;89(1):51-58.

9. Holota Y, Olefir Y, Dovbynchuk T, Tolstanova G. Carbohydrate composition of rat intestine surface mucus layer after ceftriaxone treatment. Ukr Biochem J. 2016;88(6): 35-44.

10. Donohoe DR, Garge N, Zhang X, Sun W, O'Connell TM, et al. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. Cell Metab. 2011;13(5):517-526.

11. Moura FA, de Andrade KQ2, Santos JC et al. Antioxidant therapy for treatment of inflammatory bowel disease: Does it work? Redox Biol. 2015;6:617-639.

12. Kruidenier L, Kuiper I, Lamers CB, Verspaget HW. Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants. J Pathol. 2003;201(1):28-36.

13. Korolyuk MA, Ivanov LI, Mayorov IG, Tokarev VE. A method of determining the catalase activity. Lab Delo. 1988;(1):16-18.

14. Bertrand RL, Okechukwu EM Modifying polyacrylamide background color for the nitroblue tetrazolium-based superoxide dismutase staining assay. Adv in Enz Res. 2014;2(2):77-81.

15. Stalnaia ID, Haryshvyly TG. Method for determination of malondialdehyde via thiobarbituric acid. In: Orekhovich VN, editor. Modern methods in biochemistry. Moscow: Meditsina; 1977. P. 66–68. Russian.

16. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups. Arch Biochem Biophys. 1959;82(1):70-77.

17. Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, Crowe SE. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. Physiol Rev. 2014;94(2):329-54.

18. Cagin YF, Parlakpinar H, Vardi N, Polat A, Atayan Y, et al. Effects of dexpanthenol on acetic acid-induced colitis in rats. Exp Ther Med. 2016;12(5):2958–2964.

19. Yoshikawa T, Ueda S, Naito Y, Takahashi S, Oyamada H, Morita Y, Yoneta T, Kondo M. Role of oxygen-derived free radicals in gastric mucosal injury induced by ischemia or ischemia-reperfusion in rats. Free Radic Res Commun. 1989;7(3-6):285-91.

20. Achitei D, Ciobica A, Balan G, Gologan E, Stanciu C, Stefanescu G. Different profile of peripheral antioxidant enzymes and lipid peroxidation in active and non-active inflammatory bowel disease patients. Dig Dis Sci. 2013;58(5):1244-1249.

21. Marinho HS, Real C, Cyrne L, Soares H, Antunes F. Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. Redox Biol. 2014;2:535-562.

22. Holota Y, Tjapko O, Dovbynchuk T, Tolstanova G. The disturbance of oxidant-antioxidant balance in rat colonic mucosa after antibiotic therapy. Stud Biol. 2015;9(3–4):49-56.

23. Fomenko I. The role of lipid peroxidation processes in the formation of ulcerogenic lesions of colonic mucosa under conditions of different stress models. Visnyk Probl Biol and Med. 2015;1(122):223-226.

24. Harty R.F. Energy, oxidative stress, and inflammation in the colon. Dig Dis Sci. 2013;58:3386–3388.

25. Khan R, Sultana S. Farnesol attenuates 1,2-dimethylhydrazine induced oxidative stress, inflammation and apoptotic responses in the colon of Wistar rats. Chem Biol Interact. 2011;192(3):193-200.

Надійшла до редколегії 06.02.17

Ю. Голота, асп., А. Базан, студ., А. Толстанова, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ОКИСЛИТЕЛЬНО-АНТИОКСИДАНТНОЕ РАВНОВЕСИЕ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ТОЛСТОЙ КИШКИ КРЫС В РАЗНЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ЦЕФТРИАКСОНА

Установлено, что введение цефтриаксона в течение 14 дней (300 мг/кг, в. м.) приводит к повышению уровня ТБК-активных соединений и снижению активности ферментов антиоксидантной защиты, супероксиддисмутазы и каталазы, в слизистой оболочке толстой кишки крыс сразу после введения антибиотика. На 29 сутки эксперимента (через 14 дней после отмены цефтриаксона) содержание ТБК-активных соединений все еще превышало контрольные значения в 2,5 раза (P < 0,05), а активность супероксиддисмутазы оставалась ниже контрольных значений до 72 суток эксперимента. Эти изменения сопровождались снижением содержания белковых тиоловых групп в 1,9 (P < 0,05) и 1,4 раза (P = 0,08) на 15 и 29 сутки соответственно. Следовательно, антибиотикотерапия может приводить к длительным оксидативным нарушениям в слизистой оболочке толстой кишки крыс.

Ключевые слова: цефтриаксон, толстая кишка, оксидативный стресс.

Y. Holota, Ph. D. stud., A. Bazan, stud., G. Tolstanova, Dr. Sci
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

OXIDATION-ANTIOXIDANT BALANCE IN THE COLON MUCOSA OF RATS AT DIFFERENT TIMES POINTS AFTER CEFTRIAXONE ADMINISTRATION

Ceftriaxone administration for 14 days (300 mg/kg, i.m.) increased level of thiobarbituric acid reactive substances and decreased the activity of superoxide dismutase and catalase antioxidant enzymes in the colon mucosa of rats immediately after antibiotics injection. On the 29th day of the experiment (in 14 days after ceftriaxone withdrawal) the level of TBA-active substances still 2.5-fold (P <0.05) exceeded the control value and SOD activity remained below control values to the 72nd day of the experiment. These were accompanied by decreased level of protein thiol groups in 15 and 29 days 1.9-fold (P <0.05) and 1.4-fold (P = 0.08), respectively. Thus antibiotics can lead to long-term oxidative disturbance in the colon mucosa of rats.

Keywords: ceftriaxone, colon, oxidative stress.

УДК: 612.419+611.018.52+577.151.6

І. Бєлінська, канд. біол. наук,
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

МЕГАКАРІОЦИТОПОЕЗ ЩУРІВ ПІД ВПЛИВОМ ІНГІБІТОРА ПРОТЕЇНКІНАЗ ПОХІДНОГО МАЛЕЇМІДУ З ПРОТИПУХЛИННОЮ АКТИВНІСТЮ

Досліджено вплив інгібітора протеїнкіназ похідного малеіміду MI-1 (1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF_3-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон) з протипухлинною активністю у дозах, які у п'ять і десять разів перевищують ефективну протипухлинну, на морфофункціональний стан мегакаріоцитів кісткового мозку і кількість тромбоцитів у крові щурів за умов підгострого впливу. Встановлено, що під впливом MI-1 у дозі 2,7 мг/кг (умовно ефективна) протягом 14 діб кількість тромбоцитів у крові і мегакаріоцитів, які утворюють тромбоцити, у кістковому мозку не відрізняється від контрольної групи. Збільшення дози MI-1 у п'ять і десять разів (13,5 і 27 мг/кг, відповідно) призводить до зменшення кількості тромбоцитів у крові (p=0.012 і p=0.027, відповідно) без змін кількості мегакаріоцитів у кістковому мозку порівняно з контролем. Аналіз морфофункціонального стану мегакаріоцитів під впливом MI-1 у 10-кратній дозі свідчить про збільшення незрілих промегакаріоцитів, гіпосегментованих і мікромегакаріоцитів на тлі зменшення зрілих поліхроматофільних і оксифільних мегакаріоцитів та гігантських і гіперсегментованих клітин. Виявлені зміни мегакаріоцитопоезу за впливу MI-1 у 10-кратній від ефективної дозі свідчать про затримку диференціювання мегакаріоцитів, що й обумовлює зменшення продукції тромбоцитів і, разом із їх концентруванням у зонах порушення мікроциркуляції у різних тканинах,призводить до тромбоцитопенії у крові.

Ключові слова: похідне малеіміду, інгібітор протеїнкіназ, мегакаріоцити, тромбоцити.

Вступ. Створення нових сполук з протипухлинною активністю і низькою токсичністю залишається пріоритетним напрямком досліджень у біології і медицини. Одним із способів регуляції проліферативної активності пухлинних клітин є пригнічення функціонально активних ферментів-кіназ, які забезпечують їх виживання і неконтрольований поділ, за допомогою так званих цільових (таргетних) препаратів. Прикладом такої успішної регуляції є застосування в клінічній практиці інгібіторів химерної BCR/ABL-кінази іматинібу [1,2], бозутинібу [3] і нілотинібу [4] за хронічної мієлоїдної лейкемії, тирозинкінази Брутона ібрутинібу [5] за хронічної лімфоцитарної лейкемії, Янус(Jak)-кіназ руксолютинібу [6] за мієлопроліферативних захворювань та інших. Перевагами цих препаратів є їх висока ефективність і низька токсичність. Але, висока вартість таких препаратів та розвиток стійкості лейкемічних клітин до них [7, 8] спонукає дослідників до пошуку нових сполук з аналогічною активністю і доступністю для населення України [9, 10].

Похідне малеіміду (MI-1, 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF_3-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон) створено insilico і синтезовано на хімічному факультеті Київського національного університету імені Тараса Шевченка як конкурентний інгібітор АТФ-зв'язувального сайту протеїнкіназ. MI-1 invitro інгібує VEGF-R1,2,3, PDK1, FGF-R1, YES, EGF-R(h), Src (h), ZAP70, Syk (h), тощо кінази (ProQinaseGmbH, Germany) та пригнічує проліферацію ракових клітин ліній: HCT-116 і SW-620 (колоректального раку), MALME-3M й UACC (меланоми), A549/ATCC та NCI-H226 (недрібноклітинного раку легень) тощо [11]. У дослідженнях invivo доведено, що MI-1 зменшує кількість пухлин та площу ураження товстої кишки за умов 1,2-диметилгідразин(ДМГ)-індукованого колоректального раку, що свідчить про його протипухлинну активність [12-14] і нормалізує за цих умов кількість моноцитів та тромбоцитів у крові, а також запобігає розвитку анемії [15]. Крім того, цій сполуці в ефективній дозі притаманні антиоксидантні властивості [16, 17], відсутність гематотоксичності [18], і низька токсичність щодо органів шлунково-кишкового тракту і печінки [12], нирок і підшлункової залози [19, 20].

Оскільки зазначені протеїнкінази беруть участь у передачі сигналу в клітину у відповідь на дію факторів росту, які ініціюють проліферацію і диференціювання гемопоетичних клітин [21-23], а хронічний вплив MI-1 у дозах, в яких пригнічує ріст пухлин, не викликає змін гемопоезу, як видно із результатів наших попередніх досліджень[18], метою даної роботи було проаналізувати ефекти MI-1 на кількість тромбоцитів у крові і морфофункціональний стан мегакаріоцитів у кістковому мозку у дозах, які перевищують ефективну протипухлинну у п'ять та десять разів.

Матеріали та методи.Досліди проведено на29 білих щурах-самцях (лінія Вістар розводки віварію Київського національного університету імені Тараса Шевченка) з початковою масою 140–160 г, яких утримували в стандартних умовах віварію. Дослідження проведені відповідно до принципів біоетики, законодавчих норм та вимог, згідно з положеннями "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей" (Страсбург,1986) і "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах", ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Досліджували кількість тромбоцитів у крові щурів і мегакаріоцитів у кістковому мозку після впливу протягом 14 діб MI-1 у ефективній, п'ятикратній та десятикратній дозах(2,7; 13,5 і 27 мг/кг). MI-1 розчиняли у 0,1 мл соняшникової олії, яка містила 15 % ДМСОі вводили per os щоденно протягом 14 діб у дозах:

– 2,7 мг/кг (умовно ефективна, відповідає концентрації у крові $\sim 1\times10^{-4}$ моль/л за умов повного всмоктування) (n=5);

– 13,5 мг/кг (п'ятикратна від ефективної, $\sim 5\times10^{-4}$ моль/л у крові) (n=8);

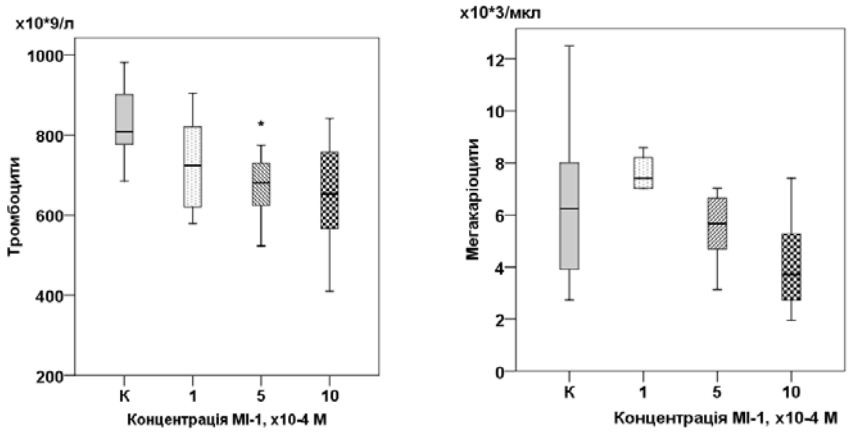
– 27 мг/кг (десятикратна від ефективної, $\sim 10\times10^{-4}$ моль/л у крові) (n=8). MI-1 у дозі 2,7 мг/кг invivo пригнічує ріст пухлин товстої кишки на 40 %, так само які і 5-фторурацил [12, 13, 24]. Щурам контрольної групи (n=8) вводили per os 0,1 мл соняшникової олії, яка містила 15 % ДМСО.

Кров для аналізу у щурів після CO_2-інгаляційної евтаназії забирали з пахової вени через 24 години після останнього введення досліджуваних речовин. Кількість тромбоцитів у крові і мегакаріоцитів у кістковому мозку визначали загальноприйнятими методами [25]. Для одержання кісткового мозку у щурів виділяли стегнові кістки і відсікали епіфізи, з однієї – вимивали вміст діафізів 3 % оцтовою кислотою та підраховували кількість мегакаріоцитів у камері Горяєва, з іншої –виготовляли мазки, забарвлювали за Паппенгеймом і аналізували 100 мегакаріоцитів. Клітини поділяли – за ступенем зрілості на: промегакаріоцити, базофільні, поліхроматофільні, оксифільні мегакариоцити (за спорідненістю до кислих та основних барвників), вільні ядра мегекаріоцитів; за особливостями будови: мікромегакаріоцити (клітини не більше 40 мкм), гіпосегментовані мегакаріоцити з 1-5-сегментами ядра, гіперсегментовані мегакаріоцити (16 і більше сегментами ядра) [26].

© Бєлінська І., 2017

Статистичну обробку результатів виконували за допомогою SPSS 16,0 для Windows. За результатами тесту Шапіро-Уілка встановлено, що деякі досліджувані показники мають ненормальний розподіл в одній із груп порівняння, тому для оцінки різниці між їх значеннями використовували непараметричний критерій Манна-Уітні [27]. Обчислювали медіану, 25$^{-й}$ і 75$^{-й}$ процентилі, найбільше і найменше значення у групах. Порівнювали показники груп з контролем (3 попарних порівняння). Різницю вважали вірогідною при P<0,017.

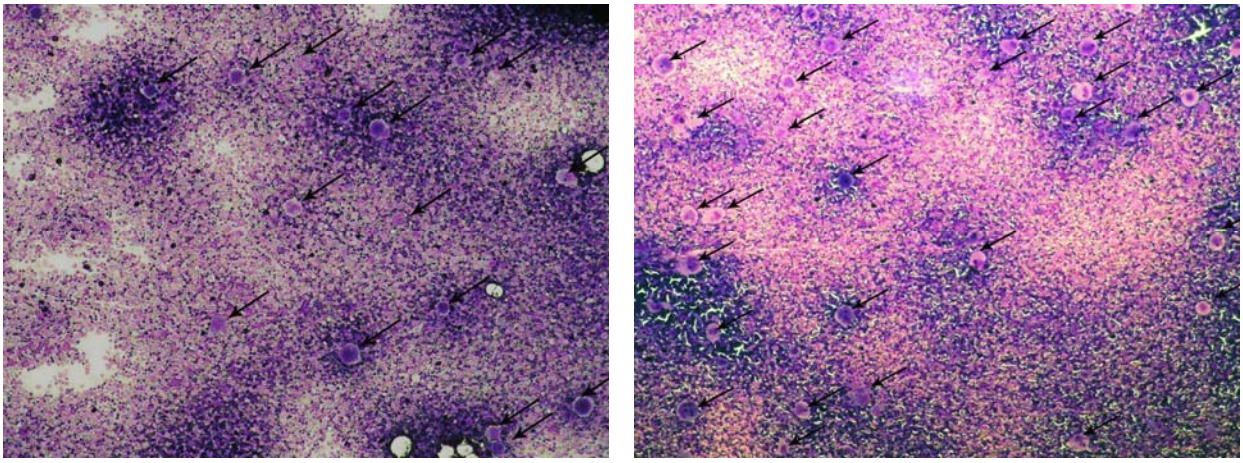
Результати та їх обговорення. Введення МІ-1 у дозі 2,7 мг/кг (умовно ефективна, концентрація у крові ~1×10^{-4} моль/л) протягом 14 діб не впливає на кількість тромбоцитів у крові (рис. 1 А) і мегакаріоцитів, які утворюють тромбоцити, у кістковому мозку (рис. 1 Б).



А Б

Рис. 1. Кількість тромбоцитіву крові(А)і мегакаріоцитів у кістковому мозку(Б) щурів у нормі та за умов впливу похідного малеіміду (МІ-1) у дозах 2,7, 13,5 і 27 мг/кг (концентрація у крові ~1×, 5×, 10×10^{-4} М відповідно) протягом 14 діб; *p< 0,017 порівняно з контрольною групою

Збільшення дози МІ-1 у п'ять і десять разів (13,5 і 27 мг/кг відповідно)призводить до зменшення кількості тромбоцитів у крові (p=0.012; p=0.027 відповідно) у порівнянні з контрольною групою (рис. 1 А), водночас кількість мегакаріоцитів у кістковому мозку не відрізняється від контрольних значень (p=0,752, p=0,102 відповідно; рис. 1 Б, рис. 2 Б).



А Б

Рис. 2. Мікрофотографії мазків кісткового мозку щурів у нормі (А) та після впливу похідного малеіміду МІ-1 (Б) у дозі 27 мг/кг (10-кратна від ефективної, концентрація ~10×10^{-4} М у крові), забарвлення за Паппенгеймом; ×100; стрілками позначені мегакаріоцити

Аналіз морфофункціонального стану мегакаріоцитів (проведений після впливу 10-ти кратної дози, оскільки напрямок змін за 5-ти кратноїоднонаправлений) свідчить про перерозподіл клітин за ступенем диференціювання та кількістю сегментів у ядрі (рис. 3, 4). Після впливу похідного малеіміду у дозі 27 мг/кг (10-кратна від ефективної) збільшується вміст незрілих промегакаріоцитів на рівні тенденції (p=0,035, рис. 3) на тлі зменшення сумарного вмісту зрілих поліхроматофільних і оксифільних клітин (p=0,031). Водночас зростає кількість гіпосегентованих мегакаріоцитів (із 1-5 сегментами ядра, рис. 4 А, p=0,014) не тільки за рахунок незрілих промегакаріоцитів, а і за рухунок зрілих поліхроматофільних клітин при зменшенні кількості клітин з 11 сегментами ядра (p=0,012) і більше (гіперсегментованих, p=0,002). У контрольній групі переважають клітини із великою кількістю сегементів у ядрі (6 і більше) на всіх стадіях диференціювання, починаючи з промегакаріоцитів, базофільних, поліхроматофільних і оксифільних мегакаріоцитів.

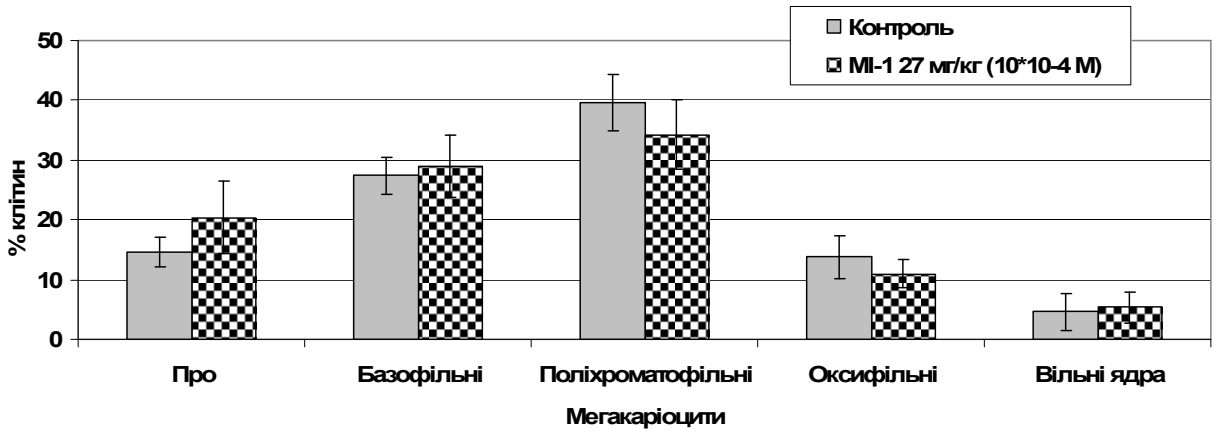


Рис. 3. Розподіл мегакаріоцитів кісткового мозку щурів за ступенем диференціювання (M±SD) після впливу МІ-1 у дозі 27 мг/кг (10-кратна від ефективної, концентрація ~10×10^{-4} М у крові) у порівнянні з контрольною групою

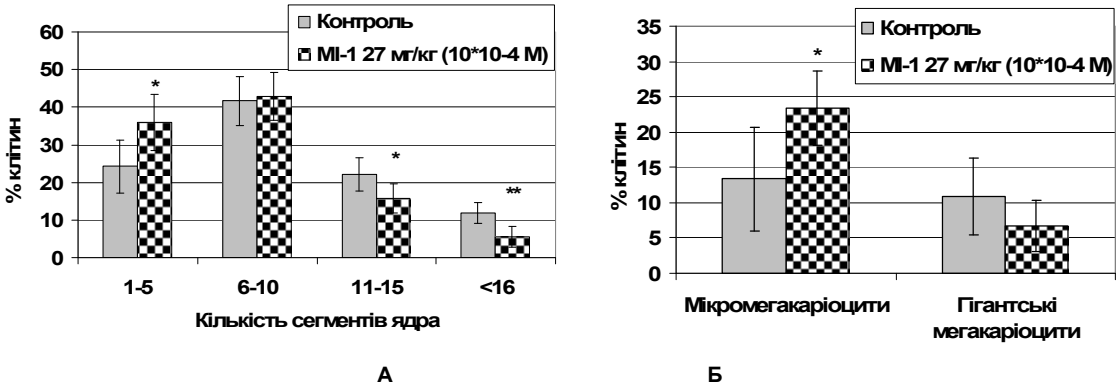


Рис. 4. Розподіл мегакаріоцитів кісткового мозку щурів (M±SD) за кількістю сегментів ядра (А) та розмірами клітин (Б, мікромегакаріоцити 40 мкм і менше, гігантські мегакаріоцити 120 мкм і більше) після впливу МІ-1 у дозі 27 мг/кг (10-кратна від ефективної, концентрація ~10×10^{-4} М у крові) у порівнянні з контрольною групою, *p< 0,017, **p< 0,003

За умов впливу МІ-1 у найвищій дослідженій дозі зростає частка базофільних і поліхроматофільних мегакаріоцитів невеликих розмірів (40 мкм і менше, названі мікромегакаріоцитамир=0,015) при зменшенні частки гігантських мегакаріоцитів на рівні тенденції (120 мкм і більше, рис. 4 Б, p=0,043). Зростання кількості незрілих мегакаріоцитів із одночасним збільшенням кількості гіпосегментованих і мікромегакаріоцитів після впливу МІ-1 у десятикратній дозі свідчить про затримку диференціювання вказаних клітин, що може обумовлювати зменшення продукції тромбоцитів. Наприклад відомо, що збільшення кількості тромбоцитів у крові супроводжується збільшенням кількості гігантських гіперсегментованих мегакаріоцитів у кістковому мозку [28-30]. Тромбоцитоз у крові також пов'язаний із надмірною продукцією тромбоцитів внаслідок порушення проліферації і диференціювання мегакаріоцитів за неопластичного переродження гемопоетичних клітин, наприклад, за остеомієлофіброзу та хронічної мієлоїдної лейкемії [26, 31, 32]. МІ-1 інгібує VEGF-R1,2,3, PDK1, YES, Src (h) та інші кінази [9-11], які залучені до проліферації і диференціювання мегакаріоцитів.Показано, що стимулювання VEGF-R1 призводить до диференціювання мегакаріоцитарних попередників, переміщення їх до синусоїдів кісткового мозку і, як наслідок, до збільшення кількості тромбоцитів у крові [33]. На відміну від цього, стимулювання VEGF-R2 активує проліферацію і виживання мегакаріобластів, кількість тромбоцитів при цьому не змінюється. VEGF-R3 виконує регуляторну роль у мегакаріоцитопоезі, відновлюючи популяцію цих клітин після гострого пригнічення гемопоезу (сублетальне опромінення, вплив високих доз 5-фторурацилу та ін.) та збільшуючи кількість тромбоцитів у відповідь на дію тромбопоетину [34].Зміна морфофункціонального стану мегакариоцитів за впливу МІ-1 також може бути опосередкована пригніченням активності PDK1-кінази, яка активується PI3-кіназою за впливу тромбопоетину [35, 36]. Так, дефіцит PDK1-кінази у мишей призводить до тромбоцитопенії і зменшення функціональної активності тромбоцитів (зменшення агрегації, ретракції згустку та ін.) [37].Тому виявлене нами збільшення вмісту гіпосегментованих мегакаріоцитів та мікромегакаріоцитів одночасно із зростанням незрілих промегакаріоцитів на тлі зменшення зрілих поліхроматофільних і оксифільних мегакаріоцитів за впливу МІ-1 свідчить про затримку диференціювання цих клітин. Такі зміни і призводять до зменшення продукції тромбоцитів, і як наслідок, до тромбоцитопенії у крові. Разом із тим, зменшення кількості тромбоцитів у крові після впливу МІ-1 може бути пов'язаним також із їх концентруванням у зонах пошкодження, оскільки спостерігаються порушення мікроциркуляції у різних тканинах після впливу даної сполуки у вказаних дозах [38-40].

Список використаних джерел

1. *High-dose* imatinib induction followed by standard-dose maintenance in pre-treated chronic phase chronic myeloid leukemia patients–final analysis of a randomized, multicenter, phase III trial. / A. L. Petzer, D. Fong, T. Lion et al. // Haematologica, 2012. – Vol. 97, N 10. – P.1562–1569.
2. *Functional* activity of CD34-positive cells in chronic myeloid leukemia patients with different response to imatinib therapy / I. O. Sviezhentseva, T. P. Perekhrestenko, D. I. Bilko et al. // Experimental Oncology, 2015. – Vol. 37, N 1. – P. 70–72.
3. *Bosutinib* versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: Results from the BELA trial / J. E. Cortes, D.-W. Kim, H. M. Kantarjian et al. // J. of Clinical Oncology, 2012. – Vol. 30, N 28. – P. 3486–3492.
4. *Nilotinib* vs imatinib in patients with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia in chronic phase: ENESTnd 3-year follow-up / R. Larson, A. Hochhaus, T. P. Hughes et al. // Leukemia, 2012. – Vol. 26, N 10. – P. 2197–203.
5. *Ibrutinib*, idelalisib and obinutuzumab for the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia: three new arrows aiming at the target / F. Morabito, M. Gentile, J. F. Seymour et al. // Leukemia Lymphoma, 2015. – Vol. 56, N 12. P. 3250–3256.
6. *Ruxolitinib* versus standard therapy for the treatment of polycythemia vera / A. M. Vannucchi, J. J. Kiladjian, M. Griesshammer et al. // N. Engl J. Med., 2015. – Vol. 372, N 5. – P. 426–435.
7. *Mechanisms* of resistance in patients with chronic myeloid leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors / T. Perekhrestenko, M. Diachenko, I. Sviezhentseva et al. // Georgian Med News, 2015. – Vol. 240. – P. 43–50.
8. *Bixby D.* Mechanisms of resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia and recent therapeutic strategies to overcome resistance / D. Bixby, M. Talpaz // Hematology. American Society of Hematology. Education Program, 2009. – P. 461–476.
9. *In Silico* Design of Protein Kinase Inhibitors: Successes and Failures / G. G. Dubinina, O. O. Chupryna, M. O. Platonov et al. // Anticancer Agents Med Chem., 2007. – Vol. 7(2). – P. 171–88.
10. *Dubinina G. G.* Compound of 1,4-disubstituted 5-amino-1,2-dihydropyrrole-3-one having anticancer activity / G. G. Dubinina, Yu. M. Volovenko. – Pat. 22204 (UA). 21.02.2006. Appl. U200601855. 25.04.2007.
11. *Antiproliferative* activity of the new derivatives of 1-(4-R-benzyl)-3-R1-4-(R2-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione / G.G. Dubinina, S. M. Golovach, V. O. Kozlovsky et al. // J. Organ ta Farm Khimii (Ukraine), 2007. – Vol. 5, N 1. – P. 39–49.
12. *Garmanchuk L. V.* MI-1 – derivative of maleimide inhibits cell cycle progression in tuomor cells of epithelial origin / L. V. Garmanchuk, E.O. Denis, V.V. Nikulina et al. // Biopolymers and Cell, 2013. – Vol. 29, N 1. – P. 70–74.
13. *Lynchak O.V.* The influence of the maleimide derivative on the condidtion of the normal rat liver and bowel and with chemical-induced carcinogenesis of the colon. Synopsis Dissertat. For Scientif. Degree of Candidate the Biol Scienc. Kyiv, 2010:1–20.
14. *Potential* cytostatic effect of the Maleimide derivative 1-(4-Cl-benzyl)-3-Cl-4-(CF3-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione / L.V. Garmanchuk, O.V. Linchak, V.V. Niculina et al. // Eksperimental'naya i Klinicheskaya Farmakologiya. –2013. – Vol. 76, N 8. – P. 39–42.
15. *Byelinska I. V.* Hematological effects of the protein kinases inhibitor maleimide derivative of dimethylhydrazine-induced colorectal carcinogenesis of rats / I.V. Byelinska, O. V. Lynchak, T. V. Rybalchenko et al. // Fiziolohichnyĭ zhurnal (Ukrain), 2014. – Vol. 60, N 4. – P. 40–49.
16. *Effect* of maleimide derivative on oxidative stress and glutathione antioxidant system in 1,2–dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis in rat / O. Filinska, S. Yablonska, S. Mandryk et al. // Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska. Sectio DDD: Pharmacia, 2010. – Vol. 23, N 2. – P. 189–192.
17. *State* of the liver antioxidant system and content of matrix metalloproteinase-2 of large intestine under the effect of maleimide derivative in experimental colon carcinogenesis in rats / O. M. Filinska, S. V. Yablonska, S. Y. Mandryk et al. // Ukrain'skyi biokhimicheskiy zhurnal, 2010. – Vol. 82, N 4. – P. 69–77.
18. *Morphofunctional* state of blood cells after chronic exposure of the protein kinase inhibitor maleimide derivative / I.V. Byelinska, O.V. Lynchak, S.M. Tsyvinska et al. // Fiziolohichnyĭ zhurnal (Ukraine), 2015. – Vol. 61, N 4. – P. 71–77.
19. *Effect* of maleimide derivative on the morpho-functional state of the kidney in experimental colon carcinogenesis in rats / I. V. Kharchuk, O.M. Filins'ka, S.V. Yablons'ka et al. // Fiziolohichnyĭ zhurnal (Ukraine), 2010. – Vol. 56, N 6. – P. 62–69.
20. *The structure* functional status of rat kidney and pancreas after the long-term influence of novel targeted-action compound – maleimide derivative / I. V. Kharchuk, O. M. Filinska, S. V. Yablonska et al. // Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2010. – N 7. – P. 150–154.
21. *Regulation* of Hematopoietic Stem Cells by the Steel Factor/KIT Signaling Pathway / D. Kent, M. Copley, C. Benz et al. // Clinical Cancer Research, 2008. – Vol. 14, N 7. – P. 1926–1930.
22. *JAKs*, STATs and Src kinases in hematopoiesis / S.G. Rane, E.P. Reddy et al. // Oncogene, 2002. – N 21. – P. 3334–3358.
23. *Theroleof* PKC and PDK1 in monocyte lineage specification by Ras / L. Pearn, J. Fisher, A.K. Burnett, R.L. Darley // Blood., 2007. – Vol. 109, N 10. – P. 4461–4469.
24. *Comparative* Analysis of the Antineoplastic Activity of C60 Fullerene with 5-Fluorouracil and Pyrrole Derivative In Vivo / O.V. Lynchak, Yu.I. Prylutskyy, V.K. Rybalchenko et al. // Nanoscale Research Lett., 2017. – Vol. 12, N 1. – P. 1-8.
25. *Alekseev V.V.* Medical laboratory technology. Manual of Clinical Laboratory Diagnostics / V.V. Alekseev, A.I. Karpishchenko – Moscow : GEOTAR-Media, 2012.
26. *Byelinska I.V.* Megakaryocytes morphology in indiopathic (primary) myelofibrosis / I.V. Byelinska, I.N. Kabachenko, I.S. Dyagil // Reports of Practical Oncology and Radiotherapy, 2004. – Vol. 9, N 6. – P. 223–228.
27. *Grzhibovskiy A. M.* Analysis of three or more independent groups of quantitative data / A.M. Grzhibovskiy // Ecology of human (rus.), 2008. – N 3. – P. 50–58.
28. *Different* ploidy levels of megakaryocytes generated from peripheral or cord blood CD34+ cells are correlated with different levels of platelet release / G. Mattia, F. Vulcano, L. Milazzo et al. // Blood., 2002. – Vol. 99. – P. 888–897.
29. *Deutsch V.R.* Megakaryocyte development and platelet production / V.R. Deutsch, A. Tomer // British Journal of Haematology, 2006. – Vol. 134, N 5. – P. 453–466.
30. *Understanding* platelet generation from megakaryocytes: implications for in vitro–derived platelets / X. Sim, M. Poncz, P. Gadue et al. // Blood., 2016. – Vol.127, N 10. – P. 1227–1233.
31. *Abnormal* megakaryocyte development and platelet function in Nbeal22/2 mice / H.A. Kahr Walter, R.W. Lo, L. Li et al. // Blood., 2013. – Vol. 122, N 19. – P. 3349–3358.
32. *Developmental* changes in human megakaryopoiesis / O. Bluteau, T. Langlois, P. Rivera-Munoz et al. // Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2013. – Vol. 11, N 9. – P. 1730–1741.
33. *Pitchford S.C.* VEGFR1 timulates a CXCR4–dependent translocation of megakaryocytes to the vascular niche, enhancing platelets production in mice / S.C. Pitchford, T. Lodie, S.M. Rankin // Blood., 2012. – Vol. 120, N 14. – P. 2787–2795.
34. *VEGFR*–3 is expressed on megakaryocyte precursors in the murine bone marrow and plays a regulatory role in megakaryopoiesis / W. Thiele, J. Krishnan, M. Rothley et al. // Blood., 2012. – Vol. 120, N 9. – P. 1899–1907.
35. *Thrombopoietin* (TPO) induces c-myc expression through a PI3K- and MAPK-dependent pathway that is not mediated by Akt, PKC$_\zeta$ or mTOR in TPO-dependent cell lines and primary megakaryocytes / S Chanprasert, A.E. Geddis, C. Barroga et al. // Cellular Signalling, 2006. – Vol. 18, N 8. – P. 1212–1218.
36. *PI3K*/*Akt*/*FOXO3a* pathway contributes to thrombopoietin-induced proliferation of primary megakaryocytes in vitro and in vivo via modulation of p27Kip1 / T. Nakao, A.E. Geddis, N.E. Fox et al. // Cell Cycle, 2008. – Vol. 7, N 2. – P. 257–266.
37. *PDK1* regulates platelet activation and arterial thrombosis / X. Chen, Y. Zhang, Y. Wang et al. // Blood., 2013. – Vol. 121, N 18. – P. 3718–3726.
38. *Yena M.S.* Comparative Influence of Cytostatics Maleimide Derivative and 5-Fluoruracil on Rat Caecum Mucosa / M.S. Yena, H.M. Kuznietsova, V.K. Rybalchenko // Bulletin of Problems Biology and Medicine, 2014. – Vol. 4, N 3. – P. 133–137.
39. *Effect* of different doses of protein kinase inhibitor maleimide derivative on state of rat caecum mucosa] / M.S. Yena, H.M. Kuznietsova, O.V. Lynchak et al. // Problems of Ecologycal and Medical Genetics and Klinical Immunology, 2013. – Vol. 6, N 120. – P. 21–27.
40. *Effect* of dihydropyrrol and maleimide derivatives on the state of the liver and colon in normal rats and those with colorectal carcinogenesis induced by dimethylhydrazine / H.M. Kuznietsova, O.V. Lynchak, M.O. Danylov et al. // Ukrainskiĭ biokhimicheskiĭ zhurnal, 2013. – Vol. 85, N3. – P. 62-67.

Надійшла до редколегії 02.03.17

И. Белинская, канд. биол. наук,
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

МЕГАКАРИОЦИТОПОЭЗ КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ИНГИБИТОРА ПРОТЕИНКИНАЗ ПРОИЗВОДНОГО МАЛЕИМИДА С ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Исследовано влияние ингибитора протеинкиназ производного малеимида MI-1 (1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF$_3$-фениламино)-1H-пиррол-2,5-дион) с противоопухолевой активностью на морфофункциональное состояние мегакариоцитов костного мозга и количество тромбоцитов в крови при подостром воздействии в дозах, которые в пять и десять раз превышают эффективную противоопухолевую. Установлено, что при воздействии MI-1 в эффективной дозе 2,7 мг/кг в течение 14 суток количество тромбоцитов в крови и мегакариоцитов, которые образуют тромбоциты, в костном мозге не отличается от значений контрольной группы. Увеличение дозы MI-1 в пять и

десять раз (13,5 и 27 мг/кг соответственно) приводит к уменьшению количества тромбоцитов в крови (p=0.012; p=0.027 соответственно) без изменений количества мегакариоцитов в костном мозге в сравнении с контролем. Анализ морфофункционального состояния мегакариоцитов при воздействии MI-1 в 10-кратной дозе свидетельствует об увеличении незрелых промегакариоцитов, гипосегментированных и микромегакариоцитов на фоне уменьшения зрелых полихроматофильных и оксифильных мегакариоцитов, а также гигантских и гиперсегментированных клеток. Выявленные изменения мегакариоцитопоэза при воздействии MI-1 в 10-кратной от эффективной дозе свидетельствуют о задержке дифференцировки мегакариоцитов, что и приводит к уменьшению продукции тромбоцитов и, вместе с их концентрированием в зонах нарушения микроциркуляции в различных тканях, тромбоцитопении в крови.

Ключевые слова: производное малеимида, ингибитор протеинкиназ, мегакариоциты, тромбоциты.

I. Byelinska, Ph. D.,
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

EFFECT OF MALEIMIDE DERIVATIVE PROTEIN KINASES INHIBITOR WITH ANTITUMOR ACTIVITY ON MEGAKARYOCYTOPOIESIS OF RATS

The effect of the inhibitor protein kinases maleimidederivative MI-1 (1-(4-Cl-benzyl)-3-Cl-4-(CF_3-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione) with antitumor activity at doses at five times (13.5 mg/kg) and ten times (27 mg/kg) the effective dose for subacute exposure onmorphofunctional state of bone marrow megakaryocytes and platelet count in the blood of rats have been studied. MI-1 at the dose of 2.7 mg/kg (effective antitumor – decreases the number of colon tumors and the affected area of the colon of rats) during 14 days does not changethe count of plateletsin the blood and megakaryocytes, which form platelets, in the bone marrow comparedto the untreated control group. Increasing the dose of MI-1 to 5- and 10-times (13.5 and 27 mg / kg, respectively) leads to a decrease in the number of platelets in the blood (p=0.012; p=0.027, respectively) without changes in the number of megakaryocytes in the bone marrow compared to the untreated control. Analysis of the morphofunctional state of megakaryocytes at the10-fold increased dose of MI-1 indicatesan increase in immature promegakaryocytes, hyposegmented and micromegakaryocytes to reduce background mature polichromatophilicand oxyphilicmegakaryocytes and hypersegmented and giant cells. Megakaryocytopoiesis revealed changes under the influence of MI-1 in 10-times the effective dose testify delay differentiation of megakaryocytes, which causes a decrease platelet production and, including their concentration in the altered areas of microcirculation in various tissues, leading to thrombocytopenia in the blood of rats.

Key words: maleimide derivative, protein kinases inhibitor, megakaryocytes, platelets.

УДК 577.21:612.34:616.33-008.821.14

А. Драницина, канд. біол. наук, К. Дворщенко, д-р. біол. наук,
Д. Гребінник, канд. біол. наук, Л. Остапченко, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ЕКСПРЕСІЯ ГЕНА *AQP8* В ЕПІТЕЛІОЦИТАХ ДВАНАДЦЯТИПАЛОЇ КИШКИ ЩУРІВ ПРИ ДІАРЕЇ ЗА УМОВ ТРИВАЛОЇ ШЛУНКОВОЇ ГІПОХЛОРГІДРІЇ

Показано зниження рівня експресії гена Aqp8 в епітеліоцитах ворсинок і крипт дванадцятипалої кишки на тлі інтенсифікації процесів утворення вільних радикалів при діареї за гіпоацидних умов. При введенні мультипробіотика Симбітер за тих самих умов рівень експресії проаналізованого гена в епітеліоцитах ворсинок і крипт наближався до контрольних значень.

Ключові слова: шлункова гіпохлоргідрія, дванадцятипала кишка, діарея, експресія гена, Aqp8, мультипробіотик.

Вступ. Гіпоацидність шлункового соку має багатофакторну етіологію: вона супроводжує ряд захворювань (атрофічний гастрит, рак шлунка, аутоімуні порушення) і є результатом прийому фармакологічних препаратів – інгібіторів протонної помпи парієтальних клітин шлунка, поширеними представниками яких є омепразол, пантопразол тощо [1, 2]. Будучи достатньо безпечними, вони, тим не менш, здатні призводити до підвищення рівня гастрину в крові – гіпергастринемії [3]. Крім цього, розвиток дисбіозу – один із ключових наслідків тривалої гіпоацидності, при якому спостерігається колонізація шлунково-кишкового тракту (ШКТ) умовно-патогенною мікрофлорою, яка викликає тривалу ендогенну інтоксикацію, діарею і є додатковим чинником, який, окрім гіпергастринемії, сприяє шлунковому канцерогенезу, а також виникненню спорадичних пухлин в інших ділянках ШКТ, зокрема у дванадцятипалій кишці (ДПК) [4, 5].

Накопичення прозапальних молекул із джерела ендогенного запалення і вплив клітинних та секреторних компонентів дисбіотичної мікрофлори можуть призводити до розвитку запального процесу, наслідком чого є як потужна генерація активних форм кисню (АФК), так і ініціація окисного стресу (ОС) [6-7].

Поглинання води є однією з ключових функцій кишечника. Регулювання трансепітеліального транспорту рідини в ШКТ залежить від активності й кількості переносників, таких як: водні канали (пори) – аквапорини (AQPs, принаймні – 11 ізоформ), електрогенний трансмембранний регуляторний білок CFTR, електронейтральний натрій–водневий транспортер 3 (NHE3), електрогенний натрієвий канал – ENaC тощо [8-12].

Аквапорини складають сімейство невеликих інтегральних мембранних білків великої родини основних внутрішніх білків (MIP), що селективно проникні для води і діють за осмотичними градієнтами [11, 13]. Аквапорин 8, який кодується геном *Aqp8*, знаходиться в епітеліальних клітинах тонкої та товстої кишок, а також в апікальній мембрані колоноподібних поглинаючих епітеліоцитів ворсинок і крипт ДПК щурів [14-16].

Показано залучення AQPs, зокрема зміну експресії *Aqp8* у клітинах кишечника при захворюваннях, що супроводжуються порушеннями в транспорті води: при нецукровому діабеті, виразковому коліті, запальній хворобі кишечника (IBD), хворобі Крона, діареї, зумовленій харчовою алергією, карценогенезі тощо, як у людини, так і в тварин [11, 13, 16].

Для корекції структурно-функціональних порушень у ШКТ використовують пробіотичні препарати, які виконують важливу роль у підтриманні загального гомеостазу організму за рахунок оптимізації його мікроекологічного статусу [17, 18]. Препарати групи "Симбітер® ацидофільний" концентрований (далі Симбітер) є максимально наближеною до природних мікробіоценозів організму людини та тварин концентрованою біомасою живих клітин мультикомпонентного симбіозу пробіотичних бактерій (*Bifidobacterium bifidum, B. longum, Lactobacillus acidophilus, L. delbrueckii, L. helveticus, Propionibacterium freudenreichii, P. acidipropionici, Lactococcus lactis, Acetobacter aceti, Streptococcus salivarius*) [17, 18].

На сьогодні мало що відомо про можливу роль аномалій у транспорті електролітів та води в патогенезі діареї, пов'язаної з дисбіотичними змінами внаслідок дії

© Драницина А., Дворщенко К., Гребінник Д., Остапченко Л., 2017

тривалої гіпохлоргідрії. Тому метою роботи було проаналізувати експресію гена *Aqp8* в епітеліоцитах ДПК щурів за довготривалого пригнічення кислотоутворення в шлунку та при введенні мультипробіотичного препарату.

Об'єкт та методи досліджень. У дослідженні використовували білих нелінійних статевозрілих щурів-самців з масою 180-200 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. У роботі дотримувалися міжнародних рекомендацій для проведення медико-біологічних досліджень із використанням тварин відповідно до "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для наукових експериментів або в інших наукових цілях".

Тварин розділяли на чотири групи. У контрольній (першій) групі використовували щурів, яким протягом 28 діб вводили інтраперитонеально 0,2 мл та перорально 0,5 мл води для ін'єкцій. Тварини другої групи протягом 28 діб перорально отримували Симбітер (виробництва ТОВ "О.Д. Пролісок") у дозі 0,14 мл/кг, розчинений у 0,5 мл води для ін'єкцій. Моделювання гіпоацидного стану (третя група) проводили за допомогою внутрішньочеревного введення 14 мг/кг омепразолу 1 раз на добу протягом 28 діб [19]. Четверта група щурів одночасно з інтраперитонеальним введенням омепразолу перорально отримувала Симбітер у вищезазначеній дозі. Кількість тварин у кожній експериментальній групі – 8-10.

Вміст нітрит-іонів визначали методом Грісса з модифікаціями за [20]. Вміст загального білка визначали за методом Лоурі [21]. Епітеліоцити ворсинок та крипт із ДПК ізолювали за допомогою низькотемпературного методу [22].

РНК отримували за методом Chomczynski [23]; Синтез кДНК та кількісну полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі (Real-time PCR, кПЛР) за допомогою комерційного набору "Thermo Scientific Verso SYBR Green 1-Step qRT-PCR ROX Mix" ("Thermo Scientific", Литва), використовуючи по 0,4 мкмоль/л кожного праймера, проводили за таких, рекомендованих фірмою-виробником, температурних умов: синтез кДНК 50°С – 30 хв; ініціююча денатурація 95°С – 15 хв; далі 40 циклів: денатурація ДНК 95°С – 15 с; гібридизація праймерів 50єС – 35 с; добудова ланцюга 72° С – 30 с.; елонгація ампліфікатів 72°С – 5 хв.

У реакціях було використано такі послідовності праймерів: для *Aqp8* (код відповідної мРНК – NM_019158.2) – прямий – CAGATATGTCTGGGGAGCAGACGC та зворотний – CTGCCAGCAGTTCTTCACCTCGAC; для для *Actb* (NM_031144.3, ген β-актину, що використовується в якості внутрішнього контролю реакції завдяки конститутивній експресії) – прямий – TGGGACGATATGGAGAAGAT та зворотний – ATTGCCGATAGTGATGACCT.

Відтворюваність результатів ампліфікації було перевірено в паралельних експериментах шляхом повторення кПЛР на зразках РНК усіх тварин, із кожним праймером не менше трьох разів. Після кожного циклу ампліфікації зчитувалась флуоресценція барвника SYBR Green I, а по закінченні реакції будувалась крива плавлення для контролю утворення димерів праймерів та специфічності реакції. Початкову кількість мРНК обраховували за порівняльним C_T методом "$\Delta\Delta C_T$ Method", ефективність ПЛР реакцій була однаковою (Ex = ($10^{-1/slope}$)-1, slope < 0,1 [20]. Відносну кількість мРНК зазначених генів нормалізували до мРНК *Actb*.

Статистичну обробку результатів досліджень проводили на комп'ютері з використанням програмного пакету GraphPad Prism 5.04 (GraphPad Software Inc., США). Отримані дані тестували на нормальне розподілення за допомогою тесту Шапіро-Вілка. Подальший обрахунок результатів відбувався за допомогою двофакторного дисперсійного аналізу (two-way ANOVA) із пост тестом Бонферонні. Отримані результати наведені у вигляді середнього арифметичного ± середньоквадратичне відхилення (дисперсія) – SD, n = 7 – 10. Результати вважали значущими, коли $p \le 0,05$.

Результати та їх обговорення.

З'ясовано, що за умов тривалої шлункової гіпохлоргідрії в епітеліальних клітинах ДПК вміст органічних нітрит-іонів зростав: в епітеліоцитах ворсинок – у 2 рази ($p \le 0,0001$), в епітеліоцитах крипт – в 1,7 раза ($p \le 0,0001$) відносно контролю (Таблиця 1).

***Таблиця* 1. Вміст нітрит-іонів в епітеліоцитах дванадцятипалої кишки щурів за умов тривалої гіпохлоргідрії (M ± SD, n = 10)**

Група тварин	Епітеліоцити	нмоль Ч мг білка$^{-1}$
Контроль	ворсинки	$2,23 \pm 0,221^{чч}$
	крипти	$1,74 \pm 0,193^{чч}$
Симбітер	ворсинки	$1,86 \pm 0,201^{*/ччч}$
	крипти	$1,35 \pm 0,123^{**/ччч}$
Омепразол	ворсинки	$4,52 \pm 0,463^{****/чччч}$
	крипти	$2,93 \pm 0,281^{****/чччч}$
Омепразол + Симбітер	ворсинки	$2,55 \pm 0,274^{####/ч}$
	крипти	$2,11 \pm 0,232^{*/###/ч}$

Примітки: ****, **, * – $p \le 0,0001$, $p \le 0,01$, $p \le 0,05$ відносно контролю; ####, ###, – $p \le 0,0001$, $p \le 0,001$ відносно тварин, яким вводили лише омепразол; чччч, ччч, чч, ч – $p \le 0,0001$, $p \le 0,001$, $p \le 0,01$, $p \le 0,05$ ворсинки порівняно з криптами.

Монооксид нітрогену (NO) – найменша з відомих на сьогодні сигнальних молекул, що продукується майже виключно ензиматичним шляхом – під дією спеціалізованих NO-синтаз (NOS) [24]. Нітрит-іони є стабільним продуктом, що відображає рівень NO в тканинах. Нині вважається, що основним джерелом базального рівня NO в ДПК є конститутивні ізоформи NOS з ендотелію судин та нервів, а також низький рівень експресії індуцибельної NOS, що кодується геном *Nos2* [25]. Проте збільшення вмісту NO в клітинах ДПК може викликати нітрування та нітрозилювання білків та ДНК, що може призвести до функціонального та структурного пошкодження органа [24]. Окрім того, враховуючи раніше показане нами зростання вмісту $\cdot O_2^-$ [26], можна зробити припущення про генерацію пероксинітриту ($ONOO^-$) за таких умов, оскільки він є продуктом взаємодії супероксидного аніону та NO. Завдяки своїм властивостям пероксинітрит здатний викликати пошкодження широкого спектру молекул: окиснювати NH- і SH-групи білків, індукувати процеси ліпопероксидації у мембранах та викликати одноланцюгові розриви ДНК [24].

Отже, збільшення вмісту нітрит-іонів може свідчити про розвиток запалення в ДПК, яке супроводжується посиленням процесів утворення вільних радикалів [6, 7, 24].

При сумісному введенні мультипробіотика Симбітер щурам із гіпоацидним станом зазначений показник знижувався в 1,8 раза в епітеліоцитах ворсинок ($p \le 0,0001$) і в 1,4 раза в криптах ($p \le 0,001$) відносно групи тварин, яким вводили омепразол. Проте лишався підвищеним в 1,3 раза ($p \le 0,05$) в епітеліоцитах крипт відносно контролю. Це свідчить про зменшення запальних процесів у ДПК за рахунок протимікробної та антиоксидантної дії мультипробіотика Симбітер [6, 7, 17, 18]. Таким чином, на першому етапі дослідження показано інтенсифікацію прооксидантного фактора в клітинах ДПК за гіпоацидних умов і показано його пригнічення за умов введення мультпробіотика.

Дослідження характеру експресії гена *Aqp8* показало, що рівні його експресії в контрольній та другій групі епітеліоцитів крипт значуще не відрізнялися, так само як і у ворсинках. За умов тривалого пригнічення кислотопродукуючої функції шлунка щурів цей показник знижувався: у 2 рази в епітеліоцитах ворсинок ($p \le 0,0001$) і в 2,5 раза в криптах ($p \le 0,0001$) відносно контролю. Рівень мРНК гена *Snn1b* в епітелії ворсинок ДПК щурів, які разом з омепразолом отримували мультипробіотик, повертався до контрольних значень порівняно з тваринами третьої групи ($p \le 0,0001$). За аналогічних умов зазначений показник у криптах зростав в 1,9 раза ($p \le 0,0001$) по відношенню до показників групи з гіпоацидним станом шлунка та лишався зменшеним в 1,3 раза ($p \le 0,05$) відносно контролю (рис. 1.).

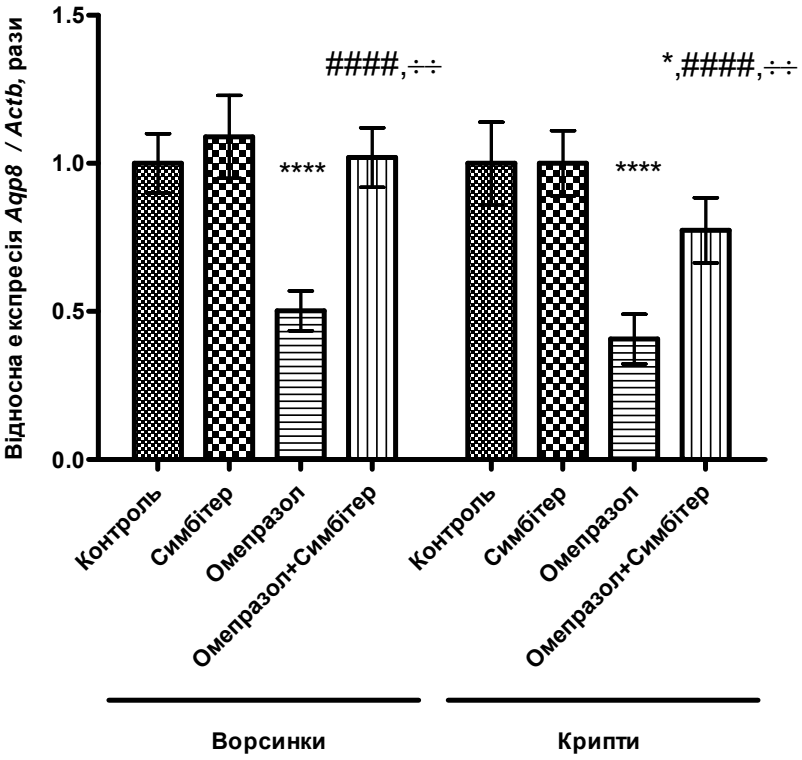


Рис. 1. Рівень експресії мРНК гена *Aqp8* у різних типах епітеліальних клітин дванадцятипалої кишки щурів за умов тривалої гіпоацидності та при введенні мультипробіотика.

**** – $p \le 0,0001$, * – $p \le 0,05$ відносно контролю; #### – $p \le 0,0001$ відносно тварин, яким вводили лише омепразол; чч – $p \le 0,01$ ворсинки порівняно з криптами

ШКТ здатний секретувати велику кількість води, а трансепітеліальна гіперсекреція рідини є основою секреторною діареї. Однак дефекти в поглинанні води в кишечнику, як і порушення механізмів абсорбції іонів (в основному, Na^+, H^+, Cl^-) є характерними ознаками запалення в слизовій кишечника й призводять до діареї [4, 8, 9, 13]. Супутні механізми останньої можуть поєднувати активування секреції, зменшення поглинання та дефекти бар'єрної функції епітелію [11, 13]. Як і при запальній хворобі кишечника, діарея, є доволі розповсюдженим проявом гіпохлоргідрії шлунка [4].

Хоча CFTR відіграє вирішальну роль у регуляції електролітного гомеостазу, не так багато відомо про експресію його гена в слизовій оболонці кишечника при запаленні. Відомо, що гіперекспресія *Cftr* може призвести як до підвищеної секреції іонів хлору, так і до зниження поглинання іонів натрію в слизової оболонки, що, у кінцевому рахунку, сприятиме діареї, наприклад, при дії бактеріальних ентеротоксинів [8]. Раніше нами було показано [12] вірогідне зростання експресії *Slc9a3* (гена, що кодує натрій–водневий транспортер 3 – NHE3) за умов тривалої шлункової гіпохлоргідрії і за підвищеної експресії *Cftr*, що може свідчити про порушення в поглинанні Na^+ ворсинками та криптами епітелію саме ДПК, і можна співставити з роботами, де продемонстровано *Cftr*-індуковану експресію мРНК гена *Slc9a3* в епітелії тонкого й товстого кишечника [8, 27]. Окрім цього, у попередніх дослідженнях ми виявили вірогідне зменшення експресії гена *Snn1b* (гена, що кодує натрієвий канал – ENaC) за умов тривалої шлункової гіпохлоргідрії й на тлі підвищеної експресії *Cftr*, що може свідчити про зниження реабсорбції іонів натрію в епітеліоцитах ДПК [12].

Нами було виявлено зниження експресії гена аквапорину 8 – *Aqp8* при раніше встановленому зменшенні експресії *Snn1b* та зростанні *Cftr* і *Slc9a3*, що свідчить

про поєднання дефектів як у поглинанні води у ДПК, так і в механізмах абсорбції іонів при діареї внаслідок тривалої шлункової гіпоацидності [12]. Так, наприклад, зменшення рівня експресії *Aqp8* корелювало з погіршенням симптомів діареї, зокрема при хворобі Крона та виразковому коліті [11, 13].

Таким чином, зміни в експресії *Aqp8* в епітеліоцитах дванадцятипалої кишки щурів можуть також відігравати важливу роль наряду із CFTR у патогенезі діареї, асоційованої із запаленням, шляхом змін функцій та властивостей Cl^-, Na^+, K^+ – каналів, Cl^-/HCO_3^- – транспортеру SLC26A3, NHE3, ENaC, змін у секреції слизу й поглинанні води [8, 9, 11, 13, 27].

У той же час у деяких дослідженнях на різних моделях запального процесу отримано неоднозначні результати й запропоновано, що так як порушення у всмоктуванні Na^+ і Cl^- асоційовані зі зменшенням різниці електричних потенціалів та активності Na^+/K^+-АТФ-ази клітини, функціонування якої є також необхідною для апікальної секреції Cl^- [27], можна припустити, що аномалії в поглинанні іонів натрію та хлору більшою мірою, ніж у секреції іонів хлору, є первинними, а порушення в поглинанні води – вторинними в патогенезі діареї [8, 9, 27].

Отже, встановлені зміни експресії гена *Aqp8* в епітеліоцитах ворсинок та крипт за умов тривалої шлункової гіпоацидності свідчать про розвиток патологічних процесів у тканині ДПК, зокрема запалення та діареї [11] внаслідок зменшення поглинання води на доданок до показаних нами раніше – збільшенні трансепітеліальної секреції іонів хлору та пригніченні епітеліального всмоктування NaCl. При цьому продемонстровано ключову роль саме дисбіозу травного тракту в ініціації пошкодження епітеліоцитів, наприклад, за рахунок дегранулляції тучних клітин – мастоцитів, як було продемонстровано в колоноцитах при запальній хворобі кишечника, хворобі Крона [28]. Адже мастоцити є проміжною ланкою між запальними клітинами, їх медіаторами та нервовою системою в нервово-гуморальній регуляції ШКТ. Під час активації мастоцитів, наприклад, прозапальними молекулами з джерела ендогенного запалення і/або клітинними та секреторними компонентами дисбіотичної мікрофлори вивільняються різноманітні медіатори, у тому числі гістамін, простагландин D2, лейкотрієн C4, фактор активації тромбоцитів, гепарин та нейтральні протеази. [28, 29]. Крім цього, було виявлено зміни в транспорті іонів після активування мастоцитів, що призводило до розвитку запалення та сенсомоторної дисфункції кишечника [30].

Також нами визначено, що до біохімічних механізмів ушкодження ДПК за умов тривалої шлункової гіпоацидності залучається інтенсифікація прооксидантного фактору, що посилюється за цих умов, та зміни в експресії генів *Aqp8*, *Cftr, Snn1b, Slc9a3* у відповідь на патогенну мікрофлору. Нормалізація експресії проаналізованих генів при застосуванні мультипробіотичного препарату також свідчить про істотний внесок дисбіотичних порушень у патологічні процеси, що відбуваються в епітеліоцитах ДПК за умов тривалої гіпохлоргідрії. Стосовно можливих механізмів впливу мультипробіотка Симбітер на експресію генів у ДПК, перш за все, слід зазначити його здатність елімінувати бактеріальну колонізацію ШКТ та дисбіоз [7, 17, 18]. Ефективність дії досліджуваного препарату пов'язана з широким спектром його біологічної активності та високим рівнем безпечності для організму. Адже продукти життєдіяльності бактеріальних штамів, представлених в препараті Симбітер: коротколанцюгові жирні кислоти, вітаміни, імуномодулятори тощо володіють антиоксидантними властивостями, завдяки чому вони здатні гальмувати розвиток ОС та знижувати інтенсивність запальних і деструктивних процесів у ШКТ й асоційованих органах [6, 7, 17-19].

Висновки. Показано, що тривале експериментальне пригнічення кислотної секреції шлунка супроводжується зміною експресії гена *Aqp8* в епітеліоцитах ДПК щурів. При введенні мультипробіотика Симбітер за тих самих умов рівень експресії цього гена в епітеліоцитах ворсинок і крипт наближався до контрольних значень. Отримані дані можуть свідчити про залучення аквапорину до головних медіаторів транспорту електролітів у патогенезі діареї при розвитку запального процесу у ДПК, обумовленого дисбіотичними змінами за умов тривалої гіпохлоргідрії.

Список використаних джерел

1. *Molecular* mechanisms in therapy of acid-related diseases / J. Shin, O. Vagin, K. Munson et al. // Cell and molecular life sciencesб 2008. – Vol. 65, N 2. – P. 264-281. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov

2. *Acid-suppressing* drugs and gastroesophageal reflux disease as risk factors for acute pancreatitis – results from a Swedish Case-Control Study / A. Sundstrom, K. Blomgren, L. Alfredson et al. // Pharmacoepidemiology and drug safety, 2006. – Vol. 15, N 3. – P.141-149. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov

3. *Johnson D. A.* Reported side effects and complications of long-term proton pump inhibitor use / D. A. Johnson, E. C. Oldfield I.V. // Clinical gastroenterology and hepatology, 2013. – Vol. 11 – P.458-464. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov

4. *Physiology* of the gastrointestinal tract. 4th edition / K. Barrett, F. Ghishan, J. Merchant et al. – N. Y. : Academic Press, 2006. – 2080 p. Available from: http://www.sciencedirect.com

5. *Safety* of long-term use of proton pump inhibitors / A. Thomson, M. Sauve, N. Kassam et al. // World journal of gastroenterology, 2010. – Vol. 16, N 19. – P. 2323-2330. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov

6. *Probiotics* enhance pancreatic glutathione biosynthesis and reduce oxidative stress in experimental acute pancreatitis / F. Lutgendorff, L. M. Trulsson, L. P. van Minnen et al. // American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology, 2008. – Vol. 295, N 5. – P. 1111–1121. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov

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

8. *Upregulation* of CFTR expression but not SLC26A3 and SLC9A3 in ulcerative colitis / H. Lohi, S. Мдкелд, K. Pulkkinen et al. // Am J. Physiol Gastrointest Liver Physiol., 2002. – Vol. 283 – P. G567–G575. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov

9. *Kunzelmann K.* Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease / K. Kunzelmann, M. Mall. // Physiol Rev., 2002. – Vol. 82 – P. 245–289. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov

10. *Intestinal* inhibition of the Na^+/H^+ exchanger 3 prevents cardiorenal damage in rats and inhibits Na^+ uptake in humans / A. G. Spencer, E.D. Labonte, D. P. Rosenbaum et al. // Sci. Transl. Med., 2014. – Vol. 6, N 227. – P. 227-36. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov

11. *Zhu Cui.* Expression, distribution and role of aquaporin water channels in human and animal stomach and intestines / Cui Zhu, Zhuang Chen, Zongyong Jiang // Int. J. Mol. Sci., 2016. – Vol. 17, № 9. – P. 1399. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov

12. *Expression* of *Cftr*, *Slc9a3* and *Snn1b* genes in rat duodenal epithelial cells upon long-term gastric hypochlorhydria and with administration of multiprobiotic / A. Dranitsina, K. Dvorshchenko, D. Grebinyk, L. Ostapchenko. // Вісн. Київ. нац. ун-ту імені Тараса Шевченка. Біологія, 2012; – №1 (71). – P. 8–13.

13. *5-Fluorouracil* Induces Diarrhea with changes in the expression of inflammatory cytokines and aquaporins in mouse intestines / H. Sakai, A. Sagara, K. Matsumoto et al. // PLoS ONE, 2013. – Vol. 8, № 1. – e54788. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov

14. *Expression* and immunolocalization of the aquaporin-8 water channel in rat gastrointestinal tract / G. Calamita, A. Mazzone,A. Bizzoca et al. // Eur J Cell Biol., 2001. – Vol. 80, № 11. – P. 711–719. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov

15. *Immunolocalization* of aquaporin-8 in rat kidney, gastrointestinal tract, testis, and airways / M. Elkjgr LENE, N. Nejsum, V. Gresz et al. // Am J Physiol Renal Physiol., 2001. – Vol. 281. – F1047–F1057. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov

16. *Aquaporin* 3 and 8 are down-regulated in TNBS-induced rat colitis / G. Zhao, J. Li, J. Wang et al. // Biochem Biophys Res Commun., 2014. – Vol. 443, № 1. – P. 161–166. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov

17. *Culligan E.* Probiotics and gastrointestinal disease: successes, problems and future prospects / E. Culligan, C. Hill, R. Sleator // Gut pathogens, 2009. – Vol. 1, N 19. – P. 38-49. Available from: http://www.-ncbi.nlm.nih.gov

18. *Iankovsky D.* Microbiota and human health / D. Iankovsky, G. Dyment. – Kyiv : LLC Chervona Ruta-Turs, 2008.

19. *Tsyriuk O. I.* Effect of omeprazole-induced hypergastrinemia on the basal gastric secretion in rats / O.I. Tsyriuk, T.V. Beregova // Bulletin of biological and medical issues, 2007. – N 3. – P.38-43. Available from: http://www.irbis-nbuv.gov.ua

20. *Analysis* of nitrate, nitrite and [^{15}N] nitrate in biological fluids / L.C. Green, A.W. David, J. Glosgowski et al. // Anal. Biochem., 1982. – Vol. 126, № 1. – P. 131–138. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov

21. *Protein* measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr et al. // The journal of biological chemistry, 1951. – 193, N 1. – P. 265–275. Available from: http://www.-ncbi.nlm.nih.gov

22. *Flint N.* A low-temperature method for the isolation of small-intestinal epithelium along the crypt-vinlus axis / N. Flint, F. L. Cove, G. S. H. Evans // Biochemical journal, 1991. – Vol. 280 (Pt 2). – P.331–334. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov

23. *Chomczynski P.* Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction / P. Chomczynski, N. Sacchi // Analytical biochemistry, 1987. – Vol. 162. – P. 156-159. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov

24. *Calcerrada P.* Nitric oxide-derived oxidants with a focus on peroxynitrite: monelcular targets, cellular responses and therapeutic implications / P. Calcerrada, G. Peluffo, R. Radi // Curr. Pharm. Des., 2011. – Vol. 17, № 35. – P. 3905–3932. Available from: http://www.-ncbi.nlm.nih.gov

25. *Cho C.H.* Current roles of nitric oxide in gastrointestinal disorders / C.H. Cho // J. Physiol Paris., 2001. – Vol. 95, № 1-6. – P. 253-256. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov

26. *Дворщенко К.О.* Вплив мультипробіотика Симбітер на вільно-радикальні процеси в епітеліоцитах дванадцятипалої кишки за умов тривалої шлункової гіпохлоргідрі / К.О. Дворщенко, У.А. Савко, Л.І. Остапченко // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія, 2013. – № 1. – P. 85-92.

27. *Jakab R. L.* Physiological relevance of cell-specific distribution patterns of CFTR, NKCC1, NBCe1, and NHE3 along the crypt-villus axis in the intestine / R. L. Jakab, A. M. Collaco, N. A. Ameen // Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol., 2011. – Vol. 300, N 1. – P. G82-98. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov

28. *Activated* mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome / G. Barbara, V. Stanghellini, R. De Giorgio et al. // Gastroenterol., 2004. – Vol. 126, № 3. – P. 693–702. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov

29. *Vagal* influences over mast cells / R.H. Stead, E.C. Colley, B. Wang et al. // Auton. Neurosci., 2006. – Vol. 125, № 1-2. – P. 53–61. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov.

30. *Intestinal* mast cells in gut inflammation and motility disturbances / Y. Benedicte, De Winter, M. Rene et al. // Biochimica et Biophysica Acta. – 2012; – Vol. 1822. – P. 66–73. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov

References

1. Shin J, Vagin O, Munson K, Kidd M, Modlin IM, Sachs G. Molecular mechanisms in therapy of acid-related diseases. Cell Mol Life Sci. 2008;65(2):264-81. PubMed Central PMCID: PMC3081136.

2. Sundstrom A, Blomgren K, Alfredsson L, Wiholm BE. Acid-suppressing drugs and gastroesophageal reflux disease as risk factors for acute pancreatitis – results from a Swedish Case-Control Study. Pharmacoepidemiol Drug Saf. 2006;15(3):141-9. PubMed PMID: 16200654.

3. Johnson D.A., Oldfield E.C. I.V. Reported side effects and complications of long-term proton pump inhibitor use. Clin Gastroenterol Hepatol. 2013;11:458-64. PubMed PMID: 23247326.

4. Barrett K, Ghishan F, Merchant J, Said HM, Wood JD. Physiology of the gastrointestinal tract. 4th ed. New York: Academic Press; 2006. 2080 p.

5. Thomson A, Sauve M, Kassam N, Kamitakahara H. Safety of long-term use of proton pump inhibitors World J Gastroenterol. 2010;16(19):2323-30. PubMed PMID: 20480516.

6. Lutgendorff F, Trulsson LM, van Minnen LP, Rijkers GT, Timmerman HM, Franzйn LE. Probiotics enhance pancreatic glutathione biosynthesis and reduce oxidative stress in experimental acute pancreatitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2008;295(5):G1111-21. PubMed PMID: 18832452.

7. Dvorchshenko K, Bernyk O, Dranitsina A, Senin S, Ostapchenko L. Vpliv okisnogo stresu na riven ekspessii geniv TGF-β i HGF u pechinci schuriv v umovah trivaloi shlunkovoi hipohlorhidrii ta za vvedennya multiprobiotika Symbiter. Ukr Biochem J. 2013;85(5):114-23. Ukrainian.

8. Lohi H, Mдkelд S, Pulkkinen K, Hцglund P, Karjalainen-Lindsberg ML, Puolakkainen P, et al. Upregulation of CFTR expression but not SLC26A3 and SLC9A3 in ulcerative colitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2002;283(3):G567-75. PubMed PMID: 12181169.

9. Kunzelmann K, Mall M. Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. Physiol Rev. 2002;82:245–89. PubMed PMID: 11773614.

10. Spencer AG, Labonte ED, Rosenbaum DP, Plato CF, Carreras CW, Leadbetter MR, et al. Intestinal inhibition of the Na^+/H^+ exchanger 3 prevents cardiorenal damage in rats and inhibits Na^+ uptake in humans. Sci Transl Med. 2014;6(227):227-36. PubMed PMID: 24622516.

11. Cui Zhu, Zhuang Chen, Zongyong Jiang. Expression, distribution and role of aquaporin water channels in human and animal stomach and intestines. Int. J. Mol. Sci. 2016;17(9):13992. PMCID: PMC5037679.

12. Dranitsina A, Dvorshchenko K, Grebinyk D, Ostapchenko L. Expression of *Cftr*, *Slc9a3* and *Snn1b* genes in rat duodenal epithelial cells upon long-term gastric hypochlorhydria and with administration of multiprobiotic. Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Biology. 2016;1(71):8-13.

13. Sakai H, Sagara A, Matsumoto K, Hasegawa S, Sato K, Nishizaki M, Shoji T, Horie S, Nakagawa T, Tokuyama S, Narita M. 5-Fluorouracil Induces Diarrhea with Changes in the Expression of Inflammatory Cytokines and Aquaporins in Mouse Intestines. PLoS ONE. 2013;8(1):e54788.

14. Calamita G, Mazzone A, Bizzoca A, Cavalier A, Cassano G, Thomas D, Svelto M. Expression and immunolocalization of the aquaporin-8 water channel in rat gastrointestinal tract. Eur J Cell Biol. 2001;80(11):711-9. PMID: 11824790.

15. Elkjжr M, Nejsum LN, Gresz V, Kwon Tae-Hwan, Jensen UB, Frшkiжr J, Nielsen S. Immunolocalization of aquaporin-8 in rat kidney, gastrointestinal tract, testis, and airways Am J Physiol Renal Physiol. 2001;281:F1047–F1057.

16. Zhao G, Li J, Wang J, Shen X, Sun J. Aquaporin 3 and 8 are down-regulated in TNBS-induced rat colitis. Biochem Biophys Res Commun. 2014;443(1):161-6. PMID: 24286754.

17. Culligan E, Hill C, Sleator R. Probiotics and gastrointestinal disease: successes, problems and future prospects. Gut Pathog. 2009;1(19):38-49. PubMed PMID: 19930635.

18. Iankovsky D. Microbiota and human health / D. Iankovsky, G. Dyment. – Kyiv : LLC Chervona Ruta-Turs, 2008. – 552 p.

19. Tsyriuk OI, Beregova TV. Vpliv omeprazole-vyklikanoi uipergastrinemii na shkunkovu sekreciyu u schuriv. Visnik problem biologii i medicine. 2007;3;38-43. Ukrainian.

20. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [^{15}N] nitrate in biological fluids. Anal. Biochem. 1982;126(1):131–8. PMID: 7181105.

21. Lowry OH, Rosebrough NJ., Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951;193(1):265-75. PubMed PMID: 14907713.

22. Flint N, Cove FL, Evans GS. A low-temperature method for the isolation of small-intestinal epithelium along the crypt-vinlus axis. Biochem J. 1991;280(Pt 2):331-4. PubMed PMID: 1747105.

23. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 1987;162(1):156-9. PubMed PMID: 2440339.

24. Calcerrada P, Peluffo G, R. Radi. Nitric oxide-derived oxidants with a focus on peroxynitrite: monelcular targets, cellular responses and therapeutic implications. Curr. Pharm. Des. 2011;17(35):3905–3932.

25. Cho CH. Current roles of nitric oxide in gastrointestinal disorders. J Physiol Paris. 2001;95(1-6):253-6. PMID: 11595446.

26. Dvorshchenko K, Savko U, Ostapchenko L. Impact of multiprobiotic Symbiter on free radical processes in duodenal epitheliocytes in conditions of prolonged gastric hypacidity. Experimental and clinical physiology and biochemistry. 2013;1:85-92.

27. Jakab RL, Collaco AM, Ameen NA. Physiological relevance of cell-specific distribution patterns of CFTR, NKCC1, NBCe1, and NHE3 along the crypt-villus axis in the intestine. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2011;300(1):G82-98. PubMed PMID: 21030607.

28. Barbara G, Stanghellini V, De Giorgio R, Cremon C, Cottrell GS, Santini D, Pasquinelli G, Morselli-Labate AM, Grady EF, Bunnett NW, Collins SM, Corinaldesi R. Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. Gastroenterol. 2004;126(3):693–702. PMID: 14988823.

29. Stead RH1, Colley EC, Wang B, Partosoedarso E, Lin J, Stanisz A, Hillsley K. Vagal influences over mast cells, Auton. Neurosci. 2006;125(1-2):53-61. PMID: 16500155.

30. Benedicte Y. De Winter, Rene M. van den Wijngaard, Wouter J. de Jonge. Intestinal mast cells in gut inflammation and motility disturbances. Biochimica et Biophysica Acta. 2012;1822:66–73.

Надійшла до редколегії 02.03.17

А. Драницина, канд. биол. наук, Е. Дворщенко, д-р биол. наук, Д. Гребинык, канд. биол. наук, Л. Остапченко, д-р биол. наук
Киевский национальный університет им. Тараса Шевченко, Киев

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *AQP8* В ЭПИТЕЛИОЦИТАХ ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ КРЫС ПРИ ДИАРЕЕ В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОЙ ЖЕЛУДОЧНОЙ ГИПОХЛОРГИДРИИ

Показано уменьшение уровня экспрессии гена Aqp8 в эпителиоцитах ворсинок и крипт двенадцатиперстной кишки крыс на фоне интенсификации процессов образования свободных радикалов при диарее в гипоацидных условиях. При введении мультипробиотика Симбитер в тех же условиях уровень экспрессии данного гена в эпителиоцитах ворсинок и крипт приближался к контрольным значениям.

Ключевые слова: желудочная гипохлоргидрія, двенадцатиперстная кишка, диарея, экспрессия гена, Aqp8, мультипробиотик.

A. Dranitsina, Ph. D., K. Dvorshchenko, D. Sci., D. Grebinyk, Ph. D., L. Ostapchenko, D. Sci.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

EXPRESSION OF *AQP8* GENE IN RAT DUODENAL WITH DIARRHEA UPON LONG-TERM GASTRIC HYPOCHLORHYDRIA

The decreasing of Aqp8 gene's expression in rat duodenal villus and crypt epithelial cells against the background of intensification of free radical formation with diarrhea upon gastric hypoacidic conditions were shown. The level of above mentioned gene's expression both in villus and crypt epitheliocytes approached to the control value upon the treatment of hypoacidic rats with multiprobiotic Symbiter.

Key words: gastric hypoacidity, duodenal, diarrhea, gene expression, Aqp8, multiprobiotic.

УДК 577.126:577.121.6:577.2.04.

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, Україна

ВІКОВІ ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ЗМІНИ *DROSOPHILA* ПРИ УТРИМАННІ НА СЕРЕДОВИЩІ З АЛЬФА-КЕТОГЛУТАРАТОМ

Досліджено деякі метаболічні показники та показники функціонального старіння у самців плодової мушки D. melanogaster w^{1118} при вирощуванні на середовищі з альфа-кетоглутаратом (АКГ). Харчовий АКГ підвищував вміст амінокислот та білка у 2-денних самців та триацилгліцеридів у 24-денних самців без впливу на антиоксидантну систему самців обох вікових груп. Також АКГ підвищував стійкість до теплового стресу в обох вікових групах, не впливав на стійкість до оксидантів і запобігав зниженню рухової активності самців старшого віку.

Ключові слова: амінокислоти, триацилгліцериди, тепловий стрес, локомоторна активність.

Вступ. Альфа-кетоглутарат (АКГ) є проміжним метаболітом циклу Кребса та реакцій амінування/трансамінування амінокислот. На даний час вивчається вплив АКГ як харчової добавки, яка проявляє багатосторонні позитивні ефекти на організм. На ссавцях показано, що додавання солей альфа-кетоглутарової кислоти до їжі стимулює обмінні процеси та відновлення організму при ушкодженнях шлунково-кишкового тракту, травмах м'язів та кісток [12; 26]. Встановлено, що стимулювання синтезу білка при станах білкового дефіциту зумовлене тим, що АКГ є джерелом для біосинтезу таких амінокислот, як пролін, глутамат, глутамін та аспартат [12; 17]. Окрім того, виявлена здатність АКГ стимулювати мітохондріальне дихання та окисне фосфорилювання у печінці білих щурів [16]. 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 анти-віковий фактор [12; 22]. 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 та модулювати антиоксидантний захист у старих мишей [22]. Показана здатність екзогенного АКГ збільшувати тривалість життя нематоди *Caenorabditis elegans* за механізмом подібним до механізму калорійного обмеження [8].

У наших попередніх дослідженнях було знайдено, що вирощування плодової мушки *Drosophila melanogaster* на середовищі, яке містило АКГ, порізному впливало на амінокислотний обмін у молодих особин лінії Canton S [20]. З використанням іншої лінії мушок – w^{1118}, нами було показано, що харчовий АКГ викликає різні метаболічні зміни у молодих та середньо-вікових особин *D. melanogaster*, які відображаються на стійкості до стресів та плодючості. Так, вирощування на АКГ призводило до підвищення вмісту білка, зниження вмісту триацилгліцеридів та індукції оксидативного стресу у молодих самок w^{1118}, а в самок старшого віку АКГ спричиняв протилежні зміни [4]. У вказаному дослідженні були використанні лише самки. Враховуючи, що раніше нами були виявлені метаболічні відмінності у молодих самців та самок плодової мушки лінії Canton S за вирощування на АКГ [20], у даній роботі ми прагнули з'ясувати, чи будуть спостерігатися відмінності у впливі харчового АКГ на метаболізм самців *D. melanogaster* w^{1118} молодого та старшого віку. Також ми дослідили, чи тривале споживання їжі, збагаченої АКГ, може сповільнювати функціональне старіння самців w^{1118}. Як показники функціонального старіння були оцінені стійкість до низки стресорів та індукована рухова активність самців [10; 11].

Метою даної роботи було дослідити фізіолого-біохімічні особливості молодих (2-денних) та середньовікових (24-денних) самців *D. melanogaster* лінії w^{1118} за культивування на АКГ.

Матеріали і методи. У роботі використовували лінію w^{1118} *D. melanogaster*, отриману з Блюмінтонського Стокового Центру університету Індіани (США). Особливістю лінії є наявність білих очей через мутацію у гені white. Батьківську культуру мух утримували на дріжджово-мелясному середовищі [20]. Експериментальні культури мух вирощували на середовищі, яке містило 5 % сухих пекарських дріжджів, 5 % сахарози, 1 % агару та 0,18 % ніпагіну (для інгібування росту цвілевих грибів). У дослідні середовища додатково вносили 10 мМ розчин натрієвої солі АКГ(кінцева концентрація) [20]. Культивування проводили при 25 °С, постійній вологості (50-60 %) та світловому режимі день:ніч – 16:8. Після вилуплення мух розділяли за статтю шляхом анестезування за допомогою вуглекислого газу. У подальших експериментах використовували лише самців, яких або переводили на свіжі середовища того самого складу для отримання 24-денних особин, або використовували для біохімічних та фізіологічних тестів. Заміну середовищ проводили кожного другого дня.

Визначення індукованої рухової активності базувалось на явищі негативного геотаксису у мух [10]. Для цього по 10 самців вносили у скляні пробірки, струшували їх на дно та фіксували кількість особин, які долали відстань 5 см догори за 20 с. У кожному з чотирьох незалежних повторів протестовано по 40 мух. Стійкість до теплового стресу визначали за часом впадання мух у теплову кому при 39, 40 та 41 °С. У кожному з трьох незалежних повторів було тестовано по 10–12 самців. Для визначення стійкості до голодування по 10 самців вносили у скляні пробірки, які містили 1,25 мл 1 % агару

© Лилик М., Сорочинська О., Манюх О., Байляк М., 2017

та закривали ватними корками, щоб обмежити підсихання середовища. У кожному з чотирьох незалежних повторів було тестовано по 3 пробірки. Кількість загиблих мух фіксували кожні 24 годин. Для визначення стійкості до оксидантів самців переносили у пробірки, які містили утрамбовану смужку серветки, просочену розчином 5 % сахарози, що додатково містила 5 % пероксид водню, 20 мМ менадіон або 10 мМ нітропрусид натрію (НПН) [10]. У кожному з трьох незалежних повторів було тестовано по дві пробірки з 10 самцями у кожній. Кількість живих мух підраховували через 48 годин від початку експозиції.

Масу однієї мухи визначали як середнє арифметичне маси десяти особин, зважених на торсійній вазі WTW 2 ("Techniprot", Польща). Вміст води визначали за різницею маси тіла мушок до і після висушування у сушильній шафі при 60 °С.

Приготування безклітинних екстрактів мух здійснювали як описано раніше [4]. Активність каталази визначали за швидкістю розкладання пероксиду водню при 240 нм, використовуючи коефіцієнт молярної абсорбції для H_2O_2 39,4 $M^{-1}см^{-1}$ [1]. Для визначення SH-груп у низькомолекулярних сполуках, амінокислот, орнітину та кетокислот білки попередньо осаджували 10 % трихлороцтовою кислотою. Вміст SH-груп визначали за методом Елмана [9]. Вміст амінокислот визначали за їх взаємодією з нінгідрином з утворенням комплексу блакитного кольору з максимум поглинання при 570 нм [18]. Сумарний вміст орнітину та проліну визначали за взаємодією з нінгідрином з утворенням комплексу рожево-червоного кольору при кислих значеннях pH з максимумом поглинання при 512 нм [5]. Для визначення лише проліну, досліджуваний препарат обробляли нітритом натрію. Вміст вільного орнітину розраховували за різницею між загальним вмістом двох амінокислот та вмістом вільного проліну. Вміст кетокислот визначали за зв'язуванням 2,4-динітрофенілгідразину з карбонільними групами кетокислот у лужному середовищі з утворенням 2,4-динітрофенілгідразинів з максимумом поглинання при 420 нм [24]. Для побудови калібрувальної кривої використовували стандартний розчин піруват. Концентрацію протеїнів визначали за методом Бредфорд [6]. Як стандарт використовували бичачий сироватковий альбумін. Вміст сечовини, глюкози та триацилгліцеридів (ТАГ) визначали з використанням діагностичних наборів фірми "Cormay" (Ломянкі, Польща) згідно з інструкціями виробника. Визначення вмісту глікогену здійснювали непрямим методом з використанням антрону [7].

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

Результати та обговорення. Вирощування на середовищі з 10 мМ АКГ (концентрація АКГ обрана на основі попередніх досліджень [4] не впливало на масу тіла, вміст води, вміст білка, сечовини, глюкози, глікогену, ТАГ та кетокислот у тілі 2-денних самців (табл. 1). Водночас, 2-денні самці, вирощені на АКГ, мали вищий вміст вільних амінокислот, і зокрема вищий вміст проліну (рис. 1) та орнітину (табл. 1), порівняно з контрольними особинами (рис. 1, табл.1).

***Таблиця* 1. Маса тіла та вміст деяких метаболітів у тілі дводенних самців *лінії* ^{w1118}, вирощених на середовищі з АКГ**

Параметр	Середовище культивування		Кількість повторів
	Контроль	10 мМ АКГ	
Маса тіла, мг	0.753±0.023	0.706±0.015	5-8
Вміст води, %	74.9±2.6	79.7±2.5	4
Білок, мг/ мг с.м.	37.3±2.0	41.6±2.8	8
Глюкоза, мг/ г.с.м.	12,4±1,6	12,4±2,0	8
Глікоген, мг/ г.с.м.	4,82±0,51	3.32±1.11	4
ТАГ, мг/ г.с.м.	11,5±1,5	13,3±0,5	8
Кетокислоти, мкмоль-екв піруват на г.с.м.	6.06±0.65	6.48±1.12	5
Сечовина, мг/ г.с.м.	0.78±0.06	0.9±0.06	3
Орнітин, мкмоль/ г.с.м.	2.89±0.28	3.94±0.27*	5-7

Примітки. * – відрізняється від відповідного значення у контролі з $P < 0,05$.

У 24-денних самців контрольної і дослідної груп спостерігалися вікові зміни у низці вказаних показників, зокрема у них знижувався вміст загального білка (табл. 2) та зростав вміст вільних амінокислот, в тому числі проліну (рис. 1), а також глюкози та ТАГ (табл. 2), порівняно з такими показниками у 2-денних особин.

***Таблиця* 2. Вміст деяких метаболітів у тілі 24-денних самців *лінії* ^{w1118}, вирощених на середовищі з АКГ.**

Параметр	Середовище культивування		Кількість повторів
	Контроль	10 мМ АКГ	
Білок, мг/ г с.м.	33.4±0.34#	33.8±2.7#	5-6
Глюкоза, мг/ г.с.м.	19.4±0.6#	18.2±1.3#	4-6
ТАГ, мг/ г.с.м.	22.1±4.3#	41.9±11.0*#	4

Примітки. **#** – відрізняється від відповідного значення у дводенних особин та * – від відповідного значення у контролі з $P < 0,05$.

Ці результати добре узгоджуються з попередніми дослідженнями щодо вікових змін у метаболізмі плодової мушки [4; 11]. Додавання АКГ до їжі не впливало на вміст білка, глюкози та амінокислот, але підвищувало вміст ТАГ у тілі 24-денних самців, порівняно з контрольними особинами (табл. 2). Отже, харчовий АКГ порізному впливав на вміст основних метаболітів у 2-денних та 24-денних самців.

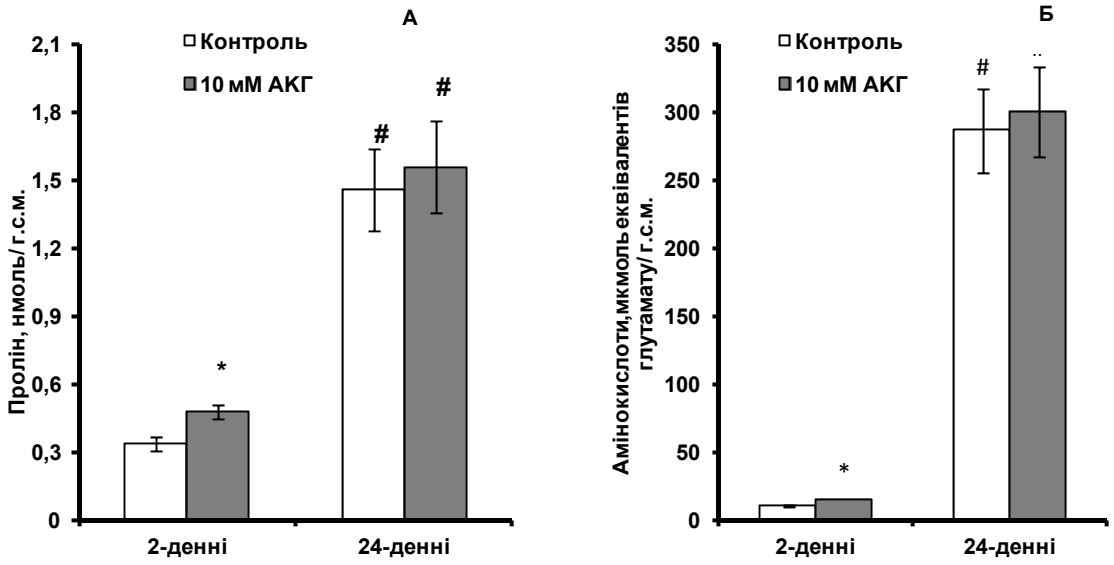


Рис. 1. Вміст проліну (А) та вільних амінокислот (Б) у 2- та 24-денних самців *лінії* w^{1118}, вирощених на середовищі з АКГ

Примітки. # – відрізняється від відповідного значення у дводенних особин та * – від відповідного значення у контролі з $P < 0,05$, n=4-6.

Метаболічні ефекти АКГ, виявлені у 2-денних самців w^{1118}, частково перекриваються з ефектами, отриманими раніше на самках w^{1118} [4]. Основна відмінність між статями простежується у вмісті загального білка та ТАГ: АКГ призводив до зростання загального білка та зниження ТАГ у 2-денних самок [4], проте у самців змін у даних показниках нами не виявлено (табл. 1). Щодо вмісту білка та амінокислот, то статеві відмінності у даних показниках також нами були знайдені раніше на лінії Canton S [20]. Водночас, наші результати на самцях лінії w^{1118} не узгоджуються з такими на самцях лінії Canton S, оскільки ми не спостерігали позитивного ефекту харчового АКГ на вміст білка у 24-денних самців w^{1118}, як це було виявлено для самців лінії Canton S. Також наші результати свідчать про те, що АКГ не модифікує катаболізм амінокислот, оскільки вміст сечовини у контрольних та дослідних самців w^{1118} був подібним (табл. 1). При амінуванні АКГ утворюється глутамат, який під дією пірролін-5-карбоксилази перетворюється до пірролін-5-карбоксилату, який є безпосереднім попередником проліну та орнітину [26]. Таким чином, зростання вмісту вільних амінокислот та зокрема вмісту проліну і орнітину у молодих самців за культивування на середовищі з АКГ може бути пов'язане із включенням екзогенного АКГ у амінокислотний обмін мушок. У свиней харчовий АКГ стимулює поглинання амінокислот кишечником [17]. Тому не виключено, що у наших експериментах збільшення рівня амінокислот також може бути зумовлене, принаймні частково, із стимуляцією адсорбції амінокислот із спожитого середовища у кишечнику молодих самців. Відсутність змін у вмісті глюкози, глікогену та ТАГ у молодих самців, вирощених на АКГ, може вказувати на те, що АКГ не прискорює утилізацію даних метаболітів через цикл Кребса, на противагу попереднім дослідженням на ссавцях, в яких було показане прискорення окислення глюкози [13] та зниження вмісту жирів [12] при споживанні АКГ. Очевидно, у молодих особин АКГ значною мірою використовується для біосинтезу амінокислот, ніж у циклі Кребса.

АКГ також бере участь у реакціях трансамінування, які є джерелом не лише амінокислот, але й кетокислот, зокрема піровиноградної та щавлевооцтової. Також сам АКГ є кетокислотою. Тому ми визначили вміст кетокислот у 2-денних самців плодової мушки, проте відмінностей у даному показнику від між дослідними і контрольними самцями не було виявлено (табл. 1). Опосередковано дані результати свідчать про те, що АКГ не накопичується у клітинах, а метаболізується у різних процесах.

На відміну від молодих особин, АКГ не викликав суттєвих метаболічних змін у 24-денних самців, окрім підвищення вмісту ТАГ (табл. 2). Зростання ТАГ у старшому віці нами також було показано раніше для самок лінії w^{1118} [4], і це зростання було значно вищим, ніж у самців у даному експерименті. Вищий вміст ТАГ у особин плодової мушки при довготривалому культивування на середовищі з АКГ, порівняно контрольними особинами, очевидно, пов'язаний з інгібуванням циклу Кребса, унаслідок чого ацетил-КоА перенаправляється на синтез жирних кислот. Інгібування циклу Кребса було показане раніше при надлишку АКГ у дріжджів [21]. Очевидно, потреби старших особин плодової мушки у АКГ є нижчими, ніж для молодих мух, тому старші самці зазнають впливу надлишкової кількості АКГ, який споживається з їжею.

У попередньому дослідженні 24-денні самки на середовищі з АКГ мали також вищий вміст амінокислот та білка [4], чого нами не знайдено у 24-денних самців (рис. 1, табл. 2). Таким чином, харчовий АКГ покращує амінокислотний/білковий обмін у самців молодого, але не старшого віку, хоча у самок даний ефект не залежить від віку. Такі відмінності, очевидно, пов'язані з різними метаболічними потребами самців та самок: для самок важливим є високий вміст білка для тривалого відкладання достатньої кількості яєць [2]. Ми припустили, що у самців старшого віку значна частина АКГ може використовуватися у циклі Кребса для отримання енергії з метою підтримання на належному рівні локомоторної активності, яка, як відомо, знижується з віком [11], а також АКГ може використовуватися для синтезу специфічних білків, оскільки відомо, що навіть при зниженні загального синтезу білка, синтез окремих білків може зростати [23]. Зокрема, АКГ як попередник проліну може використовуватися для синтезу колагену та формувати структуру крил плодової мушки [15].

Щоб перевірити, чи впливав АКГ на локомоторну активність, нами було визначено рухову індуковану активність самців. Як і очікувалось, 24-денні самці мали меншу рухову активність, ніж 2-денні особини (рис. 2А). Водночас, 24-денні самці, які утримувалися на середовищі з АКГ, мали приблизно на 30 % вищу індуковану рухову активність, порівняно з відповідними контроль-

ними самцями. Таким чином, харчовий АКГ частково запобігав втраті локомоторної активності самців.

Оскільки, у самців молодого віку АКГ не впливав, а у особин старшого віку призводив до зростання вмісту запасних ліпідів (триацигліцеридів), було досліджено, чи впливала ця метаболічна зміна на стійкість самців до голодування. Нами не виявлено суттєвих відмінностей у стійкості до голодування між контрольними та експериментальними самцями обох вікових груп, лише динаміка загибелі 24-денних мух була дещо повільнішою, ніж для 2-денних (рис. 2Б). Таким чином, акумуляція ТАГ не надавала експериментальним самцям більшої резистентності до голодування. Очевидно, загибель самців за даних умов пов'язана з іншими процесами.

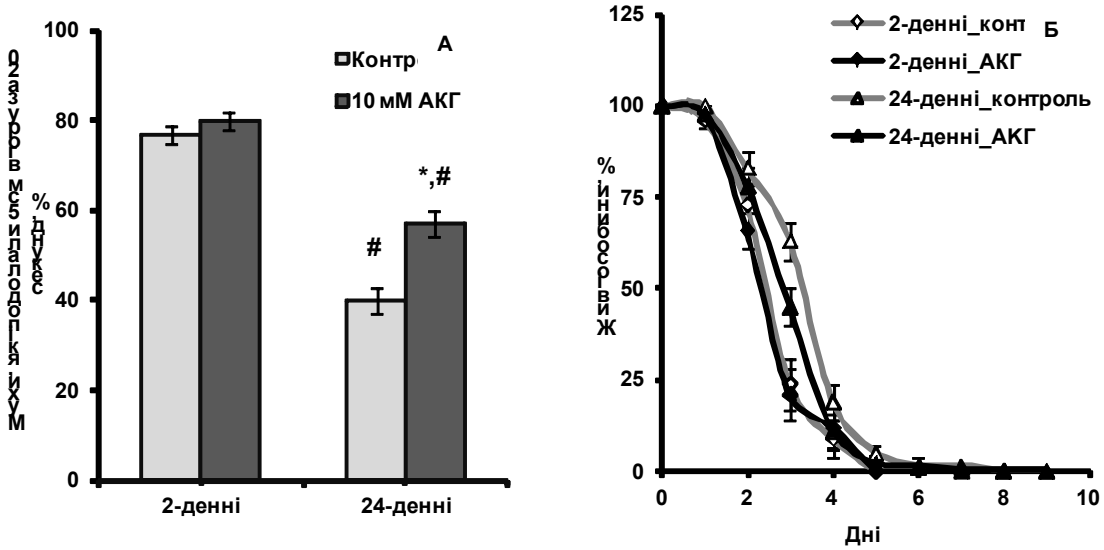


Рис. 2. Індукована рухова активність (А) та стійкість до голодування (Б) самців *лінії* ^{w1118}, вирощених на середовищі з АКГ

Примітки. # – відрізняється від відповідного значення у дводенних особин та * – від відповідного значення у контролі з $P < 0,05$, n=3-4.

Окрім впливу на амінокислотний обмін, АКГ може модулювати антиоксидантний захист [22]. Тому ми дослідили деякі показники антиоксидантного захисту у самців, вирощених на середовищі з АКГ.

Активність каталази та вміст низькомолекулярних тіол-вмісних сполук не відрізнялись від контрольних значень як для 2-денних, так і 24-денних самців, вирощених на АКГ (рис. 3). При цьому, активність каталази у 24-денних самців була суттєво вищою, а вміст низькомолекулярних тіолів був нижчим, ніж у 2-денних особин. Каталаза – один з основних антиоксидантних ферментів, функцією якого є знешкодження пероксиду водню і активність якого зростає при підвищеній продукції активних форм кисню [19]. Серед низькомолекулярних тіолів до 90 % становить трипептид глутатіон, який є основним низькомолекулярним антиоксидантом у клітинах і зниження його вмісту є маркером розвитку оксидативного стресу [19]. З огляду на це, отримані результати свідчать про те, що 24-денні самці, на відміну від 2-денних особин, зазнавали впливу оксидативного стресу. При цьому, АКГ не підвищував потужність ендогенного антиоксидантного захисту. Разом з тим, відомо, що АКГ сам по собі має антиоксиданті властивості, зокрема може безпосередньо знешкоджувати пероксид водню [3].

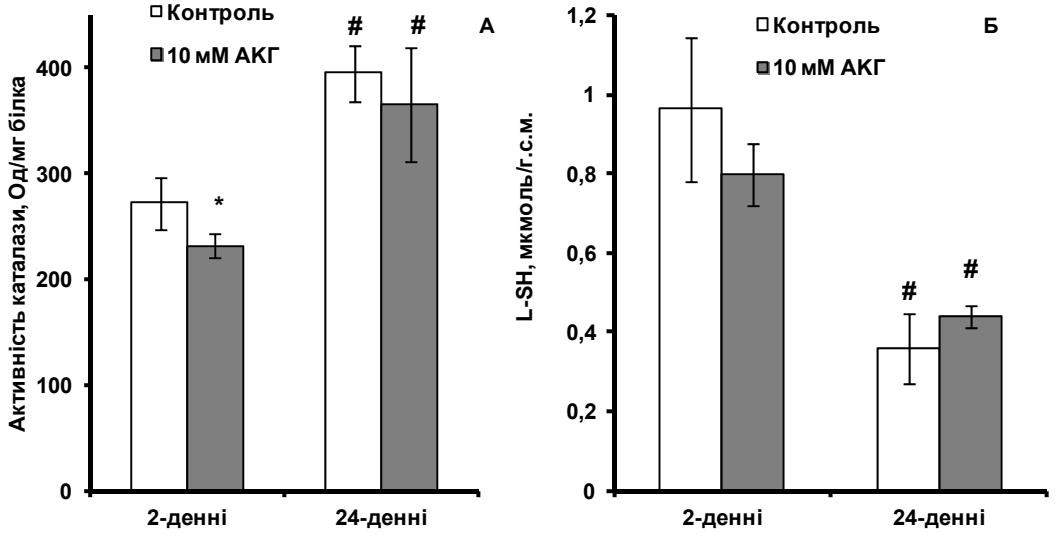


Рис. 3. Активність каталази (А) та вміст низькомолекулярних тіольних сполук (Б) у тілі самців лінії w^{1118}, вирощених на середовищі з АКГ

Примітки. # – відрізняється від відповідного значення у дводенних особин та * – від відповідного значення у контролі з $P < 0,05$, n=4-8.

Тому можна припустити, що АКГ може компенсувати частково зниження антиоксидантного захисту з віком та запобігати окисним пошкодженням. Щоб перевірити це припущення, ми визначили стійкість самців до низки стресорів, дія яких супроводжується розвитком оксидативного стресу.

Стійкість самців до теплового стресу знижувалась з віком та зі збільшенням температури обробки (рис. 4А). При цьому, 2-денні самці, вирощені на АКГ, впадали у теплову кому повільніше, ніж контрольні, при обробці температурою 41°С, тоді як 24-денні самці, які споживали їжу з АКГ, повільніше впадали у теплову кому при 40°С та 41°С. Разом з тим, АКГ не впливав на стійкість самців до пероксиду водню, менадіону та НПН (рис. 1Б), які є добре відомими індукторами оксидативного стресу [3; 10]. Раніше нами було показано, що АКГ діє як антиоксидант при сумісній обробці з токсикантами [3]. Тому можна припустити, що у самців, вирощених на АКГ, спожитий АКГ швидко метаболізується і обробка мух токсикантами, після того як мухи припинили споживати АКГ, не дає очікуваного позитивного ефекту. Щодо теплового стресу, то нещодавно було показано, що АКГ може стимулювати синтез білків теплового стресу [25]. Припускаємо, що даний механізм може бути задіяний у підвищенні стійкості самців, вирощених на АКГ, до теплового стресу.

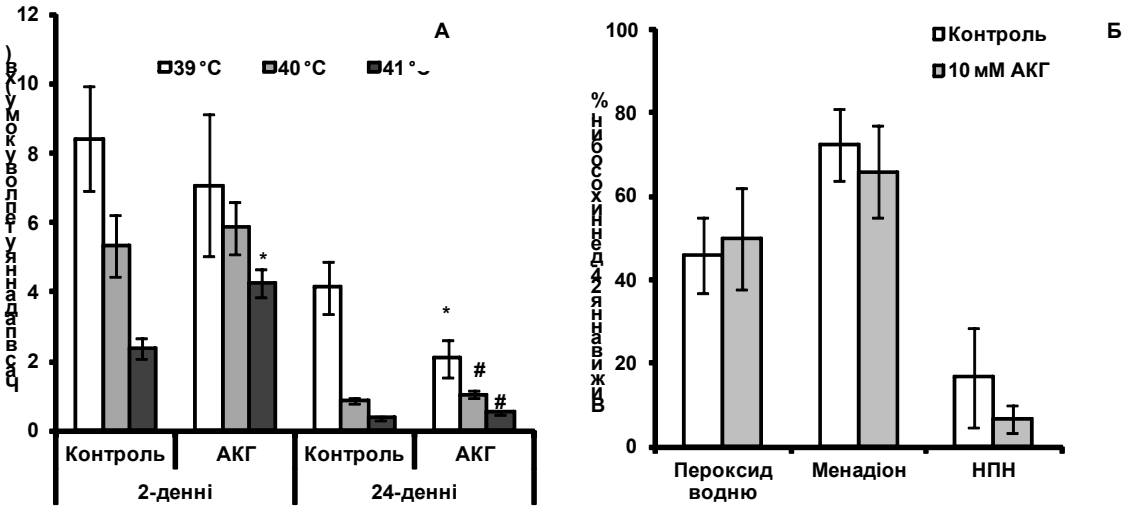


Рис. 4. Стійкість до теплового (А) та оксидативного (Б) стресів самців *лінії w[1118]*, вирощених на середовищі з АКГ

– відрізняється від відповідного значення у дводенних особин, *від відповідного значення у контролі з P < 0,05, n=3-4.

Висновки: Вирощування *D. melanogaster w[1118]* на середовищі з АКГ підвищує вміст амінокислот та білка у дводенних самців, але не впливає на ці показники у 24-денних самців. Дані результати є протилежними до таких, отриманих на самцях лінії Canton S. У 24-денних самців *w[1118]* харчовий АКГ призводить до збільшення вмісту триацилгліцеридів, що проте це не підвищує виживання мух за умов голодування. Харчовий АКГ суттєво не впливав на антиоксидантну систему самців молодого та старшого віку, і відповідно відмінностей у стійкості до оксидантів між контрольними та експериментальними самцями теж не знайдено. Водночас, вирощування на АКГ підвищує стійкість до теплового стресу в обох вікових групах та рухову індуковану активність самців старшого віку. Це свідчить про те, що захисні ефекти АКГ можуть реалізуватися через синтез спеціальних захисних білків, що потребує подальшого дослідження. На додаток, виявлені відмінності між лініями та статтями вказують на те, що анти-вікові ефекти АКГ не є загальними, а залежать від багатьох факторів, зокрема від фізіологічного стану та особливостей метаболізму визначеного організму.

Подяка. Автори висловлюють подяку 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

1. *Aebi H.* Catalase *in vitro* / *H. Aebi* // Meth. Enzymol., 1984. – Vol. 105. – P.121–126.

2. *Protein* and carbohydrate composition of larval food affects tolerance to thermal stress and desiccation in adult *Drosophila melanogaster* / L.H. Andersen, T.N. Kristensen, V. Loeschcke et al. // J. Insect. Physiol., 2010. – Vol. 56, N 4. – P. 336–340.

3. *Assessment* of antioxidant properties of alpha-keto acids *in vitro* and *in vivo* / M.M. Bayliak, M.P. Lylyk, O.M. Vytvytska et al. // Eur. Food Res. Technol., 2016. – Vol. 242, N 2. – P. 179–188.

4. *Dietary* alpha-ketoglutarate promotes higher protein and lower triacylglyceride levels and induces oxidative stress in larvae and young adults but not in middle-aged *Drosophila melanogaster* / M.M. Bayliak, M.P. Lylyk, H.V. Shmihel et al. // Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, 2017 –Vol. 204. – P.28–39.

5. *Bergman I.* New spectrophotometric method for the determination of proline in tissue hydrolyzates / I. Bergman, R. Loxley // Anal. Chem., 1970. – Vol. 42. – P. 702-706.

6. *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.

7. *Carroll N.V.* The determination of glycogen in liver and muscle by use of anthrone reagent / *N.V. Carroll, R.W. Longley, J.H. Roe* // J. Biol. Chem., 1956. – Vol. 220. – P. 583–593.

8. *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.

9. *Ellman G. L.* Tissue sulfhydryl groups / G. L. Ellman // Arch. Biochem. Biophys.,1959. – Vol. 82. – P. 70-77.

10. *Lifespan* extension and delay of age-related functional decline caused by *Rhodiola rosea* depends on dietary macronutrient balance / D.V. Gospodaryov, I.S. Yurkevych, O.V. Lushchak et al. // Longev. Healthspan, 2013. – Vol. 2, N 1. – P. 1-14, doi: 10.1186/2046-2395-2-5.

11. *Grotewiel M.S.* Functional senescence in *Drosophila melanogaster* / M.S. Grotewiel, I. Martin, P. Bhandari // Aging Res. – 2005.– Vol. 4. – P. 372–397.

12. *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.

13. *Intraduodenal* infusion of alpha-ketoglutarate decreases whole body energy expenditure in growing pigs / P. Junghans, M. Derno, S. Pierzynowski et al. //.Clin. Nutr., 2006. – Vol. 25, N 3. – P. 489-496.

14. *Kjellman V.* Addition of alphaketoglutarate to blood cardioplegia improves cardioprotection / V. Kjellman, K. Bjork, R. Ekroth // Ann. Thorac. Surg., 1997. – Vol. 63. – P. 1625–1634.

15. *Kowalski S.* Courtship song in *Drosophila melanogaster*: a differential effect on male–female locomotor activity / S. Kowalski, T. Aubin, J.R. Martin Can // J. Zool., 2004. – Vol. 82. – P. 1258–1266.

16. *Kurgalyuk N.M.* Effect of sodium α-ketoglutarate injected after the X-ray treatment on the respiration and oxidative phosphorylation of the liver's mitochondria / N.M. Kurgalyuk, O.V. Goryn // Fiziol. Zh., 2000. – Vol. 46, N 5. – P. 63–70.

17. *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.

18. *Lee Y.* An improved colorimetric determination of amino acids with the use of ninhydrin / Y. Lee, T. Takahashi // Anal. Biochem.,1966. – Vol. 14, Issue 1. – P. 71–77.

19. *Lushchak V.I.* Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification / V.I. Lushchak // Chem. Biol. Interact., 2014. – Vol. 224. – P. 164–175.

20. *Gender* differences of amino acid metabolism in *Drosophila melanogaster* on alpha-ketoglutarate-supplemented food / M.P. Lylyk, O.M. Sorochynska, O.V. Maniukh et al. // Visnyk of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series Problems of regulation of physiological functions, 2016. – Vol. 2, N 21. – P. 31-36.

21. *The tricarboxylic* acid cycle, an ancient metabolic network with a novel twist / R.J. Mailloux R. Bйriault J. Lemire et al. // PLoS ONE, 2007. – Vol. 2, N 8, e690. http://dx.doi.org/10.1371/ journal.pone.0000690.

22. *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.

23. *Salminen A.* 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., 2015. – Vol. 72, N 20. – P. 3897–3914.

24. *Schwimmer S.* Enzymatic development of pyruvic acid in onion as a measure of pungency / S. Schwimmer., W.J. Weston // J. AgricFood Chem., 1961. – Vol. 9. – P.301–304.

25. *Effects* of dietary α-ketoglutarate supplementation on the antioxidant defense system and HSP 70 and HSP 90 gene expression of hybrid sturgeon *Acipenser schrenckii* ♀ Ч *A. baerii* ♂ exposed to ammonia-N stress / L. Wang, Q. Xu, C. Wang et al. // Aquac. Res., 2016, doi:10.1111/are.13063.

26. *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., 2017. – Vol. 65, N 1. – P. 21–36.

References

1. Aebi H. Catalase *in vitro*. Methods Enzymol. 1984;105:121–6.

2. Andersen LH, Kristensen TN, Loeschcke V, Toft S, Mayntz D. Protein and carbohydrate composition of larval food affects tolerance to thermal stress and desiccation in adult *Drosophila melanogaster*. J Insect Physiol. 2010;56(4):336–40.

3. Bayliak MM, Lylyk MP, Vytvytska OM, Lushchak VI. Assessment of antioxidant properties of alpha-keto acids *in vitro* and *in vivo*. Eur Food Res. Technol. 2016;242 (2):179–88.

4. Bayliak MM, Lylyk MP, Shmihel HV, Sorochynska OM, Semchyshyn OI, Storey JM, et al. Dietary alpha-ketoglutarate promotes higher protein and lower triacylglyceride levels and induces oxidative stress in larvae and young adults but not in middle-aged *Drosophila melanogaster.* Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2017;204:28–39.

5. Bergman I, Loxley R. New spectrophotometric method for the determination of proline in tissue hydrolyzates. Anal Chem. 1970;42:702-6.

6. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72:248–54.

7. Carroll NV, Longley RW, Roe JH. The determination of glycogen in liver and muscle by use of anthrone reagent. J Biol Chem. 1956;220:583–93.

8. Chin RM, Fu X, Pai MY, Vergnes L, Hwang H, et al. The metabolite α-ketoglutarate extends lifespan by inhibiting ATP synthase and TOR. Nature. 2014;510(7505):397–401.

9. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. Arch Biochem Biophys. 1959;82:70–7.

10. Gospodaryov DV, Yurkevych IS, Lushchak OV, Lushchak VI. Lifespan extension and delay of age-related functional decline caused by *Rhodiola rosea* depends on dietary macronutrient balance. Longev Healthspan. 2013;2(1):1-14. doi: 10.1186/2046-2395-2-5.

11. Grotewiel MS, Martin I, Bhandari P. Functional senescence in *Drosophila melanogaster.* Aging Res. 2005;4:372-97.

12. Harrison AP, Pierzynowski SG. Biological effects of 2-oxoglutaratewith 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. J Physiol Pharmacol. 2008;59(Suppl 1):91–106.

13. Junghans P, Derno M, Pierzynowski S, Hennig U, Eberhard R, Souffrant WB. Intraduodenal infusion of alpha-ketoglutarate decreases whole body energy expenditure in growing pigs. Clin Nutr. 2006;25(3):489–96.

14. Kjellman V, Bjork K, Ekroth R. Addition of alphaketoglutarate to blood cardioplegia improves cardioprotection. Ann Thorac Surg. 1997;63:1625–34.

15. Kowalski S, Aubin T, Martin Can JR. Courtship song in *Drosophila melanogaster*: a differential effect on male–female locomotor activity. J Zool. 2004;82:1258–66.

16. Kurgalyuk NM, Goryn OV. Effect of sodium α-ketoglutarate injected after the X-ray treatment on the respiration and oxidative phosphorylation of the liver's mitochondria. Fiziol Zh. 2000;46(5):63–70.

17. Lambert BD, Filip R, Stoll B, Junghans P, Derno M, Hennig U, et al. First-pass metabolism limits the intestinal absorption of enteral alpha-ketoglutarate in young pigs. J Nutr. 2006;136:2779–84.

18. Lee Y, Takahashi T. An improved colorimetric determination of amino acids with the use of ninhydrin. Anal. Biochem. 1966;14(1):71–7.

19. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. Chem Biol Interact. 2014;224:164–75.

20. Lylyk MP, Sorochynska OM, Maniukh OV, Bayliak MM. Gender differences of amino acid metabolism in *Drosophila melanogaster* on alpha-ketoglutarate-supplemented food. Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series: Problems of physiological functions regulation. 2016;2(21):31–6.

21. Mailloux RJ, Bйriault R, Lemire J, Singh R, Chйnier DR, Hamel RD, et al. The tricarboxylic acid cycle, an ancient metabolic network with a novel twist. PLoS One. 2007;2(8). e690. doi: 10.1371/journal.pone.0000690.

22. Niemiec T, Sikorska J, Harrison A, Szmidt M, Sawosz E, Wirth-Dzieciolowska E, et al. Alpha-ketoglutarate stabilizes redox homeostasis and improves arterial elasticity in aged mice. J Physiol Pharmacol. 2011;62(1):37–43.

23. Salminen A, Kauppinen A, Kaarniranta K. 2-Oxoglutarate-dependent dioxygenases are sensors of energy metabolism, oxygen availability, and iron homeostasis: potential role in the regulation of aging process. Cell Mol Life Sci. 2015;72(20):3897–914.

24. Schwimmer S, Weston WJ. Enzymatic development of pyruvic acid in onion as a measure of pungency. J AgricFood Chem. 1961;9:301–4.

25. Wang L, Xu Q,Wang C, Li J, Chen D, Zhao Z, et al. Effects of dietary α-ketoglutarate supplementation on the antioxidant defense system and HSP 70 and HSP 90 gene expression of hybrid sturgeon *Acipenser schrenckii* ♀ Ч *A. baerii* ♂ exposed to ammonia-N stress. Aquac Res. 2016. doi: 10.1111/are.13063.

26. Zdzisicska B, Їurek A, Kandefer-Szerszec M. Alpha-ketoglutarate as a molecule with pleiotropic activity: well-known and novel possibilities of therapeutic use. Arch. Immunol Ther Exp. 2016;65(1):21–36.

Надійшла до редколегії 13.02.17

М. Лилик, асп., О. Сорочинская, асп., О. Манюх, асп., М. Байляк, канд. биол. наук,
ГВУЗ "Прикарпатский национальный университет имени Васыля Стефаныка", Ивано-Франковск, Украина

ВОЗРАСТНЫЕ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ *DROSOPHILA* ПРИ СОДЕРЖАНИИ НА СРЕДЕ С АЛЬФА-КЕТОГЛУТАРАТОМ

Исследованы некоторые метаболические показатели и показатели функционального старения у самцов плодовой мушки D. melanogaster w^{1118} за выращивание на среде с альфа-кетоглутаратом (АКГ). Пищевой АКГ повышал содержание аминокислот и белка в 2-дневных самцов и содержание триацилглицеридов в 24-дневных самцов без влияния на антиоксидантную систему самцов обеих возрастных групп. Также АКГ повышал устойчивость к тепловому стрессу в обеих возрастных группах, не влиял на устойчивость к оксидантам и предотвращал снижение двигательной активности самцов старшего возраста.

Ключевые слова: аминокислоты, триацилглицериды, тепловой стресс, локомоторная активность.

M. Lylyk, Ph. D. stud., O. Sorochynska, Ph. D. stud., O. Maniukh, Ph. D. stud., M. Bayliak, Ph. D.,
Vasyl Stefanyk Precarpathian National University, Ivano-Frankivsk, Ukraine

AGE-RELATED PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHANGES DROSOPHILA GROWN ON ALPHA-KETOGLUTARATE

In the work, certain metabolic parameters and parameters of functional senescence were studied in the fruit fly D. melanogaster w^{1118} males fed with alpha-ketoglutarate (AKG). Dietary increased levels of amino acids and protein in 2-day-old males and levels of triacylglycerols in 24-day-old

males with no effect on antioxidant system of males of both age groups. In addition, AKG-supplemented food increased resistance to heat stress but not to oxidants in both age groups and prevented the decline in locomotor activity in middle-aged males.

Keywords: amino acids, triacylglycerols, heat stress, locomotor activity.

УДК 577. 15.152: 466(043.5)

Н. Мотрук, соискатель
Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, Одесса, Украина

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ АКТИВНОСТИ КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМЫ ПРОТЕОЛИЗА В НОВООБРАЗОВАНИЯХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Исследована активность компонентов системы протеолиза нетрансформированной и опухолевой тканей молочной железы женщин разного возраста. Показано, что активность компонентов системы протеолиза существенно зависит как от возраста женщин, так и степени развития опухолевого процесса. Установлено, что активность α_1-антитрипсина детерминирована только возрастом женщин и не зависит от степени озлокачествления новообразований. Активность катепсин-D- и катепсин-L-подобных протеиназ, матриксной металлопротеиназы-2, трипсиноподобных протеиназ и карбоксипептидазы А детерминирована прогрессией опухоли и не зависит от возраста женщин.

Ключевые слова: протеолиз, молочная железа, опухоль, возраст женщин.

Введение. Возраст является одним из основных факторов, с которым связано развитие многих заболеваний, в том числе онкологических заболеваний молочных желез. Вероятность возникновения рака молочной железы прямо пропорционально повышается с возрастом [15]. Первый пик заболеваемости приходится на репродуктивный период от 30 до 40 лет [10], а наибольшая смертность регистрируется у женщин в возрасте 40-59 лет [5]. В последнее время отмечается тенденция к увеличению заболеваемости доброкачественными новообразованиями молочной железы, которые диагностируются у каждой 4-й женщины в возрасте до 30 лет. У женщин старше 50 лет патология молочных желез выявляется в 60 % случаев [11,13].

Разнообразные метаболические изменения, возникающие в процессе образования и развития опухоли, в большинстве случаев сопровождаются изменением спектра активности протеолитических ферментов: сериновых протеиназ [17,21], катепсинов [29,24,25], металлопротеиназ [18,22], а также их эндогенных ингибиторов [27, 23]. Агрессивность клеток новообразований различного гистогенеза и способность опухолей к метастазированию характеризуется повышением активности протеаз, активность которых регулируется специфическими эндогенными ингибиторами [28, 30]. Определяющее значение для протекания реакций протеолитического расщепления имеет нарушение баланса между уровнем протеаз и их ингибиторов.

Цель работы состояла в изучении активности компонентов системы протеолиза в неизмененной и опухолевой ткани молочной железы женщин разного возраста.

Материалы и методы. В ходе работы были исследованы образцы резецированной в ходе оперативного вмешательства ткани новообразований молочной железы женщин, которые не получали до операции медикаментозное лечение. Материал для исследования был предоставлен сертифицированной патоморфологической лабораторией Одесского областного онкологического диспансера. Патоморфологическая и гистологическая верификация диагнозов была проведена по требованиям ВОЗ [31] сертифицированной и лицензированной патоморфологической лабораторией Одесского областного онкологического диспансера с определением морфологического состояния и степени дифференцировки опухолевой ткани (согласно договора о совместных исследованиях).

Взятие анатомического материала для исследований проводилось медицинским учереждением с соблюдением этических и правовых норм с соблюдением этических и правовых норм: Хельсинской декларации 1964 г., Конвенции о защите прав и достоинств человека в связи с использованием достижений биологии и медицины (Конвенция о правах человека и биомедицине 1996 г.), закона Украины "О трансплантации органов и других анатомических материалов человеку" 1999 г.

Образцы тканей замораживали при -18 °С непосредственно после оперативного вмешательства. Ткань молочной железы гомогенизировали в дистиллированной воде (в соотношении 1 : 10) с последующим центрифугированием при 9000 g в минуту при +4^{o}С в течение 45 мин.

В супернатанте образцов инфильтративного протокового рака (ИПР) и доброкачественных новообразований молочной железы (фиброзно-кистозная мастопатия, фиброаденома, листовидная опухоль) определяли содержание белка по Лоури [20] и активность катепсин-D-подобных протеиназ по Ансону [12], катепсин-L-подобных протеиназ по Черной в модификации Вовчук [2], трипсиноподобных протеиназ по Кунитцу в модификации Веремеенко [1], альфа$_1$-антитрипсина по Веремеенко в модификации Левицкого [7]. Активность матриксной металлопротеиназы-2 (ММП-2) по методу Вовчук [9], карбоксипептидазы А методу Коштария [19], с детекцией свободной аминокислоты нингидриновым методом по Олешко [8]. Удельную активность ферментов выражали в микромолях или наномолях аминокислоты в минуту на мг белка, активность альфа$_1$-антитрипсина – в условных единицах (1 единица соответствует 1 мкг инактивированного кристаллического трипсина).

В качестве контроля были исследованы прилегающие к опухоли ткани, в которых по данным гистоморфологического исследования было подтверждено отсутствие атипичных клеток.

Статистическую обработку результатов проводили по Манну – Уитни [6].

Результаты и их обсуждение. В неизмененной ткани молочной железы нами не было выявлено достоверных возрастных изменений активности катепсин-D-подобных протеиназ (табл.1).

© Мотрук Н., 2017

***Таблица* 1. Активность компонентов системы протеолиза в нетрансформированных тканях молочной железы в разные физиолого-возрастные периоды женщин**

Физиолого-возрастные периоды	Катепсин D-подобные протеиназы (мкмоль тирозина в мин на мг белка)	Катепсин L-подобные протеиназы (нмоль тирозина в мин на мг белка)	Трипсино-подобные протеиназы (мкмоль тирозина в мин на мг белка)	Ингибитор трипсина (у.е.)	ММП-2 (мкмоль глицина в мин на мг белка)	Карбокси-пептидаза А (мкмоль фенилаланина в мин на мг белка)
Репродуктивный период 31-40 лет (n = 12)	2,00 ± 0,19	0,27 ± 0,03	0,70 ± 0,06	4,99 ± 0,47	222,39 ± 20,43	2,30 ± 0,21
Поздний репродуктивный период 41-50 лет (n = 15)	1,26 ± 0,11↓	0,28 ± 0,03	4,66 ± 0,44↑	3,91 ± 0,36	181,61 ± 17,25	1,91 ± 0,16
Менопаузальный период 51-60 лет (n = 17)	1,46 ± 0,12	0,19 ± 0,02↓	0,45 ± 0,04↓	4,48 ± 0,42	275,03 ± 26,13	1,74 ± 0,14
Климактерический период 61-70 лет (n = 15)	1,46 ± 0,13	0,31 ± 0,03	10,51 ± 0,91↑	3,25 ± 0,28↓	333,33 ± 31,67↑	2,07 ± 0,18

Примечание: n – количество исследуемых образцов тканей; ↑,↓ – онтогенетические различия активности компонентов системы протеолиза по отношению к репродуктивному периоду (31–40 лет); P < 0, 05.

При наличии доброкачественного процесса в молочной железе активность катепсин-D-подобных протеиназ, по сравнению с тканью без новообразований, была в 2,52 – 2,80 раза выше у женщин в возрасте старше 50 лет и снижалась у женщин после 60 лет (табл. 2). По сравнению с неизмененной тканью и доброкачественными новообразованиями, наличие злокачественного процесса в ткани молочной железы характеризовалось повышением активности катепсин-D-подобных протеиназ в 4,84 – 6,59 раза (в пределах сравниваемых возрастных групп) и уменьшалась с увеличением возраста женщин (табл. 3). В тканях доброкачественных новообразований молочной железы максимальная активность фермента была установлена у женщин в возрасте 41-60 лет (табл. 2), а при злокачественном процессе – у женщин возрасте 31-40 лет (табл. 3).

Активность катепсин-L-подобных ферментов в неизмененной ткани молочной железы не изменялась у женщин репродуктивного возраста и была минимальной у женщин в возрасте 51-60 лет (табл.1). В тканях доброкачественных новообразований молочной железы активность катепсин-L-подобных протеиназ незначительно повышалась во всех возрастных группах, по сравнению с неизмененной тканью молочной железы у женщин этого же возраста (табл. 2). Наличие злокачественного процесса характеризовалось незначительным повышением активности катепсин-L-подобных протеиназ во всех возрастных группах по сравнению с неизмененной тканью молочной железы. По сравнению с доброкачественными новообразованиями молочной железы, при злокачественном процессе увеличение активности фермента в 1,26 – 2,05 раза было установлено у женщин в возрасте 31 – 40 и 61 – 70 лет (табл. 3).

***Таблица* 2. Активность компонентов системы протеолиза в тканях доброкачественных новообразований молочной железы в разные физиолого-возрастные периоды женщин**

Физиолого-возрастные периоды	Катепсин D-Подобные протеиназы (мкмоль тирозина в мин на мг белка)	Катепсин L-подобные протеиназы (нмоль тирозина в мин на мг белка)	Трипсино-подобные протеиназы (мкмоль тирозина в мин на мг белка)	Ингибитор трипсина (у.е.)	ММП-2 (мкмоль глицина в мин на мг белка)	Карбокси-пептидаза А (мкмоль фенилаланина в мин на мг белка)
Репродуктивный период 31-40 лет (n = 22)	1,13 ± 0,09 *	0,34 ± 0,04	5,87 ± 0,56 *	3,18 ± 0,27 *	191,47 ± 18,19	2,07 ± 0,18
Поздний репродуктивный период 41-50 лет (n = 55)	3,17 ± 0,28 ↑*	0,32 ± 0,03	9,09 ± 0,86 ↑ *	2,92 ± 0,28	654,02 ± 61,28 ↑*	2,70 ± 0,23
Менопаузальный период 51-60 лет (n = 12)	4,09 ± 0,37↑ *	0,39 ± 0,04 *	3,17 ± 0,30 ↓ *	3,33 ± 0,32	109,09 ± 10,36 ↓*	2,71 ± 0,25 *
Климактерический период 61-70 лет (n = 10)	1,27 ± 0,11	0,31 ± 0,03	0,92 ± 0,08 ↓ *	5,37 ± 0,51 ↑*	150,00 ± 14,25 *	3,23 ± 0,30 ↑ *

Примечание: n – количество исследуемых образцов тканей; ↑,↓ – онтогенетические различия активности компонентов системы протеолиза по отношению к репродуктивному периоду (31-40 лет);
P < 0, 05; * – достоверные отличия по отношению к показателям ткани молочной железы без новообразований в пределах одной возрастной группы

В нетрансформированной ткани молочной железы наименьшая активность трипсиноподобных протеиназ на фоне высокой активности α_1-антитрипсина выявлена у женщин в возрасте 51 – 60 лет (табл. 1). По сравнению с неизмененной тканью наличие доброкачественного процесса в молочной железе сопровождалось значительным, в 1,95 – 8,39 раза, увеличением активности трипсиноподобных протеиназ у женщин в возра-

сте 31 – 60 лет и максимальной активностью фермента у женщин в возрасте 41-50 лет (табл. 2). Следует отметить, что повышение активности трипсиноподобных протеиназ происходило на фоне снижения активности их эндогенного ингибитора α_1-антитрипсина.

Возрастные особенности активности трипсиноподобных ферментов в тканях злокачественных новообразований молочной железы проявились в максимальной активности фермента в опухолевой ткани молочной железы у женщин в возрасте 51 – 60 лет (табл. 3). Наличие доброкачественного или злокачественного процесса в ткани молочной железы у женщин старше 60 лет характеризовалось снижением активности трипсиноподобных протеиназ на фоне высокой активности α_1-антитрипсина.

По сравнению с женщинами репродуктивного возраста (31 – 40 лет) активность ММП-2 в неизмененной ткани молочной железы была выше у женщин в возрасте 61 – 70 лет и ниже у женщин в возрасте 41 – 50 лет (табл. 1). По сравнению с неизмененной тканью молочной железы наличие доброкачественного процесса, наоборот, характеризовалось максимальным увеличением активности ММП-2 у женщин в возрасте 41 – 50 лет и снижением активности фермента у женщин старше 60 лет (табл. 2). Возрастные особенности активности ММП-2 при злокачественном процессе в молочной железе проявились в максимальной активности фермента у женщин в возрасте 31 – 40 лет и 51 – 60 лет (табл. 3). По сравнению с активностью ММП-2 в неизмененной ткани молочной железы, в ткани ИПР активность фермента была выше у женщин того же возраста и достигала максимума у женщин в возрасте 31 – 40 лет и 51 – 60 лет (табл. 3). Полученные результаты не совпадают с исследованиями активности ММП-2 в опухолях в яичников [4], что свидетельствует о специфичности онтогенетических изменений активности ММП-2 в новообразований молочной железы.

***Таблица* 3. Активность компонентов системы протеолиза в тканях злокачественных новообразований молочной железы в разные физиолого-возрастные периоды женщин**

Физиолого-возрастные периоды	Катепсин D-подобные протеиназы (мкмоль тирозина в мин на мг белка)	Катепсин L-Подобные протеиназы (нмоль тирозина в мин на мг белка)	Трипсино-подобные протеиназы (мкмоль тирозина в мин на мг белка)	Ингибитор трипсина (у.е.)	ММП-2 (мкмоль глицина в мин на мг белка)	Карбокси-пептидаза А (мкмоль фенилаланина в мин на мг белка)
Репродуктивный период 31-40 лет (n = 9)	13,17 ± 1,20 *	0,50 ± 0,06 *	1,24 ± 0,10 *	2,68 ± 0,25 *	690,99 ± 65,64 *	2,83 ± 2,67
Поздний репродуктивный период 41-50 лет (n = 14)	13,12 ± 1,20 *	0,36 ± 0,03	4,76 ± 0,43 ↑	1,23 ± 0,14 ↓ *	488,66 ± 46,42 ↓*	4,06 ± 0,38 ↓ *
Менопаузальный период 51-60 лет (n = 38)	7,06 ± 0,67 ↓ *	0,38 ± 0,03 ↓ *	6,58 ± 0,63 ↑ *	1,90 ± 0,18 *	679,54 ± 64,56 *	2,57 ± 0,23 *
Климактерический период 61-70 лет (n = 15)	2,27 ± 0,20 ↓ *	0,41 ± 0,03 ↓	2,83 ± 0,26 ↑ *	4,71 ± 0,44 ↑	499,43 ± 47,45 ↓*	2,95 ± 0,26

Примечание: n – количество исследуемых образцов тканей; ↑,↓ – онтогенетические различия активности компонентов системы протеолиза по отношению к репродуктивному периоду (31-40 лет);

P < 0, 05; * – достоверные изменения по отношению к показателям ткани молочной железы без новообразований в пределах одной возрастной группы

Активность карбоксипептидазы А в ткани молочной железы без новообразований незначительно снижалась (табл. 1), а в доброкачественных новообразованиях – повышалась по мере увеличения возраста женщин (табл. 2). Достоверное повышение активности карбоксипептидазы А в тканях злокачественных новообразований в 2,13 раза было выявлено только у женщин в возрасте 41 – 50 лет (табл. 3), что совпадает с исследованиями активности карбоксипептидазы А в опухолях яичника [2].

Установленное нами повышение активности исследованных протеолитических ферментов может быть обусловлено различными метаболическими нарушениями в организме женщин, происходящими при опухолеобразовании, влиянием гормонов [14], факторов роста [27], цитокинов [16] и др. Эти нарушения могут приводить к снижению синтеза ингибиторов, в следствие чего повышается активность регулируемых ими ферментов. Также возможно, что количество синтезируемого ингибитора является недостаточным для подавления избыточной активации протеолиза или ингибитор, синтезируемый тканью новообразований является не специфичным по отношению к ферментам опухоли.

Выявленные нами изменения во взаимосвязи между компонентами системы протеолиза в доброкачественных и злокачественных новообразованиях молочной железы женщин различных возрастных групп позволили нам предположить наличие причинно-следственных связей между озлокачествлением ткани молочной железы и возрастом женщин. Расчет влияния этих факторов проводили с помощью двух факторного дисперсионного анализа с повторением. В качестве независимых переменных были определены: А – возраст женщин, который определяли по анамнезу, В – прогрессию опухоли. За нулевую точку отсчета принимали активность компонентов системы протеолиза в ткани молочной железы без новообразований, изменения активности компонентов системы протеолиза при доброкачественных и злокачественных новообразованиях рассматривали как последующие этапы озлокачествления опухоли. Зависимой переменной была активность компонентов системы протеолиза ткани молочной железы.

В результате проведенных исследований были установлены коэффициенты детерминации активности компонентов протеолитической системы от независимых факторов. Изменение активности катепсин-D-подобных протеиназ ткани молочной железы было на

21,3 % детерминировано возрастом женщин и на 48 % озлокачествлением новообразований, а взаимодействие независимых факторов обеспечивало 30,6 % активности фермента.

Изменение активности катепсин-L-подобных ферментов на 62,4 % было детерминировано фактором озлокачествления опухоли. Влияние возраста женщин и взаимодействие независимых факторов на активность данного фермента составили 12,2 % и 24 %, соответственно.

Влияние возраста на активность трипсиноподобных протеиназ было значительно ниже F-критерия, поэтому влияние независимой переменной – возраста женщин на активность этого фермента было недостоверным. По данным дисперсионного анализа активность трипсиноподобных ферментов существенно зависела от суммарного влияния независимых факторов – 73,3 % и была мало детерминирована возрастом женщин – 26,4 %.

Влияние фактора возраста женщин на активность эндогенного ингибитора трипсина было наибольшим – 41,6 %. Степень озлокачествления новообразования оказывала меньшее влияние – 26,8 %, а сочетанное влияние обоих факторов составило 31,0 %.

Достоверно значимого влияния возраста на активность ММП-2 не установлено. Коэффициент детерминации озлокачествления новообразования составил 52,4 %, а взаимное влияния факторов – 41,8 %.

Активность карбоксипептидазы А в меньшей степени (12,5 %) зависела от возраста женщин. Более значительное влияние на активность фермента оказывало озлокачествление новообразования – 50 %, а коэффициент детерминации сочетанного влияние факторов составил 36,0 %.

Анализ полученных результатов позволил выделить 2 группы ферментов, активность которых детерминирована либо возрастом женщин, либо фактором озлокачествления.

К первой группе принадлежит ингибитор трипсина, активность которого детерминирована только возрастом женщин и не зависит от степени озлокачествления новообразований.

Вторую группу составили ферменты: катепсин-D- и катепсин-L-подобные протеиназы, матриксная металлопротеиназа-2, трипсиноподобные протеиназы и карбоксипептидаза А, активность которых детерминирована степенью озлокачествления и не зависит от возраста женщин.

Выводы:

1. В нетрансформированной ткани молочной железы максимальная активность катепсин-D-подобных протеаз и карбоксипептидазы А установлена у женщин в репродуктивный возрасте (31 – 40 лет), а трипсиноподобных протеиназ, катепсин-L-подобных протеиназ и ММП-2 – у женщин в климактерическом возрасте (61 – 70 лет).

2. В ткани доброкачественных новообразований молочной железы у женщин в возрасте 41 – 50 лет установлена максимальная активность трипсиноподобных протеиназ и ММП-2, на фоне низкого содержания альфа-1-антитрипсина, а у женщин в возрасте 51 – 60 лет – максимальная активность катепсин-D-подобных и катепсин-L-подобных протеиназ. У женщин в климактерическом возрасте (61 – 70 лет) установлена максимальная активность карбоксипептидазы А и альфа-1-антитрипсина на фоне минимальной активности трипсиноподобных протеиназ.

3. В ткани злокачественных новообразований молочной железы у женщин в возрасте 31 – 40 лет установлена максимальная активность катепсин-D-подобных, катепсин-L-подобных протеиназ и ММП-2, а у женщин в возрасте 41–50 – максимальная активность катепсин-D-подобных на фоне низкого содержания альфа-1-антитрипсина. У женщин в менопаузальном возрасте (51–60 лет) установлена максимальная активность трипсиноподобных протеиназ, а у женщин в возрасте 61–70 лет установлена максимальное содержание альфа-1-антитрипсина.

4. По результатам дисперсионного анализа активность альфа-1-антитрипсина детеминирована возрастом женщин и не зависит от степени озлокачествления клеток новообразований.

Список использованных источников

1. *Веремеенко К.Н.* α_1-ингибитор протеиназ и его исследования в клинике / К.Н. Веремеенко // Клин. медицина, 1985. – Т. 63, № 2. – С. 21 – 27.
2. *Вовчук И.Л.* Активность тканевых катепсин- L-подобных протеиназ у женщин с онкопатологией тела матки / И.Л. Вовчук, С.С. Чернадчук // Укр. Биохим. Журн., 2004. – Т. 76, № 2. – С. 56 – 60.
3. *Вовчук І.Л.* Активність карбоксипептидази А в новоутвореннях яєчника / І.Л. Вовчук // Вісник ОНУ, 2005. – Т. 10, вип. 5. – С. 36-41.
4. *Вовчук И.Л.* Активность металлопротеиназы (ММП–2) в тканях новообразований яичников женщин / И.Л. Вовчук, С.А. Петров // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія, 2007. – № 2. – С. 92–97.
5. *Заридзе Д.Г.* Эпидемиология рака молочной железы / Д.Г. Заридзе, Т.Х. Мень // Рос. онкол. журн., 2000. – № 5. – С. 5–14.
6. *Лапач С.Н.* Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel : 2-е изд., перераб. и доп. / С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич. – К. : МОРИОН, 2001. – 408 с.
7. *Левицкий А.П.* Методы определения ингибиторов трипсина. Биохимические методы исследования селекционного материала / А.П. Левицкий // Сб. науч. тр. – Одесса : ВСГИ, 1979. – Вып. XV. – С. 68–72.
8. *Разработка* унифицированной методики количественного определения суммы свободных аминокислот в лекарственном растительном сырье и экстракционных препаратах / Г.И. Олешко, Т.И. Ярыгина, Е.В. Зорина, М.Д. Решетникова // Фармация, 2011. – № 3. – С. 14–17.
9. *Патент* № 46633 Україна, МПК (2009), C12N 9/50, C12N 9/64. Спосіб визначення активності матриксної металопротеїнази-2 / І.Л. Вовчук ; заявник та патентодержатель Вовчук І.Л. – № u 2009 08087 ; заявл. 31.07.2009 ; опубл. 25.12.2009. Бюл. № 24.
10. *Сидоренко Л.Н.* Молочная железа. Как уберечь себя от рака. / Л.Н. Сидоренко // СПб : Фолио пресс, 1998. – 704 с.
11. *Тагиева Т.Т.* Доброкачественные заболевания молочных желез у женщин позднего репродуктивного возраста: возможности трансдермальной гестагенной терапии / Т.Т. Тагиева // Гинекология, 2005. – Т. 4, № 7. – С. 284–289.
12. *Anson M.L.* The estimation of pepsin with hemoglobin / M.L. Anson, A.E. Mirsky // J. Gen. Physiol., 1932. – Vol. 16, № 1. – P. 59–67.
13. *Benign* breast lesions in Eastern Nigeria / A. Anyikam, M.A. Nzeqwu, B.C. Ozumba et all. // Saudi Med. J., 2008. – Vol. 29, № 2. P. 241–244.
14. *Regulation* of matrix metalloproteinase-9 / gelatinase B expression and activation by ovarian steroids and LEFTY-A / endometrial bleeding-associated factor in the human endometrium / P.B. Cornet, C. Galant, Y. Eeckhout et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab., 2005. – Vol. 90, № 2. – P. 1001–1011.
15. *Gabriel C.A.* Breast cancer in young women / C.A. Gabriel, S.M. Domchek // Breast Cancer Research., 2010. – Vol. 12, № 5. – P. 212–222.
16. *Expression* of cathepsins B and L in human lung epithelial cells is regulated by cytokines / A. Gerber, T. Welte, S. Ansorge et all. // Adv. Exp. Med. Biol., 2000. -Vol. 477. – P. 287 – 292.
17. *Differential* expression of trypsinogen and tumor-associated trypsin inhibitor (TATI) in bladder cancer / K. Hotakainen, A. Bjartell, A. Sankila et al. // Int. J. Oncol., 2006. – Vol. 28, № 1. – P. 95 – 101.
18. *Expression* of matrix metalloproteinases-9, 2, 7 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1, 2, 3 mRNA in ovarian tumors and their clinical significance / X.X. Hu, L. Li, D.R. Li et al. // Ai Zheng., 2004. – Vol. 23, № 10. – P. 1194 – 1198.
19. *Khoshtariya D.E.* Substrate specificity of solvent viscosity effects in carboxypeptidase A catalyzed peptide hydrolysis / D.E. Khoshtariya, J.M. Hammerstad-Pedersen, J. Ulstrap // Biochimica et Biophysica Acta (BBA), 1991. – V. 1076, (3). – P. 359–363.
20. *Protein* measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, D.E. Khoshtariya, J.M. Hammerstad-Pedersen, J. Ulstrap // J. Biol. Chem., 1951. – Vol. 193. – P. 265 – 275.
21. *Human* tissue kallikrein 5 is a member of a proteolytic cascade pathway involved in seminal clot liquefaction and potentially in prostate cancer progression / I.P. Michael, G. Pampalakis, S.D. Mikolajczyk et al. // J. Biol. Chem., 2006. – Vol. 281, № 18. – P. 12743 – 12750.
22. *Expression* of metalloproteinase-2, metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in transitional cell carcinoma of upper urinary tract: correlation with tumor stage and survival / Y. Miyata, S. Kanda, K. Nomata et al. // Urology, 2004. – Vol. 63, № 3. – P. 602 – 608.

23. *Nishino N.* The significance of determination of urinary trypsin inhibitor related antigen in tients with cancer of the digestive organs / N. Nishino // Nippon Gan Chiryo Gakkai Shi., 1990. – Vol. 25, № 3. – P. 603 – 612.

24. *Clinical* significance of cathepsin D concentration in tumor cytosol of primary breast cancer / J. Rodriguez, J. Vazquez, M. D. Corte et al. // Int. J. Biol. Markers, 2005. – Vol. 20, № 2. – P. 103 – 111.

25. *Cathepsins* B and L and their inhibitors stefin B and cystatin C as markers for malignant progression of benign meningiomas / M. Trinkaus, A. Vranic, Vol. V. Dolenc et al. // Int. J. Biol. Markers, 2005. – Vol. 20, № 1. – P. 50 – 59.

26. *Troll W.* Protease inhibitors as anticarcinogens / W. Troll, K. Frenkel, R. Wiesner // J. Nat. Cancer Inst., 1984. – 73, № 8. – P. 1245–1250.

27. *Nicotine* induces cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor receptor-2 in association with tumor-associated invasion and angiogenesis in gastric cancer / V.Y. Shin, W.K. Wu, K.M. Chu et al. // Mol. Cancer Res., 2005. – Vol. 3, № 11. – P. 607 – 615.

28. *Co-expression* of trypsin and tumour-associated trypsin inhibitor (TATI) in colorectal adenocarcinomas / S. Solakidi, D.G. Tiniakos, K. Petraki et al. // Histol. Histopathol., 2003. – Vol. 18, № 4. – P. 1181 – 1188.

29. *Expression* of cathepsins B, H, and L and their inhibitors as markers of transitional cell carcinoma of the bladder / A. Staack, D. Tolic, G. Kristiansen et al. // Urology, 2004. – Vol. 63, № 6. – P. 1089 – 1094.

30. *High* tissue expression of tumour-associated trypsin inhibitor (TATI) associates with a more favourable prognosis in gastric cancer / J.P. Wiksten, J. Lundin, S. Nordling et all. // Histopathology, 2005. – Vol. 46, № 4. – P. 380 – 388.

26. *World* Health Organization Classification of Tumors / F.A. Tavassoli, P. Devilee et al. // Pathology and Genetics of Tumors of the Breast and Female Genital Organs. – Lion : IARCPress, 2003. – 432 p.

References

1. Veremeenko K.N. α1-ingibitor proteinaz i ego issledovanija v klinike / Veremeenko K.N.// Klin. medicina. – 1985. – T. 63, ΄H 2. – S. 21 – 27.

2. Vovchuk I.L. Aktivnost' tkanevyh katepsin- L-podobnyh proteinaz u zhenshhin s onkopatologiej tela matki / Vovchuk I.L., CHernadchuk S.S. // Ukr. Biohim. ZHurn.- 2004. – T. 76, ΄H 2. – S. 56 – 60.

3. Vovchuk ².L. Aktivn³st' karboksipeptidazi A v novoutvorennjah ja΄lchnika / Vovchuk I.L. // Visnik ONU. – 2005. – T. 10, vip. 5. – S. 36-41.

4. Vovchuk I.L. Aktivnost' metalloproteinazy (MMP–2) v tkanjah novoobrazovanij jaichnikov zhenshhin / Vovchuk I.L., Petrov S.A. // Eksperimental'na ta klinichna biologiay ta biohimiya. – 2007. – ΄H 2. – S. 92–97.

4. Zaridze D.G. JEpidemiologija raka molochnoj zhelezy / Zaridze D.G., Men' T.H. // Ros. onkol. zhurnal. – 2000. – ΄H 5. – S. 5 – 14.

5. Lapach S.N. Statisticheskie metody v mediko-biologicheskih issledovanijah s ispol'zovaniem Ehcel : 2-e izd., pererab. i dop. / Lapach S.N., CHubenko A.V., Babich P.N. // K. : MORION, 2001. – 408 s.

6. Levickij A.P. Metody opredelenija ingibitorov tripsina. Biohimicheskie metody issledovanija selekcionnogo materiala / Levickij. A.P. // Sbornik nauchnyh trudov. – Odessa: VSGI, 1979. – Vyp. HV. – S. 68 – 72.

7. Oleshko G.I. Razrabotka unificirovannoj metodiki kolichestvennogo opredelenija summy svobodnyh aminokislot v lekarstvennom rastitel'nom syr'e i jekstrakcionnyh preparatah / Oleshko G.I., JArygina T.I., Zorina E.V., Reshetnikova M.D. // Farmacija. – 2011. – ΄H 3. – S. 14 – 17.

8. Pat. ΄H 46633 Ukraina, MPK (2009), C12N 9/50, C12N 9/64. Sposob viznachennja aktivnosti matriksnoy metaloproteinazu-2 / Vovchuk L. ; zajavnik ta patentoderzhatel' Vovchuk L. – № 2009 08087 ; zajavl. 31.07.2009 ; opubl. 25.12.2009

9. Sidorenko L.N. Molochnaja zheleza. Kak uberech' sebja ot raka. / Sidorenko L.N. // SPb: Folio press, 1998. – 704 s.

10. Tagieva T.T. Dobrokachestvennye zabolevanija molochnyh zhelez u zhenshhin pozdnego reproduktivnogo vozrasta: vozmozhnosti transdermal'noj gestagennoj terapii / Tagieva T.T. // Ginekologija. – 2005. – T.4, ΄H7. – S. 284 – 289.

11. Anson M.L. The estimation of pepsin with hemoglobin / Anson M.L., Mirsky A.E. // J. Gen. Physiol. – 1932. – Vol. 16, № 1. – P. 59 – 67.

12. Anyikam A. Benign breast lesions in Eastern Nigeria / Anyikam A., Nzeqwu M.A., Ozumba B.C. et all. // Saudi Med. J. – 2008. – Vol. 29, № 2. P. 241 – 244.

13. Cornet P.B. Regulation of matrix metalloproteinase-9 / gelatinase B expression and activation by ovarian steroids and LEFTY-A / endometrial bleeding-associated factor in the human endometrium / Cornet P.B., Galant C., Eeckhout Y. et all. // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2005. – Vol. 90, № 2. – P. 1001 – 1011.

14. Gabriel C.A. Breast cancer in young women / Gabriel C.A., Domchek S.M. // Breast Cancer Research. – 2010. – Vol. 12, № 5. – P. 212 – 222.

15. Gerber A. Expression of cathepsins B and L in human lung epithelial cells is regulated by cytokines / Gerber A., Welte T., Ansorge S. et all. // Adv. Exp. Med. Biol. – 2000. – Vol. 477. – P. 287 – 292.

16. Hotakainen K. Differential expression of trypsinogen and tumor-associated trypsin inhibitor (TATI) in bladder cancer / Hotakainen K., Bjartell A., Sankila A. et all. // Int. J. Oncol. – 2006. – Vol. 28, № 1. – P. 95 – 101.

17. Hu X.X. Expression of matrix metalloproteinases-9, 2, 7 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1, 2, 3 mRNA in ovarian tumors and their clinical significance / Hu X.X., Li L., Li D.R. et all. // Ai Zheng. – 2004. – Vol. 23, № 10. – P. 1194 – 1198.

18. Khoshtariya D.E. Substrate specificity of solvent viscosity effects in carboxypeptidase A catalyzed peptide hydrolysis / Khoshtariya D.E., Hammerstad-Pedersen J.M., Ulstrap J. // Biochimica et Biophysica Acta (BBA). – 1991. – V. 1076, (3). – P. 359-363.

19. Lowry O.H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / Khoshtariya D.E., Hammerstad-Pedersen J.M., Ulstrap J. // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193. – P. 265 – 275.

20. Michael I.P. Human tissue kallikrein 5 is a member of a proteolytic cascade pathway involved in seminal clot liquefaction and potentially in prostate cancer progression / Michael I.P., Pampalakis G., Mikolajczyk S.D. et all. // J. Biol. Chem. – 2006. – Vol. 281, № 18. – P. 12743 – 12750.

21. Miyata Y. Expression of metalloproteinase-2, metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in transitional cell carcinoma of upper urinary tract: correlation with tumor stage and survival / Miyata Y., Kanda S., Nomata K. et all. // Urology. – 2004. – Vol. 63, № 3. – P. 602 – 608.

22. Nishino N. The significance of determination of urinary trypsin inhibitor related antigen in tients with cancer of the digestive organs / Nishino N. // Nippon Gan Chiryo Gakkai Shi. – 1990. – Vol. 25, № 3. – P. 603 – 612.

23. Rodriguez J. Clinical significance of cathepsin D concentration in tumor cytosol of primary breast cancer / Rodriguez J., Vazquez J., Corte M. D. et all. // Int. J. Biol. Markers. – 2005. – Vol. 20, № 2. – P. 103 – 111.

24. Trinkaus M. Cathepsins B and L and their inhibitors stefin B and cystatin C as markers for malignant progression of benign meningiomas / Trinkaus M., Vranic A., Dolenc Vol. V. et all. // Int. J. Biol. Markers. – 2005. – Vol. 20, № 1. – P. 50 – 59.

25. Troll W. Protease inhibitors as anticarcinogens / Troll W., Frenkel K., Wiesner R. // J. Nat. Cancer Inst. – 1984. – 73, № 8. – P. 1245–1250.

26. Shin V. Y. Nicotine induces cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor receptor-2 in association with tumor-associated invasion and angiogenesis in gastric cancer / Shin V. Y., Wu W. K., Chu K. M. at ell. // Mol. Cancer Res. – 2005. – Vol. 3, № 11. – P. 607 – 615.

27. Solakidi S. Co-expression of trypsin and tumour-associated trypsin inhibitor (TATI) in colorectal adenocarcinomas / Solakidi S., Tiniakos D.G., Petraki K.et all. // Histol. Histopathol. – 2003. – Vol. 18, № 4. – P. 1181 – 1188.

28. Staack A. Expression of cathepsins B, H, and L and their inhibitors as markers of transitional cell carcinoma of the bladder / Staack A., Tolic D., Kristiansen G. et all. // Urology. – 2004. – Vol. 63, № 6. – P. 1089 – 1094.

29. Wiksten J.P. High tissue expression of tumour-associated trypsin inhibitor (TATI) associates with a more favourable prognosis in gastric cancer / Wiksten J.P., Lundin J., Nordling S. et all. // Histopathology. – 2005. – Vol. 46, № 4. – P. 380 – 388.

30. World Health Organization Classification of Tumors / F.A. Tavassoli, P. Devilee et al. // Pathology and Genetics of Tumors of the Breast and Female Genital Organs. – Lion: IARCPress, 2003. – 432 p.

Поступила в редакцию 13.03.17

Н. Мотрук, пошукач
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, Одеса, Україна

ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ АКТИВНОСТІ КОМПОНЕНТІВ СИСТЕМИ ПРОТЕОЛІЗУ В НОВОУТВОРЕННЯХ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

Досліджено активність компонентів системи протеолізу в нетрансформованій та пухлинній тканинах молочної залози жінок різного віку. Показано, що активність компонентів системи протеолізу тканини молочної залози суттєво залежить як від віку жінок, так і розвитку пухлинного процесу. За результатами дисперсійного аналізу встановлено, що активність α_1-антитрипсину детермінована тільки віком жінок і не залежить від ступеня злоякісності новоутворенння. Активність катепсин-D – і катепсин-L-подібних протеїназ, матриксної металлопротеїнази-2, трипсиноподібних протеїназ та карбоксипептидази А детермінована розвитком онкопроцесу і не залежить від віку жінок.

Ключові слова: протеоліз, молочна залоза, пухлина, вік жінок.

N. Motruk, applicant,
Odessa National Mechnikov University, Odessa, Ukraine

AGE CHARACTERISTICS OF ACTIVITY SOME COMPONENTS OF PROTEOLYSIS IN BREAST TISSUES

The activity of proteolytic enzymes and their inhibitors in breast samples of women of different age was investigated. It was shown that the activity of some components of the proteolytic system in maligmant and nonmalignant breast tissues is substantially depend on the age of women and the development of tumor. Activity of inhibitor of trypsine was determined only by age of women and did not depend on the degree of

oncoprocess. Activities of cathepsin-D- and cathepsin-L-like proteinases, matrix metalloproteinase-2, trypsine-like proteinase and carboxypeptidase A determined by development of oncoprocess and does not depend on age of women.

Key words: cathepsin H, tumor, mammary gland, substrate specifity.

УДК 616.329-001.37-053

Т. Коваль, асп, Т. Іщук, канд. біол. наук, Я. Раєцька, канд. біол. наук
Київський національний університеті мені Тараса Шевченка, Київ

ЗМІНИ БІЛКОВОГО СКЛАДУ СИРОВАТКИ КРОВІ ТА ГОМОГЕНАТУ СТРАВОХОДУ ПРИ РОЗВИТКУ КИСЛОТНОГО ОПІКУ СТРАВОХОДУ СТАТЕВОНЕЗРІЛИХ ЩУРІВ

За останні десятиріччя спостерігається стабільне збільшення кількості хімічних опіків стравоходу. У дитячому віці кислотні опіки стравоходу найчастіше зустрічаються у віці від 1 року до 8 років. У місці локалізації хімічної травми збільшуються процеси синтезу і деградації білків. Рубцеві зміни стравоходу, що розвиваються в результаті опіку, залишаються однією з найбільш складних проблем. Незважаючи на багаточисельні дослідження, недостатньо вивчені питання загоєння та процесів рубцювання на клітинному та молекулярному рівні. Нами було показано кількісні зміни білкового складу за умов розвитку кислотного опіку стравоходу. Подальше дослідження процесів загоєння може бути корисним для створення ефективних підходів для профілактики утворення рубцевих змін стравоходу.

Ключові слова: опік стравоходу, білкові фракції, електрофорез.

Вступ. Кількість хімічних опіків стравоходу і рубцевих стенозів не має тенденції до зменшення, що зумовлено значним збільшенням використання в побуті рідин побутової хімії, що містять кислоти і луги, здатних викликати важкі опіки стравоходу і шлунка. Опіки стравоходу займають одне із перших місць серед усіх захворювань стравоходу, та викликають важкій патологічний стан, який супроводжується глибокими місцевими і нерідко незворотними загальними змінами в організмі. Ступінь вираженості опіку залежить від характеру, кількості та концентрації хімічної речовини, тривалості її контакту зі слизовою оболонкою, термінів, що пройшли з моменту травми, а також від індивідуальних особливостей організму і, частково, від заходів невідкладної допомоги. Механізм дії кислот на біологічні тканини добре вивчений. При попаданні кислоти на шкіру вона викликає коагуляцію білків з подальшим їх перетворенням в кислі альбумінати. Відомо, що інтенсивність ураження кислотою залежить від концентрації водневих іонів, а також від ліпофільності, тобто здатності розчинятися в жирах. При контакті з кислотами іони водню викликають зневоднення клітин епітелію, що призводить до утворення струпа і розвитку коагуляційного некрозу. Виникають набряк і почервоніння, відшарування епідермісу слизової оболонки, виразка і омертвіння тканин. Аніони, які утворюються при дисоціації кислот, діють як нуклеофільні агенти, ще сильніше пошкоджуючи тканини. В місці локалізації травми посилюються процеси синтезу та деградації білків. Визначення присутності тих чи інших білкових фракцій може бути використано для оцінки стану організму як у нормі, так і за умов різних паталогій. За допомогою методу електрофорезу можна оцінити якісний білковий склад крові, гуморальної ланки імунітету, що може допомогти проаналізувати процеси, які відбуваються в організмі. Детальне вивчення зміни вмісту білкових фракцій може свідчити про метаболічні порушення в організмі та, можливо, дасть змогу не лише розширити уявлення про механізми патогенезу опікової хвороби стравоходу, а й розробити нові підходи до діагностики та лікування даної патології.

Метою даної роботи було дослідити зміни білкового складу сироватки крові та гомогенату стравоходу за умов моделювання кислотного опіку стравоходу (КОС) у статевонезрілих щурів.

Матеріали та методи. У дослідах використовували білих нелінійних статевонезрілих щурів (1-місячних) масою 90-110 г (відповідають 3-4-х річному віку дітей), із дотриманням загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 року), інших міжнародних угод та національного законодавства в цій галузі. Усіх тварин, яких було використано в дослідах, утримували на стандартному раціоні віварію. Тваринам експериментально моделювали опік стравоходу розчином 30 % CCl_3COOH, що відповідає опіку II ступеня [3]. Матеріал для дослідження відбирали на 1, 7, 15, 21 доби опікової хвороби [4]. Методом виведення тварин із досліду була цервікальна дислокація. Сироватку крові ссавців отримували з цільної крові. Кров залишали при 37є С на 40 хвилин для відокремлення фібриногену та супутніх білків і центрифугували протягом 40 хв. при 2000 g. Отриману сироватку переносили в епендорфи та заморожували при -20єС до подальшого використання. Вилучений стравохід розрізали та промивали фізіологічним розчином. Верхній шар клітин зішкрібали та гомогенізували у скляних гомогенізаторах Поттера, потім центрифугували при 2500 g 25 хв. Отриманий супернатант заморожували при -20єС до подальшого використання.

Розділення білкових фракцій сироватки крові щурів проводили методом диск електрофорезу у 10 % поліакриламідному гелі (ПААГ) за наявності додецилсульфату натрію (ДСН) за модифікованим методом Леммлі [7]. Електрофорез проводили у апараті для вертикального препаративного диск-електорофорезу (BioRad). Концентрування зразків у верхньому гелі відбувалось протягом години при силі струму 10 мА, розділення білкових фракцій проводили при силі струму 20 мА впродовж 2,5 годин. Фарбування розділених білків здійснювали протягом 30 хв. при кімнатній температурі у розчині, що містив Кумассі діамантовий синій G250 – 0,2 %, етанол – 33,3 %, оцтову кислоту – 3,3 %. Гелі відмивали до зникнення фону у розчині, що містив оцтову кислоту – 0,8 % впродовж однієї години при кімнатній температурі. Для оцінки результатів електрофорезу використовували програму Total Lab 2.01.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою методів варіаційної статистики та кореляційного аналізу 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. Електрофоретичний аналіз складу білків сироватки крові експериментальних тварин продемонстрував у всіх досліджених зразках, як у контролі так і за умов кислотного опіку стравоходу, наявність білкових фракцій з молекулярною масою від 15 до

© Коваль Т., Іщук Т., Раєцька Я., 2017

168 кДа (Табл. 1). Електрофоретичний аналіз білкового складу гомогенату стравоходу піддослідних тварин показав наявність білкових фракцій з молекулярною масою від 34 до 126 кДа (Табл. 2). Проведені дослідження не виявили якісних змін вмісту білка, але при цьому необхідно відзначити кількісні зміни.

***Таблиця* 1. Відносний вміст білкових фракцій у сироватці крові щурів за розвитку кислотного опіку стравоходу, (мкг/мг білку) M±m, n=5**

Білкові фракції м.м.(кДа)	контроль	1-ша доба	7-ма доба	15-доба	21-ша доба
168	86,8 ± 2,5	101,6±0,8*	143,0±6,9*	80,8±3,8*	106,0±4,2*
150	156,7±3,7	152,7±5,9	203.9±7,9*	247,0±8,1*	323,0±12,9*
130	449,2±28,9	548,9±20,3*	468,4±16,4	231,6±7,1*	115,9±3,2*
113	60,8±2,8	66,0±3,4	58,5±2,3	69,4±2,8*	30,6±1,4*
103	185,2±11,7	61,2±2,5*	42,8±1,7*	25,7±1,02*	46,6±1,9*
89	126,0±9,1	96,9±1,4*	84,0±0,2*	98,0±0,4*	46,0±1,8*
67	325,3±16,7	287,4±11,5*	189,3±7,6*	216,0±16,9*	270,0±10,8*
55	221,0±9,7	122,6±4,9*	130,1±5,2*	97,8±3,9*	118,2±4,7*
40	145,0±0,9	53,7±2,1 *	48,3±1,9*	37,2±0,69*	34,1±0,96*
25	79,8±3,1	40,4±1,7*	39,1±2,6*	20,3±0,4*	26,2±0,05*
15	74,5±1,9	53,2±2,1*	18,1±0,72 *	18,5±0,74 *	21,2±0,85 *

*p<0,05 по відношенню до контролю.

Так, нами було показано зростання вмісту фракцій з молекулярною масою (М.м.) ~168 кДа у сироватці крові на 1, 7 та 21-шу добу моделювання КОС у 1,17; 1,65 та 1,22 раза, відповідно, а також зниження вмісту на 15 добу у 1,07 раза. Крім того, встановлено збільшення вмісту фракції з М.м. ~150 кДа на 7, 15 та 21-шу добу експерименту у 1,3; 1,58 та 2,06 раза відповідно, порівняно з контрольними значеннями. Дані білкові фракції сироватки крові відповідають фракції IgG. Вміст імуноглобулінів збільшується внаслідок збільшенням концентрації антитіл за опікової хвороби. Згідно літературних даних у пацієнтів з опіками спостерігається підвищення рівнів імуноглобулінів в перші тижні після опіку. Авторами також відзначається пряма пропорційна залежність кількості В-лімфоцитів та підвищенням рівня імуноглобулінів від глибини та ступеня опікового ураження [6]. Вміст білкової фракції сироватки крові з М.м. ~ 130 кДа зростав у 1,22 раза лише на 1-шу добу експерименту, на 15 та 21-шу доби даний вміст знижувався у 2 та 4 рази відповідно, порівняно з контрольними значеннями. Підвищення вмісту фракції з М.м. ~ 113 кДа на 1 та 15-ту доби після моделювання КОС у 1,1 та 1,15 раза, відповідно, може свідчити про гостру фазу запалення, оскільки дана фракція може відповідати С-реактивному білку [4]. Підвищений рівень цієї фракції може вказувати на приєднання бактеріальної інфекції або запального процесу. Встановлено різке зниження вмісту фракції з М.м ~ 103 кДа за розвитку КОС, вже на 1-шу добу даний вміст знижувався у 3 рази порівняно з контрольними значеннями. Також знижувався вміст фракції з М. м. ~ 89 кДа за розвитку КОС на 1-шу добу у 1,3 раза і у 2,7 раза на 21-шу добу після опіку. Зниження вмісту альбумінової (~67 кДа) та преальбумінової фракції (~55 кДа) після моделювання КОС може вказувати на дисфункцію печінки, нирок або інших органів. Так, показано зниження вмісту альбумінової фракції з М.м ~67 кДа на 1; 7 та 15-ту добу у 1,13; 1,7 та 1,5 раза, відповідно. І встановлено зниження вмісту фракції з М.м. ~ 55 кДа після моделювання кислотного опіку на 1, 7, 15 та 21-шу доби у 1,8; 1,7; 2,3 та 1,9 раза відповідно, порівняно з контрольними значеннями. Результати досліджень показали, що у експериментальних тварин після моделювання КОС вміст постальбумінової фракції з М.м. ~ 40 кДа знижувався впродовж експерименту у 3-4 рази. Вміст фракцій М.м.~ 25 кДа так само знижувався протягом всього експерименту у 2–4 рази після опіку. Такі ж зміни відмічені для фракції з М.м ~15 кДа. Спостерігається зниження у 1,4–4 рази вмісту зазначеної фракції відносно контрольних значень. Кількісні зміни постальбумінових фракцій в сироватці крові пов'язані із зниженням синтезу альбуміну функціонально неспроможними гепатоцитами, що свідчить про порушення роботи печінки. Отже, отримані дані вказують на активацію гуморальної ланки імунної системи та запальний процес.

Молекулярні механізми процесу загоєння після опікових ран вивчені недостатньо. Тому певний теоретичний та практичний інтерес становить дослідження білкових фракцій слизової оболонки стравоходу після опіку, які можуть відкрити нові перспективи для лікування опікових ран та профілактики рубцювання (Табл.2).

***Таблиця 2.* Відносний вміст білкових фракцій у гомогенаті стравоходу щурів при розвитку кислотного опіку стравоходу, (мкг/мг білку) M±m, n=5**

Білкові фракції м.м.(кДа)	Контроль	1-ша доба	7-ма доба	15-доба	21-ша доба
126	4,79±0,1	2,13±0,1*	5±0,1	2,37±0,1*	5,39±0,1*
110	3,45±0,1	1,93±0,1*	4,87±0,1*	3,57±0,1	3,5±0,1
87	8,97±0,2	2,01±0,1*	7,2±0,2*	8,39±0,2*	8,56±0,2
74	5,87±0,1	6,13±0,2	17,83±0,5*	2,79±0,1*	2,52±0,1*
55	4,54±0,1	2,67±0,1*	8,44±0,3*	8,13±0,2*	4,51±0,1
52	2,91±0,1	1,85±0,1*	4,93±0,1*	7,75±0,2*	6,47±0,2*
34	3,7±0,1	3,23±0,1*	16,92±0,5*	5,35±0,1*	8,18±0,2*

Примітка: * – p<0,05 щодо контролю.

Було показано зниження вмісту фракцій гомогенату стравоходу з М.м. ~126 кДа на 1-шу та 15 доби у 2,25 та 2 раза відповідно, відносно контролю. На 7 та 21-шу добу вміст даної фракції підвищувався у 1,05 та 1,13 раза відповідно. Дана фракція 126 кДа може відповідати центросомному білку, який відіграє вирішальну роль в основних клітинних функціях, таких як ділення клітин та внутрішньоклітинний транспорт. Зміни в рівнях вмісту даної фракції напевно пов'язані з пошкодженням або загоєнням внутрішньої поверхні стравo-

ходу. Вміст фракції з М.м. ~110 кДа зменшувався на 1-шу добу після опіку у 1,8 раза відносно контрольних значень. На 7-му добу вміст даної фракції вище за контроль у 1,4 раза, а на 15 та 21-шу добу знижується до контрольних показників. Подібна тенденція спостерігалась для фракції з М.м. ~87 кДа. На 1-шу добу після КОС відбувалось суттєве зниження вмісту фракції у 4,5 раза, на 7 добу вміст фракції нижче контрольного значення у 1,25 раза, а на 15 та 21-шу добу даний показник на рівні контрольних значень. Показано підвищення вмісту фракції з М.м. ~ 74 кДа на 7-му добу в 3 рази за розвитку опіку. На 15 та 21-шу добу експерименту вміст зазначеної фракції різко знижувався і був у 2,1 та 2,35 раза нижче від контрольних значень. Нами зроблено припущення, що фракція з М.м. ~ 74 може відповідати білку теплового шоку Hsp70. З літературних даних відомо, що вміст зазначеного білка корелює зі ступенем опіку. Підвищення вмісту Hsp70, можливо, пов'язано з основною здатністю зазначених білків зв'язувати пошкоджені денатуровані білки в результаті деструктивної дії речовин, та захистом процесів біосинтезу білків. Hsp білки мають модуляторну дію на лейкоцитарні клітини, залучені в каскади гострого запалення, вони обмежують інтенсивність гострого запалення і формування гострих органних дисфункцій [2]. Аналіз електрофореграм показав зміни вмісту фракції з М.м. ~55 та 52 кДа за розвитку КОС. В результаті досліджень встановлено підвищення вмісту фракції з М.м. ~55 на 7 та15-ту доби у 1,86 та 1,8 раза відповідно, тоді як на 1-шу добу цей показник нижче контрольного у 1,7 раза. Показано також підвищення вмісту білкової фракції з М.м. ~ 52 кДа на 7, 15 та 21-шу добу у 1,7; 2,7 та 2,2 раза, відповідно. На 1-шу добу вміст даної фракції також нижче контрольного показника у 1,6 раза. Фракції з М.м. ~ 52 кДа та ~55 кДа можуть відповідати білкам кератинам. Базальними кератиноцитами експресуються кератин 5 (58 кДа) та кератин 14 (50 кДа). Процес реепітелізації опікової рани супроводжується посиленою міграцією базальних кератиноцитів до дистальних ділянок епідермісу ушкоджених тканин та посиленим синтезом кератинів [5,8]. Підвищення фракцій з М.м. ~50 та ~58 кДа, ймовірно, свідчить про активний процес епітелізації опікової травми. Результати досліджень показали, що у експериментальних тварин після моделювання хімічного опіку стравоходу підвищується вміст фракції з М.м. ~ 34 кДа на 7, 15 та 21-шу доби експерименту у 4,6; 1,5 та 2,2 раза, відповідно, відносно контролю. Білкова фракція з М.м ~34 кДа, може відповідати фактору росту ендотелію судин (VEGF). VEGF належить до VEGF/PlGF суперродини, є глікопротеїном та володіє потужним мітогенним потенціалом для клітин ендотелію судин, стимулює їх проліферацію, викликає міграцію ендотеліоцитів та розвиток нових кровоносних судин [1].

Висновок. Отже, метод електрофорезу дозволяє розділити білки на основні фракції, що дає змогу оцінити якісний білковий склад тканин за КОС, оскільки будь-яка хвороба супроводжується змінами білкового складу організму. При цьому відбуваються кількісні зміни білків, особливо в тих тканинах, в яких розвивається патологія. Нами було показано зміни вмісту білкових фракцій в сироватці крові та гомогенаті стравоходу за розвитку кислотного опіку. Таким чином, актуальним є дослідження білкових фракцій з М.м. нижче 20 кДа та вище 120 кДа для розуміння участі білків та факторів росту у процесі загоєння та/або рубцювання після хімічних опіків стравоходу.

Список використаних джерел

1. *Кузнецова О. М.* Фактор роста эндотелия сосудов: особенности секреции в костной ткани в норме и при патологии / О. М. Кузнецова, Н. Е. Кушлинский, Т. Т. Березов // Биомедицинская химия, 2003. – № 49. – С. 60–373.

2. *Мухоедова Т.В.* Протеины теплового шока в противоинфекционной и полиорганной защите / Т.В. Мухоедова, О.В. Жидкова // Патология кровообращения и кардиохирургия, 2010. – № 4. – С. 69–73.

3. *Експериментальна* модель лужного опіку I та II-го ступеню стравоходу у статевонезрілих щурів/ Я.Б. Раєцька. Т.В. Іщук, О.М. Савчук, Л.І. Остапченко // Наук. вісн. Чернівецького нац. ун-ту імені Юрія Федьковича. Біологія, 2014. – Т. 6. – С. 129–132.

4. *Комбустиология* : учебник / Э. Я. Фисталь, Г. П. Козинец, Г. Е. Самойленко и др. – Донецк, 2005.

5. *Real-time* monitoring of keratin 5 expression during burn re-epithelialization / K. Bruen, C. Campbell, W. Schooler et al // J. of Surgical Research, 2004. – № 120. – P. 12–20.

6. *Disorders* of the immune system in severely burned patients / A. D. Fayazov, S. I. Shukurov, B. I. Shukurov et al. // Ann Burns Fire Disasters, 2009. – № 22. – P. 121–130.

7. *Laemmli U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // Nature, 1970. – № 227. – P. 680–685.

8. *Ramakrishnan* Expression of keratin in post burn scars and keloids / O. Ramakrishnan, V. Prathiba, K. Sridhar et al. // Annals of Burns and Fire Disasters, 1995. – № 8. – P. 6–9.

References

1. Кузнецова О. М., Кушлинский Н. Е., Березов Т. Т. Фактор роста эндотелия сосудов: особенности секреции в костной ткани в норме и при патологии. Биомедицинская химия. 2003; №49: 60–373.

2. Мухоедова Т.В., Жидкова О.В. Протеины теплового шока в противоинфекционной и полиорганной защите. Патология кровообращения и кардиохирургия. 2010; №4: 69-73.

3. Раєцька Я.Б., Іщук Т.В., Савчук О.М., Остапченко Л.І. Експериментальна модель лужного опіку I та II-го ступеню стравоходу у статевонезрілих щурів. Науковий вісник Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича. Біологія. 2014; Т.6: 129-132.

4. Фисталь Э.Я., Козинец Г.П., Самойленко Г.Е. и др. Комбустиология. Учебник: Донецк. 2005: 315 с.

5. Bruen K., Campbell C., Schooler W. et al. Real-time monitoring of keratin 5 expression during burn re-epithelialization. Journal of Surgical Research. 2004; №120: 12–20.

6. Fayazov A. D., Shukurov S. I., Shukurov B. I. et al. Disorders of the immune system in severely burned patients. Ann Burns Fire Disasters. 2009; №22: 121–130.

7. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; №227: 680–685.

8. Ramakrishnan O., Prathiba V., Sridhar K. et al. Expression of keratin in post burn scars and keloids. Annals of Burns and Fire Disasters. 1995; №8: 6–9.

Надійшла до редколегії 13.03.17

T. Koval, T. Ischuk, Ph. D., Ya. Raetska, Ph. D.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

THE PROTEIN CONTENT CHANGES OF BLOOD SERUM AND ESOPHAGEAL HOMOGENATE UNDER ACID BURN DEVELOPMENT IN IMMATURE RATS

The steady increase of the number of chemical esophagus burns is noted over the past tenth anniversary. The esophageal acid burns are seen frequently in children ages 1 to 8 years. The chemical injuries sights are characterized by increase synthesis and degradation of proteins and scar formation. The cicatricial changes of the esophagus, developing as a result of burns, remain one of the most difficult problems of physiological functions maintaining. Despite of numerous studies, there are many insufficiently studied issues of esophagus burn healing and scarring process at the cellular and molecular level. Further study of the esophageal burns healing process would be useful to create effective approaches to prevention of scarring formation in esophagus.

Keywords: burn the esophagus, protein fraction, electrophoresis.

Т. Коваль, Т. Ищук, канд. биол. наук, Я. Раецкая, канд. биол. наук,
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ИЗМЕНЕНИЯ БЕЛКОВОГО СОСТАВА СЫРОВАТКИ КРОВИ И ГОМОГЕНАТА ПИЩЕВОДА ПРИ РАЗВИТИИ КИСЛОТНОГО ОЖОГА ПИЩЕВОДА НЕПОЛОВОЗРЕЛЫХ КРЫС

За последние десятилетия отмечается стабильное увеличение числа химических ожогов пищевода. В детском возрасте кислотные ожоги пищевода чаще всего встречаются в возрасте от 1 года до 8 лет. В месте локализации химической травмы увеличиваются процессы синтеза и деградации белков. Рубцовые изменения пищевода, развивающиеся в результате ожога, остаются одной из наиболее сложных проблем. Несмотря на многочисленные исследования, недостаточно изучены вопросы заживления и процессов рубцевания на клеточном и молекулярном уровне. Показаны количественные изменения белкового состава в условиях розвития кислотного ожога пищевода. Дальнейшее исследование процессов заживления может быть полезным в создании эффективных подходов для профилактики образования рубцовых изменений пищевода.

Ключевые слова: ожог пищевода, белковые фракции, электрофорез.

UDK 616.34-002-02-092+616.833

A. Prysiazhniuk, Ph. D. stud., T. Dovbynchuk, Ph. D., B. Kopiyak, Ph. D., G. Tolstanova, D. Sci.,
Taras Schevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

THE ROLE OF CENTRAL AND PERIPHERAL D2R RECEPTORS IN THE MECHANISM OF COLONIC VASCULAR PERMEABILITY DURING EXPERIMENTAL COLITIS IN RATS

We investigated the involvement of central and peripheral D2 dopaminergic receptors in the mechanism of vascular permeability in rat's colon during experimental ulcerative colitis. Ulcerative colitis was induced in male white inbred rats by 6 % iodoacetamide enema. For the investigation of central and peripheral D2R, separate and joint injections of D2R antagonist domperidone (2 mg/100 g, per os) and D2R agonist quinpirole (1 mg/100 g, per os) were applied. Central D2R were destroyed by neurotoxin injection – 6-OHDA. Colonic vascular permeability was measured by colonic extravasation of 1,5 % Evans blue. It was observed that blockade of peripheral D2R decreased colonic vascular permeability, while simultaneous activation of central D2R and inhibition of peripheral D2R have additive positive effect in prevention of increased colonic vascular permeability during experimental colitis.

Key words: D2 dopamine receptors, vascular permeability, ulcerative colitis.

Introduction. Inflammatory bowel diseases (IBD) development in human, as well as in animal models, is usually supported by increase of vascular permeability, which leads to the tissue edema. Number of mediators such as angiotenin, chemokines (IL-8, IL-10), coagulation factors, cytokines (IFN-γ, IL-13) and growth factors, mainly vascular endothelial growth factor (VEGF), affect vascular permeability and angiogenic balance. Endothelial cells produce proinflammatory mediators in response to the activation of immune cells and changes in tissue microenvironment. Many of the cytokines, deregulated during IBD pathogenesis, are pro-angiogenic: e.g., IL-17, which is synthesized by invasive Th17 cells and TNFα, which is synthesized by macrophages, monocytes and endothelial cells [1].

It should be mentioned that endothelium of colonic blood vessels is more permeable than vascular endothelium in brain and less penetrative comparing to the endothelium of liver and spleen blood vessels, which is related to the different amount of connections between the cells of endothelium [2]. Three different types of vascular permeability were previously defined: basal vascular permeability of normal tissues, acute vascular hyperpermeability, chronic hyperpermeability, which is typical for pathological angiogenesis. While basal permeability is most typical for capillaries because of their structure, acute vascular hyperpermeability appears in postcapillary venules in response to single or short-term influence of VEGF, histamine, serotonine etc. Most of them are present in tissue mast cells under normal conditions and may be released under the influence of mast cell degranulation factors. The increase in permeability in this case is performed through the contraction of endothelial cells, which leads to the 'channel' appearance between them. Under the constant influence of permeability-increasing factors, deep changes in venules structure and functioning appear, which lead to the chronic hyperpermeability and pathologic angiogenesis [3].

Dopamine is a neurotransmitter, which is responsible for the happiness state and acts through two classes of dopamine receptors – D1 class, which consist of D1 and D5 subtypes and D2 class, which consists of D2, D3 and D4 subtypes. Expression of D1, D2, D3 and D5 dopamine receptors was found in mucosal layer of upper (stomach) and lower (small intestine and colon) parts of the gastrointestinal tract.

There is direct and indirect evidence that disruption of dopaminergic system might have an influence in IBD pathogenesis. We showed that patients with schizophrenia, which is characterized by hyperdopaminergic activity, have less susceptibility to IBD development [4]. Meanwhile during Parkinson's disease, which is characterized by destroyed dopaminergic neurons in central nervous, the increased risk of IBD development was observed [5]. Previously we determined changes in D2R expression in colon mucosa of patients with IBD and experimental colitis [6]. D2R activation facilitated healing of experimental colitis lesions via decreasing of endothelial permeability and, as a result, reduction of colonic inflammation [7].

The aim of this work to determine whether central or peripheral D2 dopamine receptors affect vascular permeability in rat's colon during experimental UC.

Materials and methods. *Animals.* Male white inbred rats (170-200 g, n=25) were housed under standard vivarium conditions. All animals had unlimited access to tap water and Purina chow. These studies were approved by Bioethical Committee of 'Institute of Biology and Medicine', Taras Shevchenko National University of Kyiv (Kyiv, Ukraine), protocol №1 from 20.02.2017.

Iodoacetamide-Induced Colitis Model. Experimental UC in rats was induced by 6 % IA injection. IA is a widely used SH-alkylator [8]. This model of chemically induced UC is advantageous due to sufficient colonic lesions induction; during first 1-2 hours after IA enema such parameters as increased vascular permeability, massive mucosal edema etc can be seen with further erosions and ulcer formation (6-12 h) and acute and chronic inflammation (7-14 d). In brief, 0.1 ml of 6 % IA (Sigma, USA) dissolved in 1 % methylcellulose (Sigma, USA) or 0,1 ml of 1 % methylcellulose (MC) was given through rubber catheter

© Prysiazhniuk A., Dovbynchuk T., Kopiyak B., Tolstanova G., 2017

(Nelaton S-8, Rusch, Germany) 7 cm from anus. Rats were subjected to autopsy 1 h after intracolonic IA administration.

Vascular permeability assay. For the quantitive measurement of colonic vascular permeability Evans blue assay was applied [9]. Evans blue irreversibly binds to albumin and crosses endothelial barrier in form of albumin/Evans blue conjugate (Mw≈67 kDa). Rats were anesthetized with urethane. Evans blue (1,5 %) in dose of 100 µl/100 mg was injected intravenously 30 min before autopsy, which was performed 60 min after 6 % IA enema or vehicle (1 % MC). At autopsy 7 cm of colon were removed, rinsed in saline, gently blotted with filter paper and weighed. Using metal spatula the mucosa was gently scraped from the mucosal layer. Evans blue was extracted from the tissue using formamide and measured by spectrophotometry at 612 nm. Results were expressed as mg of dye/g colon wet weight.

Destruction of central dopaminergic neurons. Chronic unilateral dopamine deficiency was performed by disruption of dopaminergic neurons of substantia nigra by stereotaxic microinjections of 12 µg of selective neurotoxin 6-hydroxydopamine (6-OHDA) (Sigma, USA) as described [10]. Briefly, under the nembutale anesthesia (50 mg/kg, i.p., Sigma, USA) rats were put into the modified stereotax (SEG-4). Then animals were scalped and trepanated by injection needle in the area 2,2 mm in caudal direction and 1,5 mm in lateral direction from bregma. After that animals were given pargilin (40 mg/kg, i.p., Sigma, USA) to inhibit metabolic conversion of 6-OHDA by monoaminooxidase and desipramine (25 mg/kg, i.p., Sigma, USA) to block neurotoxin capture by noradrenergic cells. 4 µl of 6-OHDA (12 µg) were inserted into the brain into the bur hole in 2,8 mm depth from cranium with the speed of 1 µl per minute (every 15 s). One week after the administration of 6-OHDA the number of destroyed central dopaminergic neurons was estimated by apomorphine test. The intensity of movements was recorded for 30 min after apomorhine injection (0,5 mg/kg, i.p., Sigma, USA). Less than 180 turns per 30 min corresponded to 44 % of destroyed dopaminergic neurons of left hemisphere; more then 180 turns per 30 min – 95 % of destroyed dopaminergic neurons.

Experimental design. 1) To check the role of central and peripheral D2R in mechanisms of colonic vascular permeability. The selective D2R agonist quinpirole was gavaged in dose 1 mg/100 g (Sigma, USA, cat #85798089) *per os* 15 min before IA enema (75 min before autopsy). Quinpirole was dissolved in saline strictly before using. The peripheral D2R antagonist domperidone (Domrid, 'Cusum Pharm') was gavaged in dose 2 mg/100 g body weight *per os* 30 min before IA enema (90 min before autopsy). Quinpirole and domperidone were gavaged separately or consecutively. Saline (1 ml/rat) was gavaged as the vehicle. 2) To check the role of central dopaminergic system in mechanisms of colonic vascular permeability. 6-OHDA-treated or sham-lesioned rats were enrolled in experiment in 1 month after surgery. Rats were divided into 4 groups: I – sham-lesioned rats treated with MC (n=3); II 6-OHDA-lesioned rats treated with methylcellulose (MC) (n=3); III sham-lesioned rats treated with IA (n=3); IV – 6-OHDA-lesioned rats treated with IA (n=3). Colonic vascular permeability in rats was assessed in 60 min after IA or MC enema.

Statistical analysis. Quantitative results were expressed as mean ±SD. Statistical significance was determined by Student's t-test, and p-values of <0.05 were considered statistically significant.

Results and discussion. It is well known that increased vascular permeability is a major contributor to acute inflammatory response development and perpetuation of chronic inflammation. In our study rats injected with 6 % IA had increased vascular permeability in 37.6 % ($p<0.05$) *vs.* control group (MC) (Fig. 1). These results are in line with previous data on increased vascular permeability during experimental UC [7].

On the models of ovarian hyperstimulation syndrome performed on human luteinized granulosa cells *in vitro* and *in vivo,* comercially available D2R agonist cabergoline showed effectiveness in prevention of increased vascular permeability by inhibition of VEGF protein production and secretion. Moreover, cabergoline in small doses activated D2R and reduced VEGF-mediated vascular permeability without affecting angiogenesis [11; 12]. Also the effectiveness of the D2R agonists was shown for treatment of lung cancer, which was performed on a LLC1 murine lung cancer model. Tumour angiogenesis was inhibited by D2R agonist via abrogation VEGFR-2-mediated signalling in endothelial cells [13].

For the determination of D2R role in colonic vascular permeability during experimental UC, rats were treated with D2R agonist quinpirole. Quinpirole decreased 23.9 % ($p<0.05$) colonic vascular permeability in rats with IA-induced UC (Fig. 1). So, activation of D2R decreased vascular permeability in rats with experimental UC and could indicate about the protective role of D2R. These data support previous research about the protective role of D2R in IBD pathogenesis [7]. Previous study showed that both central and peripheral dopamine plays a mechanistic role in duodenal ulceration [14; 15]. Quinpirole is a D2R agonist, which is able to cross blood-brain barrier and affects both central and peripheral dopaminergic neurons. Because of that question about the positive influence of central or peripheral D2R still remains open.

To distinguish the role of central and peripheral D2R in regulation of colonic vascular permeability, selective D2R antagonist domperidone was used in our study. Domperidone does not cross blood-brain barrier and has an influence only on peripheral dopamine receptors [16]. Domperidone is commercially available antagonist and is used for treatment of gastroparesis, functional dyspepsia, nausea and vomiting and pediatric reflux [17; 18; 19; 20]. Pre-treatment with domperidone decreased in 18.8 % ($p<0.05$) colonic vascular permeability in rats with IA-induced UC *vs.* saline-treated rats (Fig. 1). To our best knowledge, these data are the first indication that activation of peripheral dopaminergic neurons might play the negative role in the IBD pathogenesis via increase colonic vascular permeability. Previously, beneficial effects of D2R antagonists were shown in peptic ulcer disease. Namely, risperidone, D2R and 5-HT(2A) receptor antagonist pre-treatment reversed the stress-induced alteration in hexosamine, PGE(2) and microvascular permeability [21]. Another antipsychotic D2R antagonist aripiprazole showed significant antiulcer and gastroprotective activity on the model of ethanol induced gastric ulcers [22].

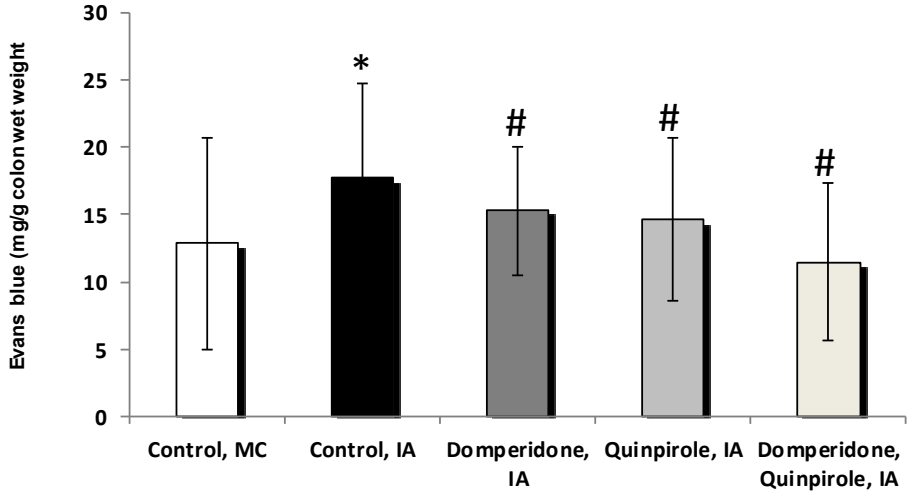


Fig. 1. The effect of peripheral D2R antagonist domperidone (D), D2R agonist quinpirole (Q) and their combination on colonic vascular permeability during the IA-induced UC in rats.
M±SD, * – p<0.05, *vs.* control group, treated with MC; # – p<0.05, *vs.* IA group

Meanwhile, under the joint administration of quinpirole and domperidone level of colonic vascular permeability during IA-induced UC was decreased by 48.2 % (p<0.05), that almost twice lower than after single administration either quinpirole or domperidone (Fig. 1). The received results might indicate about the positive influence of central branch of dopaminergic system in IBD development and progression. Till date, there is no direct evidence on the central dopamine role in IBD development and progression, except evidence that patients with Parkinson's disease had increased levels of pro-inflammatory cytokines and intestinal permeability, which are key features of IBD pathogenesis [23; 24].

To confirm the hypothesis on the beneficial effect of central dopaminergic system in the prevention of increased vascular permeability, we measured the level of colonic vascular permeability in rats with chemically destroyed central dopaminergic neurons during experimental UC (Fig. 2).

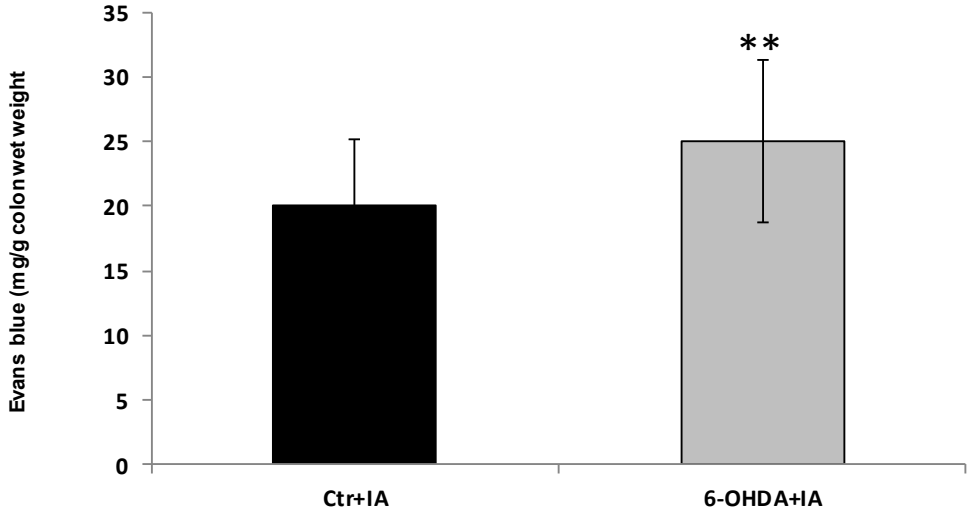


Fig. 2.Colonic vascular permeability in the rats with damaged central dopaminergic neurons during IA-induced UC. Results were expressed as M±SD;
n=3 rats/group. **p<0.01;

We found that colonic vascular permeability was increased 40.0 % (p<0.01) in rats with destroyed dopaminergic neurons *vs.* sham-lesioned rats with IA-induced UC.

Conclusions. We showed for the first time that blockade of peripheral D2R decrease the colonic vascular permeability, while simultaneous activation of central D2R and inhibition of peripheral D2R have additive positive effect in prevention of increased colonic vascular permeability during experimental colitis.

References

1. *Role* of the endothelium in inflammatory bowel diseases / W. E Cromer, J M. Mathis, D. N. Granger et al. // World J. Gastroenterol, 2011. – T. 17. – № 5. – C. 578–593.

2. *Kolka C. M.* The barrier within: endothelial transport of hormones / C.M. Kolka, R. N. Bergman // Physiology, 2012. – T. 27. – № 4. – C. 237–247.

3. *Vascular* permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis / J. A. Nagy, L. Benjamin, H. Zeng et al. // Angiogenesis, 2008. – Т. 11. – № 2. – С. 109–119.

4. *New* molecular mechanisms of the unexpectedly complex role of VEGF in ulcerative colitis / G. Tolstanova, T. Khomenko, X. Deng et al. // J. Gastroenterol, 2010. – Vol. 138. – № 5. – P. 264.

5. *Colonic* inflammation in Parkinson's disease / D. Devos et al. // Neurobiology of disease, 2013. – Т. 50. – С. 42–48.

6. *Impaired* Peripheral Dopaminergic System in Patients with Ulcerative Colitis / V. Kernychnyi, N. Dziubenko, A. Prysiazhniuk et al. // The FASEB Journal, 2015. – Т. 29. – № 1 Supplement. – P. LB544.

7. *Role* of dopamine and D2 dopamine receptor in the pathogenesis of inflammatory bowel disease / G. Tolstanova, X. Deng, A. Ahluwalia et al. // Digestive diseases and sciences, 2015. – Т. 60. – № 10. – P. 2963–2975.

8. *New* ulcerative colitis model induced by sulfhydryl blockers in rats and the effects of antiinflammatory drugs on the colitis / H. Satoh, F. Sato, K. Takami et al. // The Japanese Journal of Pharmacology, 1997. – Т. 73. – № 4. – P. 299–309.

9. *Patterson C. E.* Evans blue dye as a marker of albumin clearance in cultured endothelial monolayer and isolated lung / C.E. Patterson, R.A. Rhoades, J.G. Garcia // Journal of Applied Physiology, 1992. – Т. 72. – № 3. – P. 865–873.

10. *Pharmacoprotective* influences on different links of the mechanism underlying 6-hydroxydopamine-induced degeneration of nigro-striatal dopaminergic neurons / S.A. Talanov, N.N. Oleshko, M.N. Tkachenko et al. // Neurophysiology, 2006. – Т. 38. – P. 150–156.

11. *Dopamine* receptor 2 activation inhibits ovarian vascular endothelial growth factor secretion in vitro: implications for treatment of ovarian hyperstimulation syndrome with dopamine receptor 2 agonists / H. Ferrero, C. M. Garcна-Pascual, R. Gymez et al. // Fertility and sterility, 2014. – Т. 101. – № 5. – P. 1411–1418.

12. *The effectiveness* of cabergoline for the prevention of ovarian hyperstimulation syndrome / M.A. Hosseini, A. Aleyasin, A. Mahdavi et al. // Iranian journal of medical sciences, 2011. – Т. 36. – № 3. – P. 207.

13. *Dopamin*e D2 receptor agonists inhibit lung cancer progression by reducing angiogenesis and tumor infiltrating myeloid derived suppressor cells / L. H. Hoeppner, Y. Wang, A. Sharma et al. // Molecular oncology, 2015. – Т. 9. – № 1. – P. 270–281.

14. *Effect* of administered bFGF on acute and chronic duodenal ulcers, gastric secretion and acute mucosal lesions in rats / S. Szabo, J. Folkman, P. Vattay et al. // European Journal of Pharmacology, 1990. – Т. 183. – № 6. – P. 2090–2091.

15. *Rasheed N.* Central dopaminergic system and its implications in stress-mediated neurological disorders and gastric ulcers: short review / A. Alghasham, N. Rasheed // Advances in pharmacological sciences, 2012. – Т. 2012.

16. *Comparison* of ranitidine, domperidone maleate and ranitidine+ domperidone maleate in the short-term treatment of reflux oesophagitis / E. Masci, P. A. Testoni, S. Passaretti et al. // Drugs under experimental and clinical research., 1984. – Т. 11. – № 10. – P. 687–692.

17. *Coadministration* of domperidone increases plasma levodopa concentration in patients with Parkinson disease / N. Nishikawa, M. Nagai, T. Tsujii et al. // Clinical neuropharmacology, 2012. – Т. 35. – № 4. – P. 182–184.

18. *Pathophysiology* and pharmacotherapy of gastroparesis: current and future perspectives / J. E. Stevens, K. L. Jones, C. K. Rayner et al. // Expert opinion on pharmacotherapy, 2013. – Т. 14. – № 9. – P. 1171–1186.

19. *Influence* of hippophae rhamnoides on two appetite factors, gastric emptying and metabolic parameters, in children with functional dyspepsia / M. Xiao, X. Qiu, D. Yue et al. // Hellenic journal of nuclear medicin, 2012. – Т. 16. – № 1. – P. 38–43.

20. *Kapoor A. K.* Illustrated medical pharmacology / A.K. Kapoor, S. M. Raju // JP Medical Ltd, 2013.

21. *Saxena B.* Gastroprotective potential of risperidone, an atypical antipsychotic, against stress and pyloric ligation induced gastric lesions / B. Saxena, S. Krishnamurthy, S. Singh // Chem Biol Interact., 2011. – Т. 190. – № 2-3. – P. 155–64.

22. *Aripiprazole* an atypical antipsychotic protects against ethanol induced gastric ulcers in rats / A.A. Asmari, M. Arshaduddin, I. Elfaki et al. // Int J Clin Exp Med, 2014. – Т. 7. – № 8. – P. 2031–2044.

23. *Mulak A.* Brain-gut-microbiota axis in Parkinson's disease / A. Mulak, B. Bonaz // World J. Gastroenterol., 2015. – Т. 21. – №. 37. – P. 10609–10620.

24. *Inflammation* and adaptive immunity in Parkinson's disease / R. L. Mosley, J. A. Hutter-Saunders, D.K. Stone et al. // Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2012. – Т. 2. – № 1. – P. a009381.

References (scopus standard)

1. Cromer WE, Mathis JM, Granger DN, Chaitanya GV, Alexander JS. Role of the endothelium in inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology : WJG*. 2011;17(5):578-593. doi:10.3748/wjg.v17.i5.578.

2. Kolka CM, Bergman RN. The Barrier Within: Endothelial Transport of Hormones. *Physiology (Bethesda, Md)*. 2012;27(4):237-247. doi:10.1152/physiol.00012.2012.

3. Nagy JA, Benjamin L, Zeng H, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. *Angiogenesis*. 2008;*11*(2):109-119.

4. Tolstanova G, Khomenko T, Deng X, Szabo S, Sandor Z. New molecular mechanisms of the unexpectedly complex role of VEGF in ulcerative colitis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;138(5): S-264.

5. Devos D, Lebouvier T, Lardeux B, Biraud M, Rouaud T, Pouclet H, Neunlist M. Colonic inflammation in Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*. 2013;*50*:42-48.

6. Kernychnyi V, Dziubenko N, Prysiazhniuk A, Tolstanova G. Impaired Peripheral Dopaminergic System in Patients with Ulcerative Colitis. *The FASEB Journal*. 2015; *29*(1 Supplement):LB544.

7. Tolstanova G, Deng X, Ahluwalia A, Paunovic B, Prysiazhniuk A, Ostapchenko L, Szabo S. Role of dopamine and D2 dopamine receptor in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Digestive diseases and sciences*. 2015; *60*(10):2963-2975.

8. Satoh H, Sato F, Takami K, Szabo S. New ulcerative colitis model induced by sulfhydryl blockers in rats and the effects of antiinflammatory drugs on the colitis. *The Japanese Journal of Pharmacology*. 1997;*73*(4):299-309.

9. Patterson CE, Rhoades RA, Garcia JG. Evans blue dye as a marker of albumin clearance in cultured endothelial monolayer and isolated lung. *Journal of Applied Physiology*. 1992;72(3): 865-873.

10. Talanov SA, Oleshko NN, Tkachenko MN, Sagach VF. Pharmacoprotective influences on different links of the mechanism underlying 6-hydroxydopamine-induced degeneration of nigro-striatal dopaminergic neurons. *Neurophysiology*. 2006;38:150–6.

11. Ferrero H, Garcна-Pascual CM, Gymez R, Delgado-Rosas F, Cauli O, Simyn C, Pellicer A. Dopamine receptor 2 activation inhibits ovarian vascular endothelial growth factor secretion in vitro: implications for treatment of ovarian hyperstimulation syndrome with dopamine receptor 2 agonists. *Fertility and sterility*. 2014;*101*(5):1411-1418.

12. Hosseini MA, Aleyasin A, Mahdavi A, Nezami R, Safdarian L, Fallahi P. The effectiveness of cabergoline for the prevention of ovarian hyperstimulation syndrome. *Iranian journal of medical sciences*. 2011;*36*(3):207.

13. Hoeppner LH, Wang Y, Sharma A, Javeed N, Van Keulen VP, Wang E, Mukhopadhyay D. Dopamine D2 receptor agonists inhibit lung cancer progression by reducing angiogenesis and tumor infiltrating myeloid derived suppressor cells. *Molecular oncology*. 2015;*9*(1):270-281.

14. Szabo S, Folkman J, Vattay P, Morales RE, Pinkus G, Kato K. Effect of administoed bFGF on acute and chronic duodenal ulcers, gastric secretion and acute mucosal lesions in rats. *European Journal of Pharmacology*. 1990;*183*(6):2090-2091.

15. Rasheed N, Alghasham A. Central dopaminergic system and its implications in stress-mediated neurological disorders and gastric ulcers: short review. *Advances in pharmacological sciences*, *2012*.

16. Masci E, Testoni PA, Passaretti S, Guslandi M, Tittobello A. Comparison of ranitidine, domperidone maleate and ranitidine+ domperidone maleate in the short-term treatment of reflux oesophagitis. *Drugs under experimental and clinical research*. 1984; *11*(10):687-692.

17. Nishikawa N, Nagai M, Tsujii T, Iwaki H, Yabe H, Nomoto M. Coadministration of domperidone increases plasma levodopa concentration in patients with Parkinson disease. *Clinical neuropharmacology*. 2012;*35*(4):182-184.

18. Stevens JE, Jones KL, Rayner CK, Horowitz M. Pathophysiology and pharmacotherapy of gastroparesis: current and future perspectives. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 2013;*14*(9):1171-1186.

19. Xiao M, Qiu X, Yue D, Cai Y, Mo Q. Influence of hippophae rhamnoides on two appetite factors, gastric emptying and metabolic parameters, in children with functional dyspepsia. *Hellenic journal of nuclear medicine*. 2012;*16*(1):38-43.

20. Kapoor AK, Raju SM. *Illustrated medical pharmacology*. JP Medical Ltd. 2013.

21. Saxena B, Krishnamurthy S, Singh S. Gastroprotective potential of risperidone, an atypical antipsychotic, against stress and pyloric ligation induced gastric lesions. *Chemico-biological interactions*. 2011;*190*(2):155-164.

22. Asmari AA, Arshaduddin M, Elfaki I, Kadasah S, Robayan AA, Asmary SA. Aripiprazole an atypical antipsychotic protects against ethanol induced gastric ulcers in rats. *Int J Clin Exp Med*. 2014;*7*(8):2031-2044.

23. Mulak A, Bonaz B. Brain-gut-microbiota axis in Parkinson's disease. *World J Gastroenterol*. 2015;*21*(37):10609-10620.

24. Mosley RL, Hutter-Saunders J A, Stone DK, Gendelman HE. Inflammation and adaptive immunity in Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2012;*2*(1):a009381.

Submitted on 13.03.17

А. Присяжнюк, асп., Т. Довбинчук, канд. біол. наук, Б. Копияк, канд. біол. наук,
Г. Толстанова, д-р біол. наук,
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

РОЛЬ ЦЕНТРАЛЬНИХ І ПЕРИФЕРИЧНИХ Д2 РЕЦЕПТОРІВ У МЕХАНІЗМІ ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЇ ПРОНИКНОСТІ ТОВСТОЇ КИШКИ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО КОЛІТУ

Визначено залучення центральних і периферичних Д2 дофамінергічних рецепторів у механізм ендотеліальної проникності товстої кишки щурів з експериментальним виразковим колітом (ВК). ВК викликали у білих нелінійних щурів-самців шляхом ректального введення 6 % йодоацетаміду. Для дослідження ролі центральних і периферичних Д2Р щурам окремо та сумісно вводили антагоніст Д2Р домперидон (2 мг/100 г, per os) та агоніст Д2Р квінпірол (1 мг/100 г, per os). Центральні дофамінергічні нейрони у щурів руйнували шляхом введення нейротоксину 6-OHDA. Ендотеліальну проникність товстої кишки щурів вимірювали за ступенем екстравазації 1.5 % фарби Еванса. Встановлено, що блокування периферичних Д2Р знижувало ендотеліальну проникність товстої кишки щурів, водночас активація центральних Д2Р та інгібування периферичних Д2Р мало додатковий позитивний ефект по запобіганню підвищеної ендотеліальної проникності товстої кишки щурів за експериментального ВК.

Ключові слова: Д2 дофамінові рецептори, ендотеліальна проникність, виразковий коліт.

А. Присяжнюк, асп., Т. Довбинчук, канд. биол. наук, Б. Копыяк, канд. биол. наук,
А.Толстанова, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

РОЛЬ ЦЕНТРАЛЬНЫХ И ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ Д2 РЕЦЕПТОРОВ В МЕХАНИЗМЕ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ КОЛИТОМ

Определили вовлеченность центральных и периферических Д2 дофаминергических рецепторов в механизм эндотелиальной проницаемости толстого кишечника крыс с экспериментальным язвенным колитом (ЯК). ЯК у белых нелинейных крыс-самцов вызывали путем ректального введения 6 % йодоацетамида. Для исследования роли центральных и периферических Д2Р крысам отдельно и совместно вводили антагонист Д2Р домперидон (2 мг/100 г, per os) и агонист Д2Р квинпирол (1 мг/100 г, per os). Центральные дофаминергические нейроны у крыс разрушали путем введения нейротоксина 6-OHDA. Эндотелиальную проницаемость толстого кишечника крыс измеряли по степени экстравазации 1.5 % краски Эванса. Установлено, что блокирование периферических Д2Р снижало эндотелиальную проницаемость толстого кишечника крыс, в то время как активация центральных Д2Р и ингибирование периферических Д2Р имели дополнительный позитивный эффект на предотвращение повышенной эндотелиальной проницаемости толстого кишечника крыс при экспериментальном ЯК.

Ключевые слова: Д2 дофаминовые рецепторы, эндотелиальная проницаемость, язвенный колит.

UDK 577.112

Ie. Goloborodko, Ph. D. stud, V. Konopelniuk, Ph. D., L. Ostapchenko, D. Sci.,
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

STATE OF HYPERGLYCEMIA ANIMALS IN THE CONSUMPTION OF HIGH-CALORIE DIET WITH THE BIONANOCOMPOSITE ADDITION

Glucose level and glucose tolerance test in blood of rats under conditions of obesity induced by consumption of high-calorie diet have been determined. It was also researched these indicators in the blood of animals that consumpt high-calorie diet with added bionanocomposite. These data suggest bionanocomposite preventive effect on the development of key indicators prediabetes.

Key words: glucose, glucose tolerance test, bionanocomposite, prevention, obesity.

Introduction. Obesity is a significant health problem worldwide and its incidence has more than doubled during the last 20 years [1]. Obesity is characterized by both a large increase in body weight and an increase in body fat exceeding standard measures. Obesity is a leading risk factor for the development of cardiovascular disease, and malignancies, and also has an impacton respiratory diseases such as asthma, chronic obstructive pulmonary disease as well as obesity hypoventilation syndrome and sleep apnea [2-4]. Obesity is associated with most of the components of metabolic syndrome, the leading cause of type 2 diabetes. The comorbidities of obesity and type 2 diabetes associated with hyperglycemia (high blood glucose and impaired glucose tolerance). Therefore determination of glucose and glucose tolerance test is an important in period of prevention or treatment obesity.

Features of metabolism at obesity can be the basis for the study of biologically active compounds of plant origin for the prevention of pathology. There is greater need to study the pharmacological and toxicological effects of herbal products to examine their clinical efficacy and safety. Because, every drug has potential side effects. They are not completely safe in this regard. Herbal supplements are being extensively used due to their effectiveness in managing many chronic disorders. They are cost-effective, and exert less to no toxic side-effects in comparison with many chemically synthesized drugs [5].

Out of many such medicinal plants, fenugreek [Trigonella foenum-graecum Linn (Fabaceae)] has recently attracted the attention of scientists from across the globe. Fenugreek belongs to the family Fabaceae and is applied in many parts of the world for the treatment of diabetes. Fenugreek is well known for its antidiabetic properties [6-9]**.** The plant has been employed against different diseases including diabetes.

In previous studies we have shown development of prediabetes in rats maintained on a high-calorie diet [10–12]. The aim of this work was to compare the performance of prediabetes in male and female under development of obesity and the impact of prophylactic administration bionanocomposite under the possibility of the state of hyperglycemia.

Materials and methods.

Animal care and experimental procedures

Experiments were carried out on outbred female and male rats initially weighing 150–170 g. Research was conducted according to with the standards of the Convention on Bioethics of the Council of Europe's 'Europe

© Goloborodko Ie., Konopelniuk V., Ostapchenko L., 2017

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)'. The tools used to research were metrological control.

During week 1, all animals received standard Purina rodent chow and water *ad libitum.* On day 8, the animals were randomized into 4 groups. Rats of group 1 (Control) were given water ad libitum and were fed by a standard food during 14 weeks of the experimental period. The (HCD) group was fed by a high-caloric diet and water ad libitum [13]. Rats of group 3 (Control_BNC) were fed by a standard nutriment supplemented with 2 % bionanocomposite based on fenugreek seed powder. The (HCD_BNC) group was fed by, a high-caloric diet which contained bionanocomposite based on fenugreek seed powder (2 %) during 14 weeks of the experimental period.

The animals were housed individually in cages at a constant temperature (20-22 °C) and humidity (60 %) with a 12-hour-light and 12-hour-dark cycle.

Intraperitoneal glucose tolerance testing

The serum glucose concentration was monitored using intraperitoneal glucose tolerance testing (IPGTT) in the control and obese rats. Before the test, the animals were narcotized with sodium thiopental (40 mg/kg body weight intraperitoneally). The rats were injected intraperitoneally with glucose solution (2 g/kg body weight). Blood samples were drawn from the tail vein at 0, 15 30, 60, and 120 minutes after glucose administration through an intravenous catheter. Blood glucose levels were measured using a glucometer (Accu-Chek-Performa, Roche Diagnostics, Penzberg, Germany). The obtained data were used for construction of glycemic curves that reflect the rate of glucose level normalization after glucose administered.

Statistical analysis

Statistical analysis of data was carried out by the software package 'Statistica 7.0'. 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.

Prediabetes is defined as an intermediate metabolic state between normoglycaemia and diabetes. Prediabetes includes impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose [14, 15]. The blood glucose concentration in control and experimental groups of rats are represented in Fig 1.

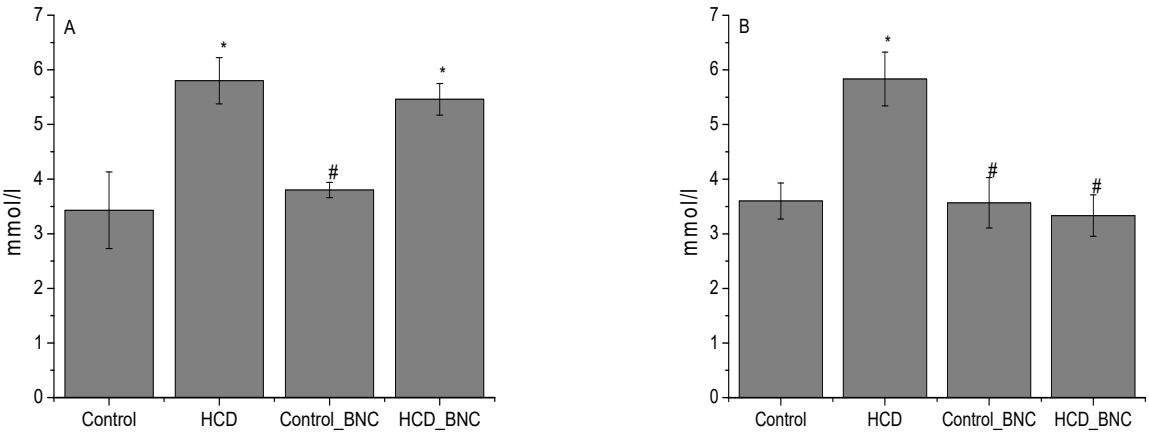


Fig. 1. Effect of BNC on blood glucose in normal and obese rats (A-female, B-male)

Means ± standard errors (n = 6) are shown (* $p < 0.05$ in comparison with control group; ** $p < 0.05$ in comparison with HCD group).

Blood glucose concentration in control female and male rats was significantly higher than in high-calorie diet group (Fig 1, A,B). Blood glucose concentration in control female rats was 3.4 mmol/L (in control male rats was 3.6 mmol/L), while feeding high-calorie diet led to 1.7-fold elevation (5.8 mmol/L) (in male – to 1.6-fold elevation (5.8 mmol/L)) of fasting blood glucose (Fig. 1,A,B). In the group of obese male rats treated with BNC had significantly lower blood glucose level compared to untreated obese rats. Blood glucose concentration in male rats of HCD_BNC group was 3.3 mmol/L (Fig. 1, B). The results suggest a positive impact BNC on key indicator of diabetes and prediabetes. The blood glucose levels in control male and female rats treated with BNC and in untreated control animals were statistically comparable (Fig. 1, A,B).

Our results indicate the development of hyperglycemia in animals research group. Hyperglycemia can develop due to decreased insulin secretion by β-cells of the pancreas, as well as lack of glucose utilization body tissues. High levels of glucose in the blood and other biological fluids causes the development of osmotic diuresis, which leads to dehydration and deficiency of cations. In addition, elevated levels of glucose increases non-enzymatic glycosylation of proteins and lipids and consequently develop numerous lesions in various organs [256]. However, adding a bionanocomposite in HCD prevents the development of hyperglycemia.

Effect of BNC on glucose tolerance in normal and obese rats is shown in Fig. 2.

Glucose administration induced a high glucose level in the obese animals at all time points, from 0 to 120 minutes after glucose challenge, and the difference was significant at the 15 minutes and 30 minutes time point.

For the control female rats, the mean blood glucose level was 4,03 mmol/L at 30 minutes after glucose administration and 3,45 mmol/L at 120 minutes (Fig. 2,A). For the control male rats, the mean blood glucose level was 4,7 mmol/L at 15 minutes after glucose administration and 3,4 mmol/L at 120 minutes (Fig. 2,B). Although impaired glucose tolerance is consistently defined as a 2 hour plasma glucose concentration of 7.8-11.0 mmol/L during an oral glucose tolerance test, the cut-off point for diagnosis of impaired fasting glucose remains controversial [14]. WHO defines impaired plasma glucose as fasting plasma glucose of 6.1-6.9 mmol/L [14, 15], while the 2003 American Diabetes Association (ADA) guideline recommended a cut-off point of 5.6-6.9 mmol/L [14, 16] For the obese female (and male) rats, the mean blood glucose level was 6,4 mmol/L (7,1 mmol/L) at 15 minutes after glucose administration and 6,0 mmol/L (6,2 mmol/L) at 120 minutes (Fig. 2,A). IP glucose tolerance tests showed that HCD fed rats had impaired glucose clearance compared to standard food fed rats, as indicated by a significantly greater area under the glucose curve (Fig. 2,A,B).

Prediabetes defined as impaired fasting glucose or impaired glucose tolerance is associated with an increased risk of composite cardiovascular events, coronary heart disease, stroke, and all cause mortality. In this regard, during the prevention of obesity should pay attention not only to normalize body weight but in maintaining glucose at normal levels. In groups of animals (Control_BNC and HCD_BNC) were observed glucose intolerance. Such data provide basis for further study of the bionanocomposite as a possible means for prevention and treatment of obesity.

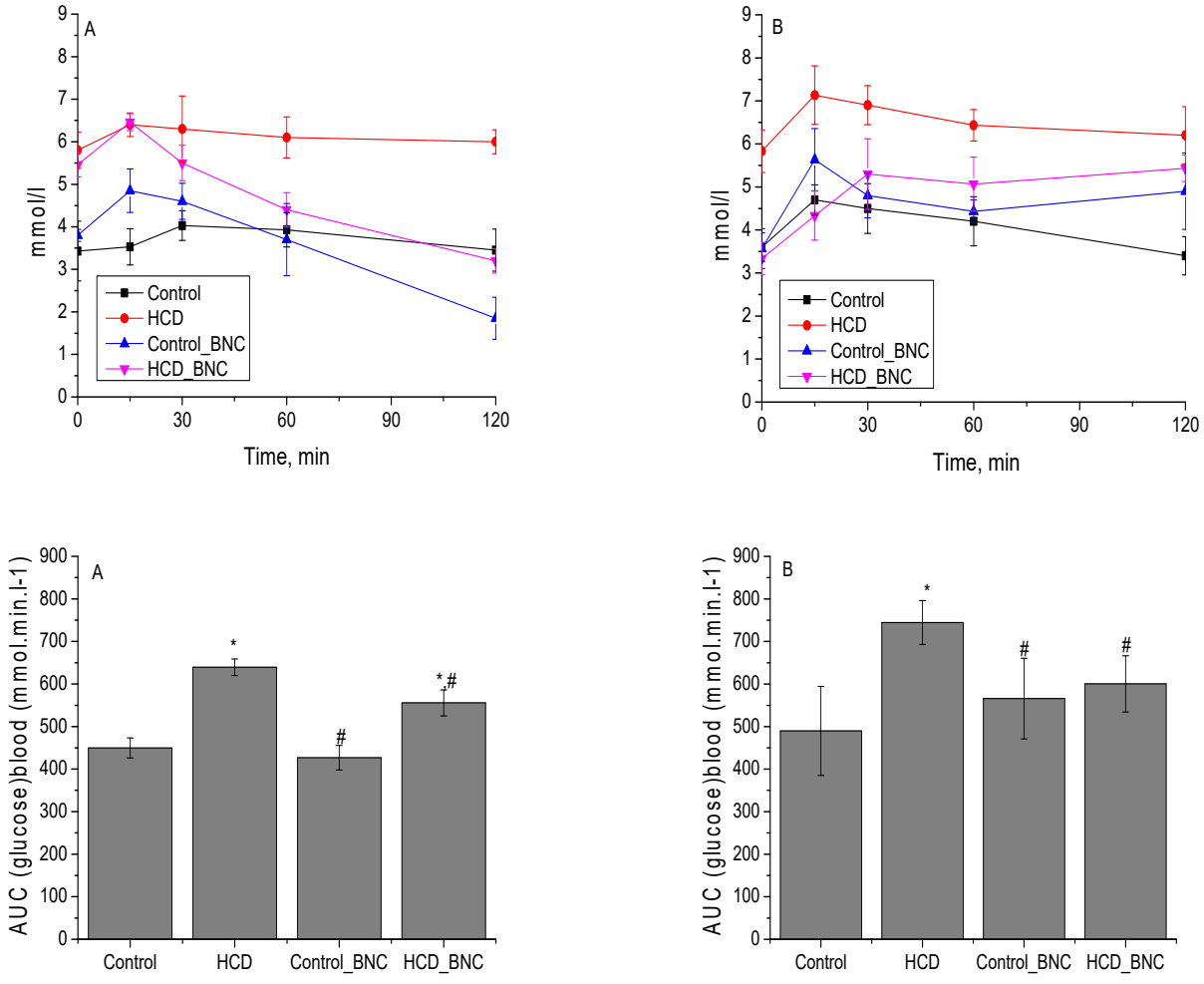


Fig. 2. Effect of BNC on glucose tolerance in normal and obese rats (A-female, B-male)

Top panels show plasma glucose concentration curves as a function of time, and bottom panels show areas under the curves. Means ± standard errors (n = 6) are shown (* $p < 0.05$ in comparison with control group; ** $p < 0.05$ in comparison with HCD group).

References

1. *Barness L. A.* Obesity: Genetic, molecular, and environmental aspects / L.A. Barness, J.M. Opitz, E. Gilbert-Barness // Med Genet., 2007. – № 143A. – P. 3016–3034.

2. *Obesity* and obesity-related secondary conditions in adolescents with intellectual/developmental disabilities / J.H. Rimmer, K. Yamaki, B.M. Lowry et al. // J. Intellect Disabil Res., 2010. – № 54(9). – P. 787–794.

3. *Onakpoya I.* Chromium supplementation in overweight and obesity: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials / I. Onakpoya, P. Posadzki, E. Ernst // Obes Rev., 2013. – № 14(6). – P. 496–507.

4. *Obesity* and the lung: 1 / K.M. McClean, F. Kee, I.S. Young, J.S. Elborn // Epidemiology Thorax, 2008. – № 63 – P. 649–654.

5. *Singh S.* Potential of Herbs in Prevention of Obesity : A Review Article / S. Singh, S. Mishra // IJHSR, 2013. – №3(12) – P. 159–167.

6. *Acetylcholinesterase* enzyme inhibitory potential of standardized extract of Trigonella foenum graecum L and its constituents / N. Satheeshkumar, P.K. Mukherjee, S. Bhadra et al. // Phytomedicine, 2010. – №17(3-4). – P. 292–295.

7. *Fenugreek* seeds reduce aluminum toxicity associated with renal failure in rats / Yosra Beland-Nouira, Hayfa Bakhta, Zohra Haouas et al. // Nutr Res. Pract., 2013. – №7(6) – P. 466–474.

8. *Effects* of Fenugreek Seed Extract and Swimming Endurance Training on Plasma Glucose and Cardiac Antioxidant Enzymes Activity in Streptozotocin-induced Diabetic Rats Osong Public / Sajad Arshadi, Salar Bakhtiyari, Karimeh Haghani et al. // Health Res. Perspect, 2015 – № 6(2). – P. 87–93.

9. *Neeraja A.* Hypoglycemic effect of processed fenugreek seeds in humans / A. Neeraja, P. Rajyalakshmi // J. Food Sci. Technol., 1996 – № 33. – P. 427–430.

10. *High-Calo*rie Diet as a Factor of Prediabetes Development in Rats / T.P. Karpovets, V.V. Konopelnyuk, T.I. Galenova et al. // Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2013. – Vol. 156, N 5. – P. 639–641.

11. *Food* behavior of rats under development of obesity / T.P. Karpovets, V.V. Konopelnyuk, O.M. Savchuk, L.I. Ostapchenko // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 2014. – № 5(5). – P. 253–259.

12. *The development* of obesity and prediabetes under conditions of longterm consumption of fructose solution in rats / V. Konopelnyuk, A. Yurchenko, T. Karpovets, L. Ostapchenko // Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2015. – № 5(1). – P. 001–005.

13. *Vitamin* E regulates adipocytokine expression in a rat model of dietary-induced obesity / Xiu-Hua Shen, Qing-Ya Tang, Juan Huang, Wei Cai // Experimental Biology and Medicine, 2010. – № 235. – P. 47–51.

14. *Association* between prediabetes and risk of cardiovascular disease and all cause mortality: systematic review and meta-analysis / Yuli Huang, Xiaoyan Cai, Weiyi Mai et al. // BMJ, 2016. – № 355. –P. i5953.

15. *DeFronzo R. A.* Assessment and treatment of cardiovascular risk in prediabetes: impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose / R.A. DeFronzo, M. Abdul-Ghani // Am. J. Cardiol., 2011. – № 108(Suppl). – P. 3B–24B.

16. *World* Health Organization (WHO) Consultation. Definition and diagnosis of diabetes and intermediate hyperglycaemia, 2006

17. *Expert* Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus / Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus // Diabetes Care 2003. – № 26(Suppl 1). – S. 5-20.

References (Scopus)

1. Barness L.A., Opitz J.M., Gilbert-Barness E. Obesity: Genetic, molecular, and environmental aspects. Med Genet. 2007;143:3016-34.

2. Rimmer J.H., Yamaki K., Lowry B.M., Wang E., Vogel L.C. Obesity and obesity-related secondary conditions in adolescents with intellectual developmental disabilities. J Intellect Disabil Res. 2010;54(9):787-94.

3. Onakpoya I., Posadzki P., Ernst E. Chromium supplementation in overweight and obesity: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. Obes Rev. 2013;14(6):496-507.

4. McClean KM, Kee F, Young IS, Elborn JS. Obesity and the lung: 1. Epidemiology. Thorax 2008;63:649-54.

5. Singh S, Mishra S. Potential of Herbs in Prevention of Obesity- A Review Article. IJHSR. 2013; 3(12):159-167.

6. Satheeshkumar N, Mukherjee PK, Bhadra S, et al. Acetylcholinesterase enzyme inhibitory potential of standardized extract of Trigonella foenum graecum L and its constituents. Phytomedicine.2010; 17(3-4):292-295.

7. Yosra Beland-Nouira, Hayfa Bakhta, Zohra Haouas, et al. Fenugreek seeds reduce aluminum toxicity associated with renal failure in rats Nutr Res Pract. 2013; 7(6):466-474.

8. Sajad Arshadi, Salar Bakhtiyari, Karimeh Haghani, et al. Effects of Fenugreek Seed Extract and Swimming Endurance Training on Plasma Glucose and Cardiac Antioxidant Enzymes Activity in Streptozotocin-induced Diabetic Rats Osong Public Health Res Perspect. 2015; 6(2):87-93.

9. Neeraja A, Rajyalakshmi P. Hypoglycemic effect of processed fenugreek seeds in humans. J Food Sci Technol. 1996; 33:427-430.

10. T. P. Karpovets, V. V. Konopelnyuk, T. I. Galenova, A. N. Savchuk, and L. I. Ostapchenko.High-Calorie Diet as a Factor of Prediabetes Development in Rats. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2013; 156(5):639-641.

11. Karpovets TP, Konopelnyuk VV, Savchuk OM, Ostapchenko LI. Food behavior of rats under development of obesity. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2014; 5(5):253-259.

12. Konopelnyuk V, Yurchenko A, Karpovets T, Ostapchenko L. The development of obesity and prediabetes under conditions of longterm consumption of fructose solution in rats. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2015; 5(1):001-005.

13. Xiu-Hua Shen, Qing-Ya Tang, Juan Huang, Wei Cai. Vitamin E regulates adipocytokine expression in a rat model of dietary-induced obesity. Experimental Biology and Medicine. 2010; 235:47-51.

14. Yuli Huang, Xiaoyan Cai, Weiyi Mai, Meijun Li, Yunzhao Hu. Association between prediabetes and risk of cardiovascular disease and all cause mortality: systematic review and meta-analysis BMJ. 2016; 355: i5953.

15. DeFronzo RA, Abdul-Ghani M. Assessment and treatment of cardiovascular risk in prediabetes: impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. Am J Cardiol. 2011;108(Suppl):3B 24B.

16. World Health Organization (WHO) Consultation. Definition and diagnosis of diabetes and intermediate hyperglycaemia. 2006

17. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care. 2003;26(Suppl 1):S5-20.

Submitted on 13.12.16

Є. Голобородько, асп., В. Конопельнюк, канд. біол. наук, Л. Остапченко, д-р біол. наук,
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

СТАН ГІПЕРГЛІКЕМІЇ ТВАРИН В УМОВАХ СПОЖИВАННЯ ВИСОКОКАЛОРІЙНОЇ ДІЄТИ З ДОДАВАННЯМ БІОНАНОКОМПОЗИТУ

Визначено вміст глюкози в крові щурів і проведено глюкозотолерантний тест за умов розвитку ожиріння, індукованого споживанням висококалорійної дієти. Досліджено дані показники в крові тварин, які споживали висококалорійну дієту з додаванням біонанокомпозиту. Отримані дані свідчать про профілактичний ефект біонанокомпозиту на розвиток основних показників передіабету.

Ключові слова: глюкоза, глюкозо-толерантний тест, біонанокомпозит, профілактика, ожиріння.

Є. Голобородько, асп, В. Конопельнюк, канд. биол. наук, Л. Остапченко, д-р биол. наук,
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев. Украина

СОСТОЯНИЕ ГИПЕРГЛИКЕМИИ ЖИВОТНЫХ В УСЛОВИЯХ ПОТРЕБЛЕНИЯ ВЫСОКОКАЛОРИЙНОЙ ДИЕТЫ С ДОБАВЛЕНИЕМ БИОНАНОКОМПОЗИТА

Было определено содержание глюкозы в крови крыс и проведен глюкозо толерантный тест в условиях развития ожирения, индуцированного потреблением высококалорийной диеты. Также были исследованы данные показатели в крови животных, которые потребляли высококалорийную диету с добавлением бионанокомпозита. Полученные данные свидетельствуют о профилактическом эффекте бионанокомпозита на развитие основных показателей передиабета.

Ключевые слова: глюкоза, глюкозо-толерантный тест, бионанокомпозит, профилактика, ожирение.

УДК 616.7:577.151.63

Є. Тіхова, асп., М.Тимошенко, канд. біол. наук, Ю. Ковельська, студ., К. Дворщенко, д-р біол. наук,
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

СТАН ГЛУТАТІОНОВОЇ СИСТЕМИ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ АРТРОЗІ ТА ПРИ ВВЕДЕННІ ХОНДРОЇТИНА СУЛЬФАТУ

Встановлено, що при остеоартрозі, індукованого введенням монойодацетату натрію у сироватці крові щурів знижуються активності ферментів глутатіонової системи – глутатіонпероксидази, глутатіонтрансферази, глутатіонредуктази і змінюється співвідношення окисненої та відновленої форм глутатіону в бік окиснення. Виявлено, що при введенні препарату на основі хондроїтина сульфату натрію в сироватці крові щурів із хімічно викликаним остеоартрозом зростають активності досліджуваних ферментів і нормалізується співвідношення форм глутатіону.

Ключові слова: остеоартроз, окиснення, глутатіон, хондроїтина сульфат.

Вступ. Остеоартроз – хронічне захворювання суглобів, пов'язане із поступовою дистрофією хряща внаслідок розвитку запалення. Перші ознаки захворювання часто реєструються у пацієнтів віком від 30 років. Початок захворювання характеризується порушенням обміну речовин та активацією окисних процесів в синовіоцитах та хондроцитах [1]. Спостерігається зниження еластичності суглобового хряща через часткову чи повну втрату протеогліканів внаслідок механічних травм чи порушення синтетичних процесів в хондроцитах при окисному стресі [2]. Вільні радикали безпосередньо та через цитокін – індуковане підвищення концентрації та активності матриксних металопротеїназ стимулюють хондро- та остеорезорбцію, викликають фрагментацію гіалуронової кислоти та хондроїтина сульфату [3].

Внаслідок дії прозапальних цитокінів та активації сигнальних каскадів в клітинах синтезується надлишки перекису водню, супероксид-аніону та оксиду азоту, які активують колагеназу та пригнічують інгібітори протеаз, викликають перекисне окиснення ліпідів мембран, пошкоджують ферменти, структурні білки та руйнують нуклеїнові кислоти [4]. Глутатіонова система захищає компоненти клітини від окиснення. Основним антиоксидантом є відновлений глутатіон – низькомолекулярний тіол, що виступає донором водню в окисно-відновних реакціях [5]. У відновленій формі глутатіон хімічно взаємодіє з активними формами кисню, руйнує вільні радикали, видаляє ацилпероксиди з мембран. В якості кофактора він входить до складу ферментів глутатіонової системи, які знешкоджують перекис водню (глутатіонпероксидаза), ліпоперекиси мембран та ксенобіотики (глутатіонтрансфераза), підтримують пул відновленого глутатіону (глутатіонредуктаза), забезпечуючи комплексний антиоксидантний захист [6].

Тому метою дослідження було визначити вплив хондропротекторного препарату на основі хондроїтина сульфату на стан антиоксидантної глутатіонової системи в сироватці крові щурів з монойодацетат натрію – індукованим артрозом.

Матеріали і методи. Роботу було виконано на білих нелінійних щурах обох статей масою 180-240 г, що утримувались на стандартному раціоні віварію. 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. Кожна група включала по 7 тварин кожної статі. Експеримент ставили за схемою: група "Контроль" – контрольні щури, яким в перший день в обидва коліна крізь колінну зв'язку кололи по 50 мкл 0,9 % розчину NaCl; група "МІА" (монойодацетат натрію) – щури, яким в перший день вводили в праве коліно 3 мг монойодацетату натрію, розчиненого у 50 мкл 0,9 % розчину NaCl, в ліве коліно – 50 мкл 0,9 % розчину NaCl крізь колінну зв'язку; тварини групи "Драстоп" слугували в якості негативного контролю на препарат, їм в перший день в обидва коліна крізь колінну зв'язку кололи по 50 мкл 0,9 % розчину NaCl і додатково застосовували внутрішньом'язево препарат на основі хондроїтина сульфату "Драстоп" 1 раз на добу протягом 25 діб; тваринам групи "МІА + Драстоп" в перший день вводили в праве коліно 3 мг монойодацетату натрію, розчиненого у 50 мкл 0,9 % розчину NaCl, в ліве коліно – 50 мкл 0,9 % розчину NaCl крізь колінну зв'язку і проводили терапію "Драстопом" 1 раз на добу протягом 25 діб. При розрахунку дози препарату для тварин використовували коефіцієнти перерахунку доз (мг/кг) з тварин на людину [7]. Забій щурів та забір сироватки крові проводили на 30 день після початку експерименту.

У сироватці крові визначали наступні показники. Вміст білка вимірювали за методом Лоурі [8]. Активність глутатіонпероксидази визначали спектрофотометрично за підвищенням вмісту окисленого глутатіону. Активність глутатіонтрансферази визачали за накопиченням оптично активного кон'югату з 1-хлор-2,4-динітробензолом. Активність глутатіонредуктази оцінювали в реакції відновлення окисленого глутатіону за зниженням рівня NADPH [9]. Вміст відновленого та окисленого глутатіону визначали спектрофлюори-метричним методом із використанням ортофталевого альдегіду за різних значень pH середовищ [10, 11]. Вимірювання проводили на спектрофлуориметрі RF–510 (Shimadzu, Японія). Статистичну обробку результатів дослідження проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Вірогідність різниці між контрольними та дослідними вимірами оцінювали методом однофакторного дисперсійного аналізу. Достовірними вважали результати при $p<0,05$ [12].

Результати та обговорення. В ході проведених експериментів встановлено, що у групі щурів з МІА – індукованим остеоартрозом в сироватці крові знижуються активності ферментів глутатіонової системи – активність глутатіонпероксидази знижується у 1,4 раза, активність глутатіонтрансферази – в 1,3 раза, активність глутатіонредуктази в 1,2 раза відносно контрою. При розвитку експериментального запалення суглобів у сироватці крові порушується співвідношення окисленого і відновленого глутатіону. Так, вміст відновленого глутатіону знижується в 1,4 раза, а вміст окисленого зростає в 1,3 раза відносно відповідних показників контрольної групи.

Негативний контроль на препарат показав, що хондроїтина сульфат не змінює рівновагу глутатіонової системи в сироватці порівняно з контрольною групою.

Після терапії препаратом тварин з експериментально викликаним остеоартрозом виявлено підвищення активностей ферментів глутатіонової системи – активність глутатіонпероксидази зросла у 1,3 раза, активність глутатіонтрансферази – в 1,4 раза, активність глутатіонредуктази в 1,7 раза відносно відовідних показників сироватки крові хворих тварин групи МІА. Встановлено, що препарат на основі хондроїтина сульфату відновлює співвідношення окисленого і відновленого

© Тіхова Є., Тимошенко М., Ковельська Ю., Дворщенко К., 2017

глутатіону у сироватці крові щурів з експериментальним остеоартрозом. Так, вміст відновленого глутатіону підвищується в 1,5 раза, вміст окисленого не змінюється відносно відповідних показників групи МІА (табл. 1).

***Таблиця* 1. Глутатіонова система у сироватці крові щурів при остеоартрозі (M±m, n=7)**

Показник \ Група	Контроль	Драстоп	МІА	МІА+Драстоп
Глутатіонпероксидазна активність, нмоль GSHЧхв$^{-1}$ Чмг білка$^{-1}$	32,57 ± 2,95	35,29 ± 3,14*	23,56 ± 2,17*	29,75 ± 2,38**
Глутатіонтрансферазна активність, нмоль Чхв$^{-1}$ Чмг білка$^{-1}$	7,29 ± 0,07	7,97 ± 0,08*	5,66 ± 0,54*	8,15 ± 0,74**
Глутатіонредуктазна активність, нмоль НАДФНЧхв$^{-1}$ Чмг білка$^{-1}$	0,38 ± 0,03	0,41 ± 0,03*	0,32 ± 0,03*	0,53 ± 0,05**
Глутатіон відновлений, нмоль Чмг білка$^{-1}$	20,59 ± 1,82	21,62 ± 1,75*	15,06 ± 1,42*	22,93 ± 1,94**
Глутатіон окиснений, нмоль Чмг білка$^{-1}$	6,59 ± 0,61	6,56 ± 0,63*	8,63 ± 0,81*	7,95 ± 0,75**

* – $p < 0,05$, відносно контрольних показників відповідних груп
** – $p < 0,05$, відносно показників групи "МІА"

Глутатіонпероксидаза каталізує реакції відновлення пероксиду водню до води та органічних гідропероксидів (ROOH) до гідроксипохідних, і в результаті переходить в окислену дисульфідну форму GS-SG. На відміну від каталази, яка локалізована в пероксисомах, фермент функціонує в цитозолі та мітохондріях і має вищу спорідненість до перекису. Фермент відновлює різні органічні ліпідні пероксили, які утворюються в організмі при активації перекисного окиснення ліпідів, такі як гідропероксид лінолевої і ліноленової кислот, холестерин-7β-гідропероксид і деякі синтетичні речовини (кумен-, трет-бутил-гідропероксиди), захищаючи від окисної атаки білки, ліпіди, НАДФН, НАДН. Відновлення ферменту відбувається за участі глутатіонредуктази та відновленого глутатіону [13]. В клініці у хворих на системні захворювання сполучної тканини с ураженням суглобів спостерігається знижений антиоксидантний статус з низькою активністю глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази еритроцитів при низькому рівні відновленої форми глутатіону на тлі підвищеного рівня оксиду азоту в плазмі крові [14, 15].

За останні 30 років було доведено, що глутатіон S-трансферази використовують відновлений глутатіон не лише для знешкодження ксенобіотиків та екзогенних електрофільних сполук, а й регулюють сигнальні шляхи, які активуються кінцевим продуктом окиснення n-6-поліненасичених жирних кислот – 4-гідрокси-транс 2-ноненалем, вторинним месенджером, який впливає на активацію транскрипційних факторів/репресорів. Низькі рівні гідроксіноненала активують клітинну проліферацію, синтез білків та ДНК, високі рівні, які досягаються при розвитку перекисного окиснення ліпідів, запускають механізми апоптозу. Встановлено, що в клітинах ця сполука впливає на токсичність окисного стресу, її гідроксильна група група взаємодіє з нуклеофільними групами білків, нуклеїнових кислот та фосфоліпідів. Було показано, що глутатіон S-трансферази використовують гідроксіноненал як субстрат, ферменти регулюють клітинні рівні гідроксіноненала, пригнічуючи його утворення в процесі перекисного окислення ліпідів, а також знижують вміст за допомогою кон'югації з відновленим глутатіоном (GSH) та АТФ-залежного експорту кон'югатів [16, 17]. Відомо, що у людей при остеоартрозі активність глутатіон S-трансферази знижується на фоні посилення окисного стресу [18].

Окиснений глутатіон (GSSH) відновлюється глутатіонредуктазою за участі NADPH. Помічено, що у людей з остеоартрозом активність цього ферменту знижена, відповідно, знижено вміст відновленого глутатіону (GSH) на фоні активації окисних процесів. Пригнічення відновлення глутатіону та розвиток окисного стресу призводить до зниження синтезу протеогліканів та гіалуронової кислоти – компонентів матриксу хряща [19].

На сьогодні дослідженнями *in vivo* та *in vitro* показано, що хондроїтина сульфат здатен проникати у тканини суглобових хрящів та стимулювати синтез колагену II типу та протеогліканів: аутосинтез та синтез гіалуронової кислоти; може зв'язуватись з toll-подібним рецептором (TLR)-4 та інгібувати синтез прозапальних цитокінів MyD88 та TRAF-6 через пригнічення ядерної транслокації NF-kB; знижувати експресію ADAMTS-4 та 5 (аггреканаз), інтерлейкінів IL-1b та (IL)-6, активацію iNOS, матриксних металопротеїназ (MMP-1, −3 -9 та −13), мікросомальної синтази простогландинів (mPGES)-1, циклооксигенази 2 та синтез простагландину (PG) E_2; знижувати швидкість апоптозу хондроцитів через зниження транслокації NF-κB, пригнічення активності MAP-кіназного сигнального шляху через p38 та Erk1/2, інгібування експресії, вмісту та активностей каспаз 3 та 7 [20, 21].

Висновки. Таким чином, в ході проведених експериментальних досліджень встановлено, що в сироватці крові щурів при монойодацетат натрію – індукованому остеоартрозі знижуються активності ферментів глутатіонової системи – глутатіонпероксидази, глутатіонтрансферази, глутатіонредуктази та змінюється співвідношення окисненої та відновленої форм глутатіону в бік окиснення у порівнянні з відповідними показниками контрольних тварин. Застосування препарату на основі хондроїтина сульфату натрія призвело до відновлення стану глутатіонової антиоксидантної системи у сироватці крові щурів з експериментальним остеоартрозом, що свідчить про позитивну дію препарату "Драстоп" на антиоксидантну систему організму, що робить його ефективним у лікуванні остеоартрозу.

Список використаних джерел

1. *Arthrosis* of the knee in chronic anterior laxity / H. Dejour et al. // Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research, 2014. – Vol. 100, № 1. – P. 49-58.

2. *eNAMPT* is localised to areas of cartilage damage in patients with hip osteoarthritis and drives cartilage catabolism leading to proteoglycan loss and inflammation. / A. M. Philp et al. // Osteoarthritis and Cartilage, 2016. – № 24. – P. 388.

3. *Иманаева А. Я.* Патогенетическое обоснование применения антиоксидантов в лечении ревматоидного артрита / А. Я. Иманаева, Л.Н. Залялютдинова // Современные проблемы науки и образования, 2013. – № 2.

4. *Mechanical* and oxidative stress in osteoarthritis / N. Yui et al. // The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine, 2016. – 5, №. 1. – P. 81-86.

5. *Meister A.* Glutathione / A. Meister , M.E. Anderson // Ann. Rev. Biochem., 1983. – 52. – P. 711–760.

6. *Кулинский В.И.* Система глутатиона 1. Синтез, транспорт глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы / В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко // Биомед. химия, 2009. – 55, №. 3. – С. 255–277.

7. *Гуськова Т. А.* Доклиническое токсикологическое изучение лекарственных средств как гарантия безопасности проведения их клинических исследований / Т.А. Гуськова // Токсикологический вестник, 2010. – №. 5. – С. 2-5.

8. *Hartree E. F.* Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response / E. F. Hartree // Analytical biochemistry, 1972. – 48, №. 2. – P. 422-427.

9. *Власова С. Н.* Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей / С.Н. Власова // Лаб. дело, 1990. – №. 8. – С. 19–22

10. *Hissin P. J.* A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues / P.J. Hissin // Analytical Biochemistry, 1976. – 74, №.1. – P. 214–226.

11. *Mokrasch L.C.* Glutathione content of cultured cells and rodent brain regions: a specific fluorometric assay / L.C. Mokrasch // Analytical Biochemistry, 1984. – 140, №. 2. – P. 506–509.

12. *Наследов А. Д.* Математические методы психологического исследования / А. Д. Наследов // СПб. : Речь, 2006. – С. 166.

13. *Tappel A.* Selenium-glutathione peroxidase: properties and synthesis / A. Tappel // Current topics in cellular regulation, 2014. – Vol. 24. – P. 87-96.

14. *Оценка* проявлений окислительно-нитрозильного стресса при системных заболеваниях соединительной ткани / Л. А. Александрова и др. // Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, 2016. – 23, № 1. – С. 26-29.

15. *Paglia D. E.* Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase / D.E. Paglia, W.N. Valentine // Translational Research., 1967. – 70, № 1. – P. 158-169.

16. *Antioxidant* role of glutathione S-transferases: 4-Hydroxynonenal, a key molecule in stress-mediated signaling / S.S. Singhal et. al. // Toxicol. Appl. Pharmacol., 2015. – 289. – P. 361-370.

17. *Regulatory* roles of glutathione-S-transferases and 4-hydroxynonenal in stress-mediated signaling and toxicity / Y. C. Awasthi et al. // Free Radical Biology and Medicine, 2016.

18. *Kullich W.* Effect of the NSAID nimesulide on the radical scavenger glutathione S-transferase in patients with osteoarthritis of the knee / W. Kullich, N. Fagerer, H. Schwann // Curr. Med. Res. Opin., 2007. – Vol. 23. – P. 1981–1986.

19. *Impact* of obesity on status of glutathione reductase activity and inflammatory response in patients with knee osteoarthritis / R.M. Shaat et al. // International Journal, 2015. – Vol. 3, № 9. – P. 609-616.

20. *Glycosaminoglycans* modulate inflammation and apoptosis in LPS-treated chondrocytes / G. M. Campo et al. // Journal of cellular biochemistry, 2009. – 106, №. 1. – P. 83-92.

21. *Chondroitin* sulfate in the treatment of osteoarthritis: from in vitro studies to clinical recommendations / Y. Henrotin et al. // Therapeutic advances in musculoskeletal disease, 2010. – 2, №. 6. – P. 335-348.

References

1. Dejour H. et al. Arthrosis of the knee in chronic anterior laxity. Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research 2014;100(1):49-58.

2. Philp A. M. et al. eNAMPT is localised to areas of cartilage damage in patients with hip osteoarthritis and drives cartilage catabolism leading to proteoglycan loss and inflammation. Osteoarthritis and Cartilage 2016;(24):388.

3. Иманаева А. Я., Залялютдинова Л. Н. Патогенетическое обоснование применения антиоксидантов в лечении ревматоидного артрита. Современные проблемы науки и образования 2013;(2).

4. Yui N. et al. Mechanical and oxidative stress in osteoarthritis. The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine 2016;5(1):81-86.

5. Meister A., Anderson M.E. Glutathione. Ann. Rev. Biochem. 1983;52:711–760.

6. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Система глутатиона 1. Синтез, транспорт глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы. Биомед. Химия 2009;55(3):255–277.

7. Гуськова ТА. Доклиническое токсикологическое изучение лекарственных средств как гарантия безопасности проведения их клинических исследований. Токсикологический вестник 2010;5:2-5.

8. Hartree EF. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Analytical biochemistry 1972;48(2):422-427.

9. Власова С.Н. Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей. Лаб. Дело 1990;(8):19–22.

10. Hissin P.J. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. Analytical Biochemistry 1976;74(1):214–226.

11. Mokrasch L.C. Glutathione content of cultured cells and rodent brain regions: a specific fluorometric assay. Analytical Biochemistry 1984;140(2):506–509.

12. Наследов АД. Математические методы психологического исследования. СПб.: Речь 2006;166.

13. Tappel A. Selenium-glutathione peroxidase: properties and synthesis. Current topics in cellular regulation 2014;24:87-96.

14. Александрова Л. А. и др. Оценка проявлений окислительно-нитрозильного стресса при системных заболеваниях соединительной ткани. Ученые записки СПбГМУ им. акад. ИП Павлова 2016;23(1):26-29.

15. Paglia D. E., Valentine W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. Translational Research 1967;70(1):158-169.

16. S.S. Singhal, S.P. Singh, P. Singhal, D. Horne, J. Singhal, S. Awasthi, Antioxidant role of glutathione S-transferases: 4-Hydroxynonenal, a key molecule in stress-mediated signaling, Toxicol. Appl. Pharmacol. 289 (2015) 361-370.

17. Awasthi Y. C. et al. Regulatory roles of glutathione-S-transferases and 4-hydroxynonenal in stress-mediated signaling and toxicity. Free Radical Biology and Medicine 2016.

18. Kullich W, Fagerer N, Schwann H. Effect of the NSAID nimesulide on the radical scavenger glutathione S-transferase in patients with osteoarthritis of the knee. Curr Med Res Opin 2007;23:1981–1986.

19. Shaat R. M. et al. Impact of obesity on status of glutathione reductase activity and inflammatory response in patients with knee osteoarthritis. International Journal 2015;3(9):609-616.

20. Campo G. M. et al. Glycosaminoglycans modulate inflammation and apoptosis in LPS-treated chondrocytes. Journal of cellular biochemistry 2009;106(1):83-92.

21. Henrotin Y. et al. Chondroitin sulfate in the treatment of osteoarthritis: from in vitro studies to clinical recommendations. Therapeutic advances in musculoskeletal disease 2010;2(6):335-348.

Надійшла до редколегії 15.02.17

Е. Тихова, асп., Н. Тимошенко, канд. биол. наук,
Ю. Ковельская, студ., К. Дворщенко, д-р биол. наук,
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

СОСТОЯНИЕ ГЛУТАТИОНОВОЙ СИСТЕМЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АРТРОЗЕ И ПРИ ВВЕДЕНИИ ХОНДРОИТИНА СУЛЬФАТА

Установлено, что при остеоартрозе, индуцированного введением монойодацетата натрия в сыворотке крови крыс снижаются активности ферментов глутатионовой системы – глутатионпероксидазы, глутатионтрансферазы, глутатионредуктазы и меняется соотношение окисленной и восстановленной форм глутатиона в сторону окисления. Обнаружено, что при введении препарата на основе хондроитина сульфата натрия в сыворотке крови крыс с химически вызванным остеоартрозом растут активности исследуемых ферментов и нормализуется соотношение форм глутатиона.

Ключевые слова: остеоартроз, окисления, глутатион, хондроитина сульфат.

E. Tikhova, Ph. D. stud., N. Tymoshenko, Ph. D.,
Y. Kovelska, stud., K. Dvorshenko, D. Sci.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

CONDITION OF GLUTATHIONE SYSTEM IN THE SERUM OF RATS IN EXPERIMENTAL OSTEOARTHRITIS AND ADMINISTRATION OF CHONDROITIN SULPHATE

It was established that in osteoarthritis induced by administering of sodium monoiodacetate in the blood serum of rats glutathione system enzyme activities reduced – glutathione peroxidase, glutathione, oxidized glutathione and the ratio of redox glutathione forms moved towards oxidation. It has been found that after the introduction of the drug based on the sodium chondroitin sulphate enzyme activities grew and glutathione balance normalized in the serum of rats with chemically induced osteoarthritis.

Keywords: osteoarthritis, oxidation, glutathione, chondroitin sulfate.

УДК: 661.8.67:577.112.85:57.083.3:591.16

М. Храбко, асп., Р. Федорук, д-р вет. наук, проф., С. Кропивка, канд. с-г наук,
Інститут біології тварин НААН, Львів

ПОКАЗНИКИ СТАНУ ІМУННОЇ ТА АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМ У КРОВІ ВАГІТНИХ САМИЦЬ ЩУРІВ F_1 ПІД ДІЄЮ РІЗНИХ ДОЗ ЦИТРАТУ ГЕРМАНІЮ

Досліджено вплив різних доз цитрату Ge, отриманого методами нанотехнології і хімічного синтезу, на активність імунної та антиоксидантної систем крові вагітних самиць щурів. Дослідження виконано на самицях щурів F_1, яким випоювали з водою цитрат Ge у дозах 10 (II), 20 (III), 200 (IV) мкг Ge, отриманий нанотехнологічним методом, і 2000 (V) мкг Ge – хімічно синтезований. Цитрат Ge застосовували від молочного періоду до 18-20 доби вагітності. Виявлено неоднаковий вплив цитрату Ge на показники імунної та антиоксидантної систем з підвищенням вмісту імунних глобулінів, глікопротеїнів та активності ензимів антиоксидантного захисту, що більше виражено у самиць які отримували 20 мкг Ge. Встановлено інгібуючий вплив цитрату Ge в дозі 2 мг/кг на вміст альбуміну та триацилгліцеролів на тлі підвищення рівня креатиніну у крові вагітних самиць.

Ключові слова: цитрат германію; кров; щурі; імунофізіологія.

Вступ. Мікроелементи відіграють важливу роль у функціонуванні живого організму, оскільки каталізують процеси обміну речовин та активують функції гормонів, вітамінів, ферментів. Одним із таких мікроелементів є Германій, який використовується у біології, медицині та ветеринарії [1-3]. З літературних джерел відомо, що найменш токсичним є цитрат Ge, отриманий методом нанотехнології [4]. Як мікроелемент, Ge володіє імуностимулюючою, антиоксидантною, антигіпертензивною, протизапальною та знеболюючою властивостями [5–7]. Імуностимулююча дія Ge характеризується індукцією γ-інтерферону, що бере участь в імунокорекції Т-клітин і макрофагів, тоді як імунодепресивна дія виявляється пригніченням синтезу антитіл. Завдяки таким властивостям органічні сполуки Ge застосовуються в медицині у якості імуномодуляторів та антиоксидантів для покращення загального стану організму, а також для посилення кровопостачання органів і тканин та забезпечення їх O_2 [5, 7, 9]. Доведено, що в організмі органічні сполуки Ge беруть участь у транспортуванні O_2 до тканин, попереджуючи розвиток гіпоксії на тканинному рівні [5, 7-9]. Однак даних щодо впливу органічних сполук Ge на перебіг фізіолого-біохімічних процесів в організмі вагітних самиць, крім наших досліджень, не виявлено. Зокрема, результати раніше проведених нами досліджень вказують на стимулюючий вплив цитрату германію, отриманого методом нанотехнології, на імунобіологічну реактивність організму самиць щурів F_0 і його репродуктивну і детоксикаційну функцію [2, 10]. Характерним є також дозозалежні відмінності впливу цитрату Ge, отриманого методом нанотехнології та хімічного синтезу, на фізіолого-біохімічні показники крові, розвиток внутрішніх органів та цілого організму самців щурів F_1 з їх приплоду [11]. Метою цих досліджень було вивчення впливу різних доз цитрату Ge, отриманого методами нанотехнології та хімічного синтезу, на активність імунної та антиоксидантної систем і деякі біохімічні показники крові організму самиць щурів F_1 у період вагітності.

Матеріали і методи. Дослідження проведені у віварії Інституту біології тварин НААН на білих лабораторних щурах-самицях, поділених на п'ять груп за принципом аналогів, по 4-5 тварин у кожній. І група – контрольна, отримувала збалансований стандартний раціон (СР) зі згодовуванням гранульованого комбікорму впродовж усього періоду досліджень і споживанням води без обмеження. Тваринам II – IV дослідних груп згодовували корми СР і випоювали з водою наногерманій цитрат (HGeЦ), виготовлений нанотехнологічним методом [12], у таких кількостях (мкг Ge/кг маси тіла): II – 10; III – 20; IV – 200. Тварини V групи отримували СР + 2000 мкг Ge/кг м. т. з цитрату германію хімічно синтезованого (ЦGeXC). Водний розчин наногерманію цитрату, у концентрації 1,2 г/дм^3, pH 1,30 отриманий від ТОВ "Наноматеріали та нанотехнології", м. Київ. Хімічно синтезований цитрат германію (біс(цитрато)германатна кислота) з концентрацією 1,452 г Ge/0,1 дм^3, pH 0,31, був виготовлений співробітниками кафедри загальної хімії та полімерів Одеського національного університету імені І. І. Мечникова. Надходження HGeЦ і ЦGeXC в організм щурів F_1 дослідних груп тривало впродовж лактації самиць F_0 (з материнським молоком) і спожитою водою після виходу з гнізда, у період фізіологічного і статевого дозрівання та запліднення і завершувалося на 18-20 доби вагітності. Природне парування проводили у віці 4–4,5 місяці з розрахунком 1 самець на 2-3 самиці. На 18–20 доби вагітності відповідно до міжнародних [13] і національних [14] вимог від всіх самиць після наркозу, знерухомлення та розтину черевної і грудної порожнин, отримували кардіальну кров. У змішаній крові визначали вміст імуноглобулінів нефелометричним методом, молекул середньої маси (МСМ), циркулюючих імунних комплексів (ЦІК), гексоз, зв'язаних з білками, сіалових кислот, церулоплазміну та активність каталази, супероксиддисмутази (СОД), глутатіонпероксидази (ГП), гідропероксидів ліпідів (ГПЛ) і ТБК-активних продуктів за методиками, що описані у довіднику [15], а також концентрацію альбуміну, креатиніну, триацилгліцеролів (ТАГ), Кальцію, Фосфору – на біохімічному аналізаторі "Humalyzer" 2000. Отриманий цифровий матеріал опрацьовано методом варіаційної статистики з використанням критерію Стьюдента. Розраховували середні арифметичні величини (M) та їх похибки (± m). Зміни вважали вірогідними за P≤0,05. Для розрахунків використано комп'ютерну програму Excel.

Результати та обговорення. У результаті проведених досліджень встановлено, що за тривалого випоювання цитрату Ge у крові вагітних самиць щурів F_1 відбуваються зміни фізіологічних і біохімічних показників, що характеризують не однакову дію різних доз Ge на їх організм. На це вказує зростання вмісту імуноглобулінів у крові самиць дослідних груп, з вірогідним їх збільшенням на 20,9 % у III групі, а також, гексоз, зв'язаних з білками і сіалових кислот, крім II групи. Зростання рівня імуноглобулінів і моноцукрів глікопротеїнів у крові самиць дослідних груп, що вірогідно виражено у тварин III групи, може вказувати на стимулюючий вплив цитрату Ge у дозі 20 мкг на синтез окремих їх класів у лімфоїдній тканині та печінці, тоді як ці процеси значно пригнічуються за дії збільшеного рівня естрогенів, що спостерігається під час вагітності щурів [2]. У той час як реакція показників гострої фази, зокрема концентрація молекул середньої маси у крові тварин V ($p<0,001$), а ЦІК – II ($p<0,01$) груп зменшувалася порівняно з їх величинами у самиць контрольної групи (табл. 1). Однак вміст ЦІК зменшується ($p<0,01$) у крові самиць II дослідної групи, за дії 10 мкг Ge, проте прослідковується

© Храбко М., Федорук Р., Кропивка С., 2017

тенденція до його збільшення у III групі, за дії 20 мкг Ge, що можливо пов'язано з високим рівнем імуноглобулінів, гексоз, зв'язаних з білками і сіалових кислот у крові цих тварин, а також імунобіологічною реакцією їх організму під час вагітності на підвищення дози Ge.

Таблиця 1. **Імунні та глікопротеїнові комплекси крові вагітних самиць щурів F_1 за випоювання цитрату Ge (M ± m, n=4, 5)**

Показник	Група				
	контроль	дослід, мкг Ge/кг м. т.			
	I	II – 10	III – 20	IV – 200	V – 2000
Імунні глобуліни, г/л	6,7±0,40	7,4±0,60	8,1±0,47*	6,9±0,52	7,2±0,31
МСМ, ум. од.	0,25±0,004	0,26±0,004	0,25±0,005	0,25±0,003	0,22±0,004***
ЦІК, ммоль/л	88,0±4,32	69,8±2,02**	98,0±3,94	83,0±3,08	88,0±3,02
Гексози, зв'язані з білками, г/л	3,25±0,17	3,75±0,12*	4,15±0,16**	4,19±0,13**	4,12±0,16**
Сіалові кислоти, ум. од.	114,8±2,17	119,4±4,78	133,8±4,85**	128,2±3,32*	134,2±2,87***
Церулоплазмін, ум. од.	366,8±5,62	363,7±4,50	380,6±6,83	368,8±3,17	358,8±5,32

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

Характерно, що випоювання HGeЦ у дозах від 10 до 200 мкг Ge не змінювало рівня МСМ і церулоплазміну в крові самиць, що вказує на фізіологічну адекватність цих доз щодо реакції білкових комплексів гострої фази імунної реактивності організму. У той час як висока доза (2 мг) хімічно отриманого цитрату Ge зумовлювала пригнічення синтезу цих молекул, що викликало вірогідне зниження концентрації МСМ у крові самиць V групи, проте стимулювала зростання рівня інших компонентів імунної системи – імунних глобулінів, гексоз, зв'язаних з білками, сіалових кислот. Стимулюючий вплив застосованих доз цитрату Ge на імунофізіологічну реакцію організму вагітних самиць щурів підтверджує вірогідне збільшення у крові вмісту гексоз, зв'язаних з білками на 15,4 – 28,9 % у всіх дослідних групах. Ця тенденція відзначена і для сіалових кислот, вміст яких у крові вірогідно збільшувався у самиць III групи на 16,5 % (p<0,01), IV – 11,7 % (p<0,05), V – 16,9 % (p<0,001) порівняно до контролю, що відзначали й інші автори [2]. Вірогідно вираженого впливу цитрату Ge на рівень церулоплазміну у крові тварин дослідних груп не відзначено.

Підтвердженням вираженого біологічного впливу цитрату Ge є також вірогідні міжгрупові відмінності показників антиоксидантної активності крові вагітних самиць щурів дослідних груп порівняно з контрольною (табл. 2). Відстежується тенденція до збільшення активності ензимів АОС крові за дії HGeЦ, проте вірогідні різниці відзначено лише у III групі, за випоювання 20 мкг Ge зі зростанням активності каталази (p<0,001), СОД (p<0,05) та ГП (p<0,05) у III – V групах. Не має фізіологічного пояснення вірогідне зниження СОД-ї активності крові самиць IV і V груп за дії 200 і 2000 мкг Ge на тлі високої ГП-ої активності у цих тварин. Можливо це пов'язано з дозозалежними змінами функціонального стану й антиоксидантного захисту окремих органів і систем організму вагітних самиць, що було відзначено для показників імунної реактивності, зокрема вмісту імуноглобулінів, гексоз, зв'язаних з білками і сіалових кислот. Зростання активності каталази у 1,20, СОД в 1,10, раза у самиць III групи може вказувати на посилення синергічного зв'язку цих ензимів за умов гіпероксичної дії Ge та перетворення активних форм Оксигену в клітинах крові. Підвищувалася також активність ГП у 1,33–1,22 раза, що вказує на однаково виражений стимулюючий вплив HGeЦ у дозах 20 і 200 мкг, але менший – в дозі 2 мг Ge, на стан клітин крові та систему їх антиоксидантного захисту у цих тварин. Доведено, що ГП захищає еритроцити від передчасного старіння та гемолізу, а нейтрофіли і макрофаги – від дії H_2O_2 та органічних пероксидів, оскільки має високу спорідненість до пероксидації [5, 9]. Очевидно, нагромадження токсичних перекисних продуктів в організмі, що відзначено в крові самиць III і IV груп, пригнічує активність цього ензиму. Однак у крові самиць V групи, які отримували найвищу дозу (2 мг Ge) з хімічно синтезованого його цитрату, вміст ГПЛ і ТБК продуктів у крові зберігався на рівні контрольної групи. Це може вказувати на більше виражений інгібуючий вплив цитрату Ge у цій високій дозі на процеси пероксидації в крові вагітних самиць з нормалізуючим впливом на вміст ГПЛ і МДА, структурно-функціональні властивості клітинних мембран та обмін фосфоліпідів.

Таблиця 2. **Показники антиоксидантної активності крові самиць щурів F_1 за випоювання цитрату Ge (M± m, n=4, 5)**

Показник	Група			
	контроль	дослід, мкг Ge/кг м. т.		
	I	III – 20	IV – 200	V – 2000
Каталаза, мМоль/мг білка/хв	4,47±0,07	5,40 ±0,05***	4,63±0,15	4,26±0,16
СОД, ум. Од./мг білка	1,79±0,06	1,97 ±0,012*	1,22±0,03***	1,5±0,02**
ГП, нМоль/хв/мг білка	48,36±1,13	63,3±0,53***	64,39±2,27***	59,0±1,53***
ГПЛ, од. Е/мл	0,87±0,01	1,11±0,01***	1,3±0,06***	0,85±0,029
ТБК, нмоль/мл	5,06±0,08	4,49±0,07**	5,21±0,10	4,92±0,04

Аналіз інших біохімічних показників крові самиць щурів вказує на міжгрупові різниці вмісту у ній альбуміну, креатиніну, Кальцію, Фосфору та триацилгліцеролів (табл. 3). Зокрема, відзначено вірогідне зниження вмісту альбуміну у крові самиць V (p<0,05) і не вірогідно – IV дослідних груп. Вміст креатиніну вірогідно підвищувався на 18,7 % у крові тварин V групи зі збереженням цієї тенденції для III і IV груп, що може вказувати на зростання інтенсивності катаболізму протеїнів і зниження абсорбційно-фільтраційної функції ниркових клубочків у щурів цих дослідних груп. Рівень Са у крові тварин II – IV груп вірогідно зменшувався, а Р – зростав у самиць II та III груп на 49,6 та 54,1 % порівняно до контрольної групи. Це може вказувати на інгібуючий вплив HGeЦ в кількості 10, 20 і 200 мкг на рівень Са, але стимулюючий у дозах 10 і 20 мкг – на вміст Р у крові самиць цих груп.

Таблиця 3. **Біохімічні показники крові самиць щурів F_1 за випоювання цитрату Ge (M±m, n=4, 5)**

Показник	Група				
	контроль	дослід, мкг Ge/кг м. т.			
	I	II – 10	III – 20	IV – 200	V – 2000
Альбумін, г/л	31,9±0,71	31,0±1,33	31,2±2,53	28,8±2,04	27,7±1,03*
Креатинін, мкмоль/л	59,4±2,26	56,6±1,47	64,5±2,69	67,2±2,61	70,5±2,61*
Кальцій, ммоль/л	3,48±0,09	2,45±0,11***	2,40±0,10***	2,78±0,06***	3,50±0,23
Фосфор, ммоль/л	1,25±0,13	1,87±0,06**	1,88±0,16*	1,00±0,14	1,40±0,12
Триацилгліцероли, ммоль/л	1,49±0,12	1,69±0,22	1,92±0,46	1,38±0,30	0,91±0,10**

Для концентрації триацилгліцеролів у крові вагітних самиць II – IV груп не встановлено дозозалежні вірогідні зміни за дії HGeЦ. Вплив найвищої (2 мг) дози цитрату Ge у вигляді ЦGeXC супроводжувався вірогідним зменшенням ($p<0,01$) на 38,9 % у крові тварин V групи вмісту триацилгліцеролів порівняно до контролю, що виявляє прямий зв'язок зі зниженням вмісту ГПЛ і ТБК–активних продуктів (див. табл. 2). Підсумовуючи аналіз одержаних результатів можна відзначити виражений, але не однаково спрямований, вплив застосованих доз цитрату Ge, отриманого як нанотехнологічним, так і хімічним методами на показники імунофізіологічного й антиоксидантного стану організму та вмісту Ca і P у крові вагітних самиць F_1, а також на рівень білкових і ліпідних комплексів за дії ЦGeXC в дозі 2 мг.

Висновки

Біологічний вплив різних доз цитрату Ge, отриманого методами нанотехнології та хімічного синтезу, у самиць щурів F_1 характеризується такими змінами показників імунної та антиоксидантної систем:

1. Не однаково вираженою активацією імунобіологічної реактивності організму щурів за дії 10, 20, 200 і 2000 мкг Ge з вірогідним зростанням вмісту імуноглобулінів у крові самиць III, гексоз, зв'язаних з білками – II – V, сіалових кислот – III – V груп;

2. Зниженням альбумін-транспортної і ліпідно-структурної функцій крові та фільтраційно-абсорбційної – нирок у самиць V групи за дії вищих доз цитрату Ge, отриманого хімічним синтезом;

3. Посиленням резервування P з підвищенням його рівня в крові самиць II і III груп на тлі зниження Ca в II – IV групах за дії наногерманію цитрату.

Список використаних джерел

1. *Vlizlo V. V.* Nanobiotechnology. Present state and future prospectes / V. V. Vlizlo, R. J. Iskra, R. S. Fedoruk // The Animal Biology, 2015. – Vol. 17(4). – P. 18–29. (in ukr.).
2. *Dolaychuk O. P.* Physiological effects nanotsytratu 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 ukr.).
3. *Stadnik A. M.* The biological role of germanium in animals and humans / A. M. Stadnik, G. A. Byts, O. A. Stadnyk // Scientific Herald of LNAVM Gzhytsky S. Z., 2006. – Vol. 8 (2). – P. 174-185. (in ukr.).
4. *Nanomaterials* in biology. Fundamentals nanoveterinary / V. B. Borisevich, V. G. Kaplunenko, N. V.Kosinov et al. // K. : WA "Avicenna", 2010. – 416 p. (in ukr.).
5. *Menchikov L. G.* Biological activity of organogermanium compounds : a review / L. G. Menchikov, M. A. Ignatenko // Pharmaceutical Chemistry Journal, 2012. – Vol. 46 (11). – P. 3-6. (in ukr.).
6. *Seifullina I. I.* Design and synthesis of new homo- and heterometal coordination compounds of germanium (IV) for preparation of low toxic drugs with a wide therapeutic action / I. I. Seifullina, E. E. Martsinko, E. V. Afanasenko // Bulletin of the Odessa National University. Chemistry, 2015. – Vol. 20 (4). – P. 6-17. (in ukr.).
7. *Goodman S.* Organic Germanium – Powerful Healer / S. Goodman // J. Comp. Med., 1987. – № 4. – P. 34–52.
8. *Long Q. C.* Pharmacocinetics of germanium after po beta-carboxyethilgermamum sesquioxide in 24 Chinese volunteers / Q. C. Long, G. X. Zeng, X. L. Zhao // Zhongguo Yao Li Xue Bao, 1996. – Vol. 17 (5). – P. 415-418.
9. *Kresyun V. I.* Pharmacological characterization of compounds of germanium / V. I. Kresyun, K. F. Shemonayeva, A. G. Vidavska // Clinical Pharmacy, 2004. – № 4. – P. 65-68. (in ukr.).
10. *Growth*, development and reproductive function of female rats and their offspring viability at the conditions of the watering of different doses of citrate germanium / R. S. Fedoruk, M. I. Khrabko, M. M. Tsap, O. E. Martsynko // Animal biology, 2016. – Vol. 18 (3). – P. 97-106. (in ukr.).
11. *Khrabko M. I.* Growth and development of F_1 male rats organism and its immunophysiological activity during the period watering them different doses of nanotechnology and chemically synthesized germanium citrate / M. I. Khrabko, R. S. Fedoruk // Bulletin of Kyiv National Taras Shevchenko University. Problems of regulation of physiological functions, 2016. – Vol. 2 (21). – P. 39-43. (in ukr.).
12. *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". M. V. Kosinov, V. G. Kaplunenko. – Publish. 12.01.2009, Bull. № 1 (in ukr.).
13. *European* convention for the protection of vertebrate animals used for experim. and other scientific purposes. Coun. of Europe, Strasbourg, 1986. – P. 53.
14. *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). L. Kovalenko Evaluation nanoakvahelat germanium stimulating action on the natural resistance of animals // Scientific Herald NUBiP Ukraine, 2012. – № 172 (1). – P. 203-209. (in ukr.).
15. *Laboratory* methods of investigation in biology, stock-breeding and veterinary : Reference book / V. V. Vlizlo, R. S. Fedoruk, I. B. Ratych et al. ; Ed. by V. V. Vlizlo. – Lviv : SPOLOM, 2012. – 764 p. (in ukr.).

References (SCOPUS)

1. Vlizlo VV, Iskra RJ, Fedoruk RS. Nanobiotechnology. Present state and future prospectes. The Animal Biology. 2015, 17 (4):18-29. [Ukrainian]
2. Dolaychuk OP, Fedoruk RS, Kaplunenk 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]
3. Stadnik AM, Byts GA, Stadnyk OA. The biological role of germanium in animals and humans. Scientific Herald of LNAVM Gzhytsky SZ. 2006, 8 (2):174-185. [Ukrainian]
4. Borisevich VB, Kaplunenko VG, Kosinov NV, at al. Nanomaterials in biology. Fundamentals nanoveterinary. K.: WA "Avicenna", 2010: 416 p. [Ukrainian]
5. Menchikov LG, Ignatenko MA. Biological activity of organogermanium compounds (a review). Pharmaceutical Chemistry Journal, 2012, 46 (11): 3-6. [Ukrainian]
6. Seifullina II, Martsinko EE, Afanasenko EV. Design and synthesis of new homo- and heterometal coordination compounds of germanium (IV) for preparation of low toxic drugs with a wide therapeutic action. Bulletin of the Odessa National University. Chemistry, 2015, 20 (4): 6-17. [Ukrainian]
7. Goodman S. Organic Germanium – Powerful Healer. J. Comp. Med., 1987, 4: 34-52.
8. Long QC, Zeng GX, Zhao XL. Pharmacocinetics of germanium after po beta-carboxyethilgermamum sesquioxide in 24 Chinese volunteers. Zhongguo Yao Li Xue Bao, 1996, 17 (5): 415-418.
9. Kresyun VI, Shemonayeva KF, Vidavska AG. Pharmacological characterization of compounds of germanium. Clinical Pharmacy, 2004, 4: 65-68. [Ukrainian]
10. Fedoruk RS, Khrabko MI, Tsap MM, Martsynko OE. Growth, development and reproductive function of female rats and their offspring viability at the conditions of the watering of different doses of citrate germanium. Animal biology, 2016, 18 (3): 97–106. [Ukrainian]
11. Khrabko MI, Fedoruk RS. Growth and development of F_1 male rats organism and its immunophysiological activity during the period watering them different doses of nanotechnology and chemically synthesized germanium citrate. Bulletin of Kyiv National Taras Shevchenko University. Problems of regulation of physiological functions, 2016, 2 (21): 39-43. [Ukrainian]
12. Kosinov MV, Kaplunenko VG, 2009. Method metal carboxylates "Nanotechnology receiving metal carboxylates". Ukraine. Pat. 38391. [Ukrainian].
13. European convention for the protection of vertebrate animals used for experim. and other scientific purposes. Coun. of Europe, Strasbourg, 1986: 53.
14. 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.

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

Надійшла до редколегії 22.03.17

М. Храбко, асп., Р. Федорук, д-р вет. наук, С. Кропивка, канд. с-г наук,
Институт биологии животных НААН, Львов, Украина

ПОКАЗАТЕЛИ СОСТОЯНИЯ ИММУННОЙ И АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМ В КРОВИ БЕРЕМЕННЫХ САМОК КРЫС F_1 ВСЛЕДСТВИЕ ДЕЙСТВИЯ РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ ЦИТРАТА ГЕРМАНИЯ

Исследовано и изучено влияние различных доз цитрата Ge, полученного методами нанотехнологии и химического синтеза, на активность иммунной и антиоксидантной систем крови беременных самок крыс. Исследования выполнены на самках крыс F_1, которым выпаивали с водой цитрат Ge в дозах 10 (II), 20 (III), 200 (IV) мкг Ge, полученный нанотехнологическим методом, и 2000 (V) мкг Ge – химически синтезированным. Цитрат Ge применяли от молочного периода до 18-20 суток беременности. Отмечено разнонаправленное влияние цитрата Ge на показатели иммунной и антиоксидантной систем с повышением содержания иммунных глобулинов, гликопротеинов и активности энзимов антиоксидантной защиты, что более выражено у самок, которые получали 20 мкг Ge. Установлено ингибирующее влияние цитрата Ge в дозе 2 мг/кг на содержание альбумина и триацилглицеролов на фоне повышения уровня креатинина в крови беременных самок.

Ключевые слова: цитрат германия; кровь; крысы; иммунофизиология.

M. Khrabko, Ph. D. stud., R. Fedoruk, D. Sci., S. Kropuvka Ph. D.,
Institute of animal biology NAAS, Lviv, Ukraine

THE INDICATORS OF THE IMMUNE SYSTEM AND ANTIOXIDANT IN THE BLOOD OF PREGNANT FEMALE RATS F1 BY ACTION OF DIFFERENT DOSES OF GERMANIUM CITRATE

The aim of research was to study the effect of different doses of Ge citrate, obtained by nanotechnology method and chemically synthesized, the activity of their immune and antioxidant system blood of pregnant female rats. Research performed on rats F_1 which were watering Ge citrate obtained by nanotechnology method in doses 10 (II), 20 (III), 200 (IV) mcg Ge and chemically synthesized Ge citrate in dose 2,000 (V) mg Ge. Ge citrate watering during the milk-feeding period up to 18-20 days of pregnancy. Not the same directional effect Ge citrate parameters of immune and antioxidant systems with increased content of immune globulin, glycoproteins and activity of enzymes of antioxidant protection that is more pronounced in females receiving 20 mcg Ge. Established inhibitory effect of Ge citrate 2 mg/kg albumin content and threeacylglycerol, amid increasing the level of creatinine in the blood of pregnant females V group which may indicate a decrease of albumin-transport function of filtering and absorption the ability of the kidneys.

Key words: germanium citrate; blood; rat;, immunophysiology.

УДК 616.329-001.37-053

N. Chornenka, Ph. D. stud., K. Valetska, stud., Ya. Rayetska, Ph. D., L.Ostapchenko, D. Sci.,
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

CORRECTION OF MELANIN PROTEOLYTIC ACTIVITY IN THE CONDITIONS OF MODELING ALKALI BURNS OF THE ESOPHAGUS

During the esophageal burns first and second degree, were observed the increase of total proteolytic activity and of the main proteinase (metalloproteinases and serine). Experimental melanin correction at a dose of 0.1 mg / kg contributed to the normalization of the pathological increase of total proteolytic activity and the activity of the main proteinase (metalloproteinases and serine), which indicates the normalization of the proteolysis system.

Keywords: alkaline burn of the esophagus, proteolysis, melanin.

Esophageal burns takes the first place among all diseases of the esophagus with severe pathological condition, accompanied by profound and often irreversible local general changes in the body. Chemical burns the esophagus remains one of the major problems of clinical medicine. [1,2,3]. Medical statistics show that among the total number of people who received burns of the esophagus, 70.0 % are children under the age of 10 years. Often the cause of impaired patency of esophageal stricture is a scar that is caused by chemical burns [2,3, 4]. Tissue damages due the breach cell membranes as a result of the dissolution of lipids that make up their basic structural unit. Necrosis is observed not only in mucosa – the process can spread to the entire thickness of the submucosal and muscle layers. For chemical burns of the esophagus, regardless of the severity of lesions are three major successive processes: alternative-destructive, reparative and restorative without the appearance or the appearance of preconditions to chronic inflammation. Burn wound in most cases prone to chronic due to prolonged inflammation and high proteolytic activity [5].

According to modern concepts proteolisis is considered as a special form of biological control, which occupies a leading place in realization of variety biochemical processes and rapid physiological response of the body to unstable conditions of endogenous and exogenous environment. Proteinase, active participants of the proteolysis system, perform a huge variety of functions and control practically all levels of biological processes occurring at the molecular, cellular, tissue and organ levels [6]. Regulatory role of proteolytic enzymes is carried in two forms: full and limited proteolysis. Full proteolysis is the degradation of protein cleavage abnormal and damaged proteins. At the same time limited proteolysis is considered a universal mechanism responsible for the creation, modification and inactivation of hormones, enzymes and other physiologically active substances. In some pathological conditions occur excessive activation of proteolysis, which is an important link in the pathogenesis of destructive, inflammatory, allergic reactions, disturbance of hemostasis, as well as one of the factors that contributes to cell invasion of tumors [7]. The reaction of proteolysis has a key role not only in the regulation of intracellular protein metabolism, but also in processes such as their translocation inside and outside the cell, the formation of active enzymes, hormones and other biologically active substances [8].

Integral role in balancing of the physiological synthesis and proteolysis play inhibitors proteinases [9]. These

© Chornenka N., Valetska K., Rayetska Ya., Ostapchenko L., 2017

specific proteins prevent excessive destruction of protein compounds, allowing timely or slow down, or stop any biological process. Violation of proteinase-inhibitory system can be both a cause and a consequence of pathological conditions. However, excessive activation of proteolysis causes damage of native tissue proteins, promotes activation of inflammatory processes, the flow of which is the rapid destruction of the ECM and cell migration [10].

Despite the large number of drugs used for this purpose in the literature is conflicting information about their effectiveness and sufficiently acute is the problem of shortening the healing of burn wounds, prevent post burns complications [11,12,13]. Actual is the use of non-toxic natural antioxidants as cytoprotectors [14]. The protective effect of antioxidants is widely studied under the influence of adverse factors, metabolic disorders. With deep burns of the esophagus, it is important to provide assistance quickly because any delay or improper treatment can significantly slow down the healing process or cause serious infection. Today, the market has a lot of drugs for the treatment of burns, still lacks ideal preparation, as most of the available products have only antimicrobial activity but does not affect on the process of wound healing. In addition, these products can be toxic for intact cells and cause allergic reactions. [15] Medicinal plants rich in phenolic compounds could potentially accelerate healing process in burn wounds and protects the wound from bacterial infections [16]. An additional advantage of using herbal medicines rich in polyphenols in the treatment of burns is their low cost, high availability, and fewer side effects [16]. In burns there is a violation of homeostasis between reactive oxygen species and antioxidant defense systems in the body [17]. Antioxidant activity of phenolic compounds occurs through different mechanisms of action: inhibition of the formation of reactive oxygen species, the ability to neutralize singlet oxygen molecule, to bind metal ions that are catalysts of reactions, leading to the formation of reactive oxygen species, interrupting the cascade of reactions of free radicals in the lipids peroxidation [18,19,20,21]. Analysis of recent literature suggests that possible promising remedy in normalization of proteinase-inhibition imbalance during esophageal burns first and second degree can be substances of natural origin based on polyphenolic compounds. To these substances belongs melanin, which is the waste products of yeast fungi Nadsoniella nigra strain X-1 [22]. This product demonstrates antioxidant [23,24,25], immunomodulatory [26, 27], anticarcinogenic [26, 28] and stress-protective [29] properties, which allows its use in medicine. Melanin also has a pronounced cytoprotective effect on the gastric mucosa of rats, reducing the activity of lipid peroxidation and increases the activity of antioxidant enzyme system [30].

Therefore, the aim of this study was to determine the total proteolytic activity and activity of the main proteinase (metalloproteinases and serine) in rats with esophageal burns first and second degree on the background of the drug in melanin dose of 0.1 mg / kg.

Materials and methods. White wild rats (1-month, 90-110 g body weight) were used in experiments in compliance with provisions for the use of animals in biomedical experiments approved by the First Ukrainian National Congress on Bioethics (September 2001) and other international agreements and national legislation in this area. Chemical burns in animals were experimentally modeled in the following way: alkaline esophageal burn was caused by 10 % and 20 % NaOH and acid esophageal burn was caused by, for this injected the probe into the esophagus soldered up end and a hole at a distance of 2 mm from it. The probe was injected to a depth of 4 cm from the upper incisors rat and slowly injected 0.1 solution of 10 % NaOH, modeling changes corresponding to the 1st degree burn injury. Similarly injected 0.2 ml of 20 % NaOH, thereby reproducing the 2 degree burns. The control rats once orally administered the appropriate amount of water for injection [1, 31]. Studied animals received a standard diet.

Scheme of the experiment was as follows: Group 1 – control. Healthy rats (intact control); group 2, 3 – rats, which modeled ABE 1st and 2nd degree, which was administered saline in the appropriate dose and timing (burn control); Group 3, 4 – ABE rats with 1st and 2nd degree, which was injected with melanin from the 2nd day of the experiment at a dose of 0.1 mg / kg for 14 days. Producers of melanin used in our studies were mushrooms Nadsoniella nigra strain X1 that sown with vertical rock samples o.Halindez. The method of removing animals from the experiment was cervical dislocation. To study plasma total proteolytic activity and determining the activity of serine proteases and metal obtained using 3.8 % sodium citrate at 7, 15 and 21 days [32].

The total proteolytic activity analyzed by method of caseinolytic activity with modifications. For determination selective activity of MMP and serine proteases to the reaction mixture (final concentration) was added 0.2 mol/l EDTA or PMSF, respectively. [9] 30 ml plasma argued 0.05 M (pH 7.4) phosphate buffer to a volume of 1 ml [33]. Was stirred and added to 1 ml of 4 % casein. Then incubated for 30 min. in a water bath at 37 C. The reaction was stopped by introducing 3 ml of 15 % CCl3COOH followed by centrifugation at 2000 rev. / min., 30 min. The supernatant was selected optical density measured at a wavelength of 280 nm. The control sample consisted of a mixture of casein, phosphate buffer and respective CCl3COOH in identical proportions. To prepare 4 % casein reagent sample weighing 4 grams dissolved in 80 ml 0.05 M phosphate buffer pH 7.4 and 1.6 ml 1M NaOH. The mixture is left at room temperature for 40 minutes. for swelling. Then boiled 15 minutes in a water bath. Once cooled, casein pH was adjusted to 7.4 and 1 M NaOH volume was adjusted to 100 ml phosphate buffer.

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

Results. The progress of wound healing, after the chemical inflammation, is determined of interaction of different metabolic systems, as the organism, and as the contacting tissue. This process is controlled of the different kind of biochemical homeostasis support. Important role at the wound heling, have some proteolytic enzymes, that catalyze splitting of the protein molecules. Thus, these enzymes by nonspecific proteolysis, involved at the remove of the necrosis tissues. The progress of cicatrization, after inflammation wounds are the dynamical process, and are required some balance between mechanisms of synthesis and degradation of the ECM components. Proteolytic degradation of the ECM, are one of the crucial steps at the cicatrization of inflammation lesions, and are provided of the proteolytic enzymes [34].

The proteinases activity depends, from their appearance from inactive predecessors, and inactivating of the specific inhibitors, which are present in cells, tissues and blood plasm, and make anti-proteolytic potential [35]. At the critical states, are violated the dynamic balance between proteinases and their inhibitors, that are important

link of pathogenesis of the many diseases (pancreatitis, fibrosis, cancer, etc.) [36].

We have determined the overall activity of proteolytic enzymes in the rat's blood plasma at the different degrees of the ABE (Fig. 1).

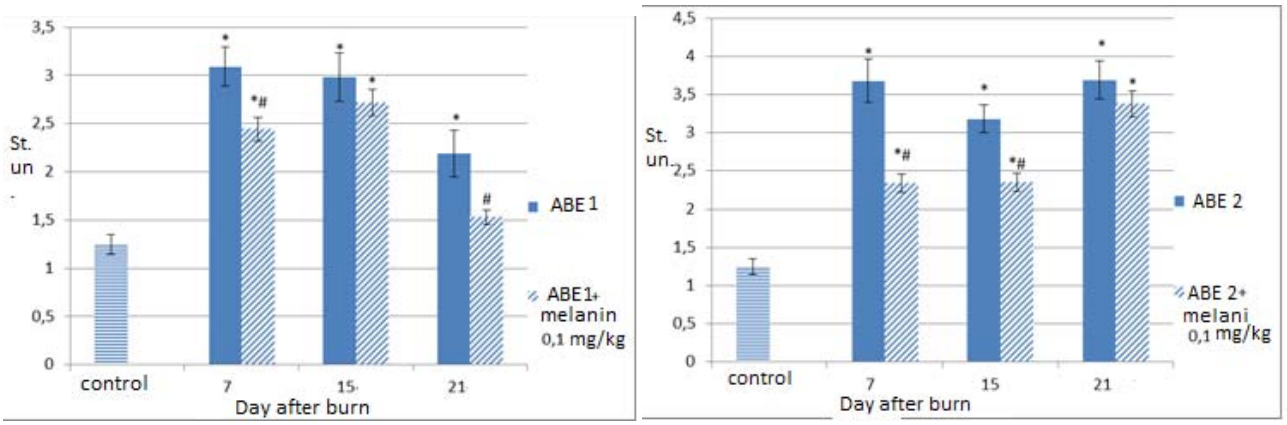


Fig. 1. The total proteolytic activity in plasma (caseinolytic units/mg protein) after experimental burn and under conditions administration of melanin (M±m, n=8)

Note : (*p<0,05 compared with control value, # p<0,05 compared with ABE 1st and 2nd degree).

Proteolytic activity increased at the first and second degrees of the inflammation, during of all of the experiment time. So, at the ABE 1st, activity was increased by 2.5 times on the 7th day, and by 2.3, 1.8 times on the 15th and 21st days. Melanin administered was decreased of the activity on the 7th, 15th and 21st days by 1.3, 1.1, and 1.4 times, in compared with the animals with first degree of ABE. At the second degree of ABE, was noted the growth of proteolytic activity at the all days of the experiment. On the 7th day by 2.9 times, on the 15th and 21th days by 2.5 and 2.95 times, in compared with intact control. At the melanin administered, was observed the trend to the decreased of the proteolytic activity, in compared with animals with inflammation, so on the 7th, 15th and 21st days activity was decreased by 1.6, 1.35 and 1.1 times.

Among the proteolytic enzymes, the most crucial are serine and metalloproteinase. Thus, increased of serine proteinase activity in the extracellular matrix, view as basic link of the many pathological states, at which there is infiltration of tissues by the neutrophils, which are accompanied of inflammatory reaction [37]. The most typical serine protease is the chymotrypsin, trypsin, plasmin, elastase, urokinase, kalikreine of blood plasma and some clotting factors [38]. From the references are known that crucial function of the MMP are degradation of the ECM complexes. But the new impetus to the most detail of the MMP function research, data become information that in addition to these destructive this MMP have regulatory function, making the processing of biological activity substances. MMP involved and control many process: cell proliferation, adhesion, migration, differentiation and apoptosis [39]. Therefore, we were studied activity of the serine protease and metalloprotease in rat's blood plasm with ABE (1st and 2nd degrees).

Metalloproteinase activity increased throughout the experiment (Fig. 2), at the ABE 1st degree the highest values were for 15th days, which exceeded the reference value by 2.3 times, while the ABE 2nd degree for 15th and 21st days where activity was higher by 2.4 and 2.76 times, respectively. With the used of melanin metalloproteinase activity decreased notably 15th days at ABE 1st degree by 1.4 times, the ABE 2nd degree by 1.47 times compared with animals that were burned esophagus.

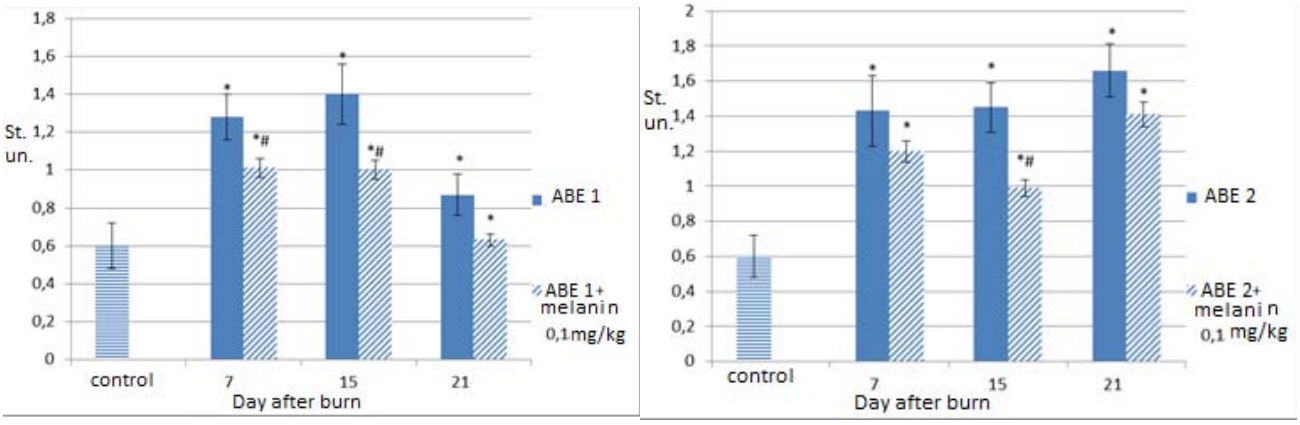


Fig. 2. Activity of MMP in plasma (caseinolytic units/mg protein) after experimental burn and under conditions administration of melanin (M±m, n=8)

Note: (*p<0,05 compared with control value, # p<0,05 compared with ABE 1st and 2nd degree).

The activity of serine proteases in the conditions of burn increased especially on 7th day of experiment (Fig. 3), which exceeded the reference value at ABE 1st degree by 3.5 times, the ABE 2nd by 4.7 times. In the conditions the used of melanin activity of serine proteases was decreased for ABE 1st degree at 7th day by 1.23 times and for ABE 2nd degree by 2 times compared with animals that were burned esophagus.

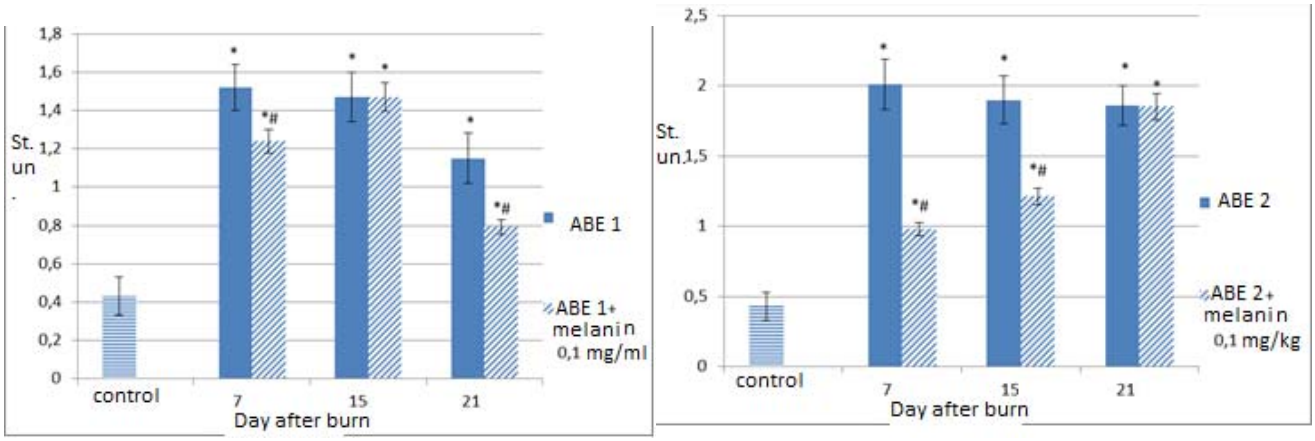


Fig. 3. Activity of serine proteinase in plasma (caseinolytic units/mg protein) after experimental burn and under conditions administration of melanin (M±m, n=8)

(*p<0,05 compared with control value, # p<0,05 compared with ABE 1st and 2nd degree)

Conclusion. Thus, a chemical burn of the esophagus 1 and 2 degrees led to a breach in the system proteolysis, increased general proteolytic activity and activity of certain proteases (matrix metalloproteinases and serine). In the conditions of first degree the most activity was at 7 and 15 days. While second-degree burns the most activity was 15 and 21 days. When using melanin at a dose of 0.1 mg / kg was observed a significant decrease of total proteolytic activity and activity of matrix metalloproteinases and serine, which may indicate the prospect of of its use in clinical practice.

References

1. *Functioning* proteases in the esophagus mucosa after chemical burns / T.V. Ishchuk, O.M. Savchuk, Ya.B. Raetska et al. // Physiological Journal, 2015. – Vol. 61. – P. 5

2. *Zvyagintsev T.V.* Effect of wound healing drugs with different mechanisms of action to ukroven proinflammatory cytokines in burn injury in rats / T.V. Zvyagintsev, A.V. Krivoshapka, E.V. Zhelnin // Experimental and Clinical Medicine, 2011. – №1 (50) P. 57-60.

3. *Experimental* modeling of 1st and 2nd degrees alkali esophageal burn in immature rats / Y. Raetska, T. Ischuk, O. Dzhus et al. // Biological system, 2014. Vol. 6(1). – P. 39–44.

4. *Dynamics* Changes of Proteolytic Balance in Blood Plasma under Experimental Chemical Burns of Esophageal Development in Rats / T.V. Ishchuk, T.V. Koval, O.M. Savchuk et al. // Internat. J. of Health Sci. & Res., 2016. – Vol. 259. – P. 12.

5. *Abaev J.K.* Biology healing acute and chronic wounds / J.K. Abaev // Med. News, 2003. – Vol. 6. – P. 3-10.

6. *Wolf K.* Extracellular matrix determinants of proteolytic and non-proteolytic cell migration / K. Wolf, P. Friedl // Trends Cell Biol., 2011. – Vol. 12. – P. 736–744.

7. *Rob Beynon.* Bond Proteolytyc enzymes : a practical approach / Rob Beynon, S.Judith // Oxford : Oxford University Press, 2001. – 340 p.

8. *Borĭvoj K.* Specificity of proteolysis / K. Borĭvoj. – Berlin : Springer-Verlag, 1992. – 336 p.

9. *Hiemstra P.S.* Novel roles of protease inhibitors in infection and inflammation / P.S. Hiemstra // Biochem Soc. Trans., 2002. – № 2. – P.116–120.

10. *Kirpichenok L. N.* The value of the components of proteolysis system in the regulation of inflammatory responses / L. N. Kirpichenok // Medico-biological problems of life, 2010. – № 2. – P. 15-23.

11. *Klimenko M. O.* Burn disease (pathogenesis and treatment) / M. O. Klimenko, L.G. Netyuhaylo, 2009. – 118 p.

12. *Hetyuhaylo L. G.* Mechanisms of burn disease and justification of the drug "Kriohor" for its treatment : Author. Dis. on competition sciences. / L.G. Hetyuhaylo ; Dr. med degree. Sciences specials. 14.03.04 "Pathologic Physiology". – Kharkiv, 2007. 34 p.

13. *Combustiology* / E.Y. Fistal, G.P. Kozinets, G.E. Samoilenko et al. – Kharkov, 2004. – 184 p.

14. *Effects* of melanin-glucan complex, isolated from polypore fungi, on the lifespan of female icr mice Probl. aging and longevity / O.F. Seniuk, L.F. Gorovyi, L.A. Palamar, N. I. Krul, 2014. – Vol. 23, № 1. P. 11–27.

15. *Inhibition* of the proteasome activity, a novel mechanism associated with the tumor cell apoptosis-inducing ability of genistein / A. Kazi, K.G. Daniel, D.M. Smith et al. // Biochem. Pharmacol, 2003. – Vol. 66. – P. 965–976.

16. *Bahramsoltani R.* Medicinal plants and their natural components as future drugs for the treatment of burn wounds : An integrative review / R. Bahramsoltani, M.H. Farzaei, R. Rahimi // Arch. Dermatol. Res., 2014. – Vol. 306. – P. 601–617.

17. *Lithospermum* erythrorhizon extract protects keratinocytes and fibroblasts against oxidative stress / H.G. Yoo, B.H. Lee, W. Kim et al. // J. Med. Food, 2014. – Vol. 17. – P. 1189–1196.

18. *Nutritional* countermeasures targeting reactive oxygen species in cancer: From mechanisms to biomarkers and clinical evidence / A. Samoylenko, J.A. Hossain, D. Mennerich et al. // Antioxid. Redox Signal; 2013. – Vol. 19. – P. 2157–2196.

19. *Phenolic* composition and antioxidant activity of Malus domestica leaves / M. Liaudanskas, P. Viskelis, R. Raudonis et al. // Sci. World J., 2014. – P. 306217.

20. *Alov P.* Computational studies of free radical-scavenging properties of phenolic compounds / P. Alov, I. Tsakovska, I. Pajeva // Curr. Top. Med. Chem., 2015. – Vol. 15. – P. 85–104.

21. *Iron-chelation* properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups / M. Andjelkovich, J. van Camp, B. de Meulenaer et al. // Food Chem., 2006. – Vol. 98. – P. 23–31.

22. *Chyzhanska N.V.* The level of cortisol in the blood of rats before and after stress action against the background of melanin / N.V. Chyzhanska, O.I. Tsyryuk, T.V. Beregova // Visnik of problems of biology and medicine, 2007. – Vol. 1. – P. 40–44.

23. *Brenner M.* The protective role of melanin against UV damage in human skin / M. Brenner, V.G. Hearling // Photochem Photobio, 2008. – Vol. 84(3). – P. 539–549.

24. *Resistance* to UV radiation of microorganisms isolated from Antarctic rock habitats / V.A. Romanovskay, A.B. Tashirev, S.O. Shilin, N.A. Chornaia // Mikrobiologichny Journal, 2010. – Vol. 72, №3. – P. 8–14.

25. *Investigation* of the antibacterial activity of a chloroform extract of Ling Zhi or Reishi medicinal mushroom / S. Keypour, H. Riahi, M. Moradali, H. Rafati ; Ganoderma lucidum (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllophoromycetideae) // from Iran. Int. J. Med. Mushrooms, 2008. – Vol. 10, №4. – P. 345–349.

26. *Effects* of swim stress and alpha-MSH acute pre-treatment on brain 5-HT transporter and corticosterone receptor / S. Racca, A. Spaccamiglio, P. Esculapio et al. // Pharmacol Biochem Behav, 2005. – Vol. 81(4). – P. 894-900.

27. *Correction* Parameters of Endogenous Intoxication in Experimental Burn Disease at the Stage of Toxemia / N.M. Chornenka, YA.B. Raetska, O.M. Savchuk et al. // RJPBCS 7(5), Sep.–Oct. 2016. – P. 1042

28. *Anticancerogenic* propertis of melaninglucan complex 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. – P. 142–149.

29. *White* blood count of rats under stress-induced stomach lesions and the prophylactic administration of melanin / D.V. Golyshkin, T.M. Falalyeyeva, N.V. Chyzhanska et al. // Ukrainian Antarctic Journal, 2015. – № 14. – P. 114

30. *Sukhomlyn A.A.* Experimental correction of proteinase inhibitor imbalance by melanin in salivary glands under hypergastrinemia conditions / A.A. Sukhomlyn // The journal "Ukrainian Medical Dental Academy".

31. *Experimental* modeling of first-degree chemically-induced esophageal burns in rats / Ya.B. Raetska, T.V. Ishchuk, O.M. Savchuk, L.I. Ostapchenko // Medical chemistry, 2013. – Vol. 15, № 4. – P. 30-34.

32. *Combustiology* / E.Y. Fistal, G.P. Kozinets, G.E. Samoilenko et al. – Kharkov, 2004. – 184 p.

33. *Hummel B. C.* Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 1956. – № 37. – P. 1393–1995.

34. *Wolf K.* Extracellular matrix determinants of proteolytic and non-proteolytic cell migration / K. Wolf, P. Friedl // Trends Cell Biol., 2011. – Vol. 21, №12. – P. 736–744.

35. *Hibbetts K.* An Overview of Proteinase Inhibitors / K. Hibbetts, B. Hines, D. Williams // J. Vet Intern. Med., 1999. – Vol. 13. – P. 302–308.

36. *Veremeyenko K.N.* Proteolysis in normal and pathological / K.N. Veremeyenko, O.P. Goloborodko, A.I. Kizim // Health Protection, 1988. – P. 199.

37. *Luonut A.* Proteases and Delayed Wound Healing / A. Luonut, G. Dindelegan, C. Ciuce // Adv Wound Care, 2013. – № 8. – P. 438–447.

38. *Barrett A.* Handbook of Proteolytic Enzymes : Academic Press / A. Barrett, F. Woessner, N. Rawling. – London, 2012. – 4104 p.

39. *Petrenko O.* The Role of matrix metalloproteinases in the physiological processes of wound healing / O. Petrenko, O.A. Tikhomirov // Medical and Clinical Chemistry, 2013. – №4. – P. 100–106.

References (of Scopus)

1. Ishchuk TV., Savchuk O.M, Raetska YaB, Vereschaka VV., Ostapchenko LI. Functioning proteases in the esophagus mucosa after chemical burns. Physiological Journal. 2015; 61. 5

2. Zvyagintsev TV, AV Krivoshapka, EV Zhelnin. Effect of wound healing drugs with different mechanisms of action to ukroven proinflammatory cytokines in burn injury in rats. Experimental and Clinical Medicine. 2011. №1 (50) P.57-60

3. Raetska Y, Ischuk T, Dzhus O, Savchuk O, Ostapchenko L. Experimental modeling of 1st and 2nd degrees alkali esophageal burn in immature rats. Biological system. 2014; 6(1): 39 -44.

4. Ishchuk TV., Koval TV., Savchuk OM., Raetska YaB., Ostapchenko LI. Dynamics Changes of Proteolytic Balance in Blood Plasma under Experimental Chemical Burns of Esophageal Development in Rats International Journal of Health Sciences & Research. 2016. 259. 12.

5. Abaev JK Biology healing acute and chronic wounds. Med. News, 2003; 6. 3-10

6. Wolf K. Friedl P. Extracellular matrix determinants of proteolytic and non-proteolytic cell migration. Trends Cell Biol. 2011; 12. P. 736–744.

7. Beynon R, Judith S.Bond Proteolytyc enzymes : a practical approach. Oxford : Oxford University Press. 2001; 340 p.

8. Boŕivoj K. Specificity of proteolysis / Boŕivoj. Berlin: Springer-Verlag, 1992; 336 p

9. Hiemstra PS. Novel roles of protease inhibitors in infection and inflammation. Biochem Soc. Trans. 2002; №2. 116 – 120.

10. Kirpichenok LN The value of the components of proteolysis system in the regulation of inflammatory responses Medico-biological problems of life. 2010; № 2.15- 23.

11. Klimenko MO, Netyuhaylo LG. Burn disease (pathogenesis and treatment). 2009; 118.

12. Hetyuhaylo 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", 2007. 34. Kharkiv

13. Fistal E.Y, Kozinets G.P, Samoilenko G.E and al. Combustiology. 2004; 184. Kharkiv.

14. Seniuk O F., Gorovyi L.F., Palamar L.A., Krul N I.Effects of melanin-glucan complex, isolated from polypore fungi, on the lifespan of female icr mice Probl. aging and longevity; 2014; 23, № 1. 11–27

15. Kazi A., Daniel K.G., Smith D.M., Kumar N.B., Dou Q.P. Inhibition of the proteasome activity, a novel mechanism associated with the tumor cell apoptosis-inducing ability of genistein. Biochem. Pharmacol; 2003. 66. 965–976.

16. Bahramsoltani R., Farzaei M.H., Rahimi R. Medicinal plants and their natural components as future drugs for the treatment of burn wounds: An integrative review. Arch. Dermatol. 2014. 306. 601–617.

17. Yoo HG., Lee B.H., Kim W., Lee J.S., Kim G.H., Chun O.K., Lithospermum erythrorhizon extract protects keratinocytes and fibroblasts against oxidative stress. J. Med. Food; 2014;17. 1189–1196.

18. Samoylenko A., Hossain J.A., Mennerich D., Kellokumpu S., Hiltunen J.K., Kietzmann T. Nutritional countermeasures targeting reactive oxygen species in cancer: From mechanisms to biomarkers and clinical evidence. Antioxid. Redox Signal; 2013; 19. 2157–2196.

19. Liaudanskas M., Viskelis P., Raudonis R., Kviklys D., Uselis N., Janulis V. Phenolic composition and antioxidant activity of Malus domestica leaves. Sci. World J; 2014; 306217.

20. Alov P., Tsakovska I., Pajeva I. Computational studies of free radical-scavenging properties of phenolic compounds. Curr. Top. Med. Chem; 2015; 15. 85–104.

21. Andjelkoviж M., Camp J. van, Meulenaer B.de, Depaemelaere G., Socaciu C., Verloo M., Verhe R. Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. Food Chem; 2006; 98. 23–31.

22. Chyzhanska NV, Tsyryuk OI, Beregova TV. 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. 40-44.

23. Brenner M. Hearling VG. The protective role of melanin against UV damage in human skin. Photochem Photobio; 2008; Vol. 84(3). 539-549.

24. Romanovskay VA, Tashirev AB, Shilin SO, Chornaia NA. Resistance to UV radiation of microorganisms isolated from Antarctic rock habitats. Mikrobiologichny Journal; 2010;72, №3. 8–14.

25. Keypour S., Riahi H., Moradali M., Rafati H.. Investigation of the antibacterial activity of a chloroform extract of Ling Zhi or Reishi medicinal mushroom, Ganoderma lucidum (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllophoromycetideae), from Iran. Int. J. Med. Mushrooms; 2008; 10, № 4. 345–349.

26. Racca S., Spaccamiglio A., Esculapio P., Abbadessa G., Cangemi L., DiCarlo F., 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). 894-900.

27. Chornenka NM., Raetska YA.B, Savchuk O.M. Torgalo E.O., Beregova T.V., Ostapchenko L.I.. Correction Parameters of Endogenous Intoxication in Experimental Burn Disease at the Stage of Toxemia. RJPBCS 7(5), 2016; 1042

28. Seniuk O., Gorovoj L., Kovalev V.. et al.Anticancerogenic propertis of melaninglucan complex from higher fungi. Proc. 5th Internat. Med. Mushroom Con. 2009; 142–149.

29. Golyshkin D.V., Falalyeyeva T.M., Chyzhanska N.V., Beregova T.V, Ostapchenko L.I. White blood count of rats under stress-induced stomach lesions and the prophylactic administration of melanin. Ukrainian Antarctic Journal; 2015; № 14. 114

30. Sukhomlyn A.A. Experimental correction of proteinase inhibitor imbalance by melanin in salivary glands under hypergastrinemia conditions The journal Ukrainian Medical Dental Academy; 2013; 23

31. Raetska Ya.B., Ishchuk T.V., Savchuk O.M., Ostapchenko L.I.. Experimental modeling of first-degree chemically-induced esophageal burns in rats. Medical chemistry; 2013; 15, № 4. 30-34.

32. Fistal EY, Kozinets G.P, Samoilenko G.E and al. Combustiology. Kharkov; 2004; 184 p.

33. Hummel BC. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. 1956; №37. 1393–1995.

34. Wolf KP. Friedl. Extracellular matrix determinants of proteolytic and non-proteolytic cell migration. Trends Cell Biol. 2011; 21, №12. 736–744.

35. Hibbetts KB. Hines, D. Williams. An Overview of Proteinase Inhibitors. J Vet Intern Med. 1999;. 13. 302–308.

36. Veremeyenko KN, Goloborodko OP, Kizim AI Proteolysis in normal and pathological. Kiev: Health Protection 1988; 199

37. Luonut AG., Dindelegan, C. Ciuce. Proteases and Delayed Wound Healing Adv Wound Care. 2013; №8. 438–447.

38. Barrett AF. Woessner, N. Rawling. Handbook of Proteolytic Enzymes. (Academic Press), London, 2012; 4104

39. Petrenko O., Tikhomirov OA. The Role of matrix metalloproteinases in the physiological processes of wound healing. Medical and Clinical Chemistry. 2013; №4. 100-106.

Submitted on 13.03.17

Н. Чорненька, асп, К. Валецька, студ., Я. Раєцька, канд. біол. наук, Л. Остапченко, д-р біол. наук,
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

КОРЕКЦІЯ МЕЛАНІНОМ ПРОТЕОЛІТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ЗА УМОВ ЛУЖНОГО ОПІКУ СТРАВОХОДУ

За умов опіку стравоходу першого та другого ступенів відмічено підвищення загальної протеолітичної активності та активності основних протеїназ (серинової та металопротеїназ). Експериментальна корекція меланіном у дозі 0,1 мг/кг сприяла нормалізації патологічного зростання загальної протеолітичної активності та активності основних протеїназ (серинової та металопротеїназ), що вказує на нормалізацію стану системи протеолізу.

Ключові слова: лужний опік стравоходу, протеоліз, меланін.

Н. Черненькая, асп., К. Валецкая, студ., Я. Раецкая, канд. биол. наук, Л. Остапченко, д-р биол. наук,
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

КОРРЕКЦИЯ МЕЛАНИНОМ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ В УСЛОВИЯХ ЩЕЛОЧНОГО ОЖОГА ПИЩЕВОДА

В условиях ожога пищевода первой и второй степени, было отмечено повышение общей протеолитической активности и активности основных протеиназ (сериновых и металлопротеиназ). Экспериментальная коррекция меланином в дозе 0,1 мг / кг способствовала нормализации патологического роста общей протеолитической активности и активности основных протеиназ (сериновых и металлопротеиназ), что указывает на нормализацию состояния системы протеолиза.

Ключевые слова: щелочной ожог пищевода, протеолиз, меланин.

УДК 577.112.7:612.115

T. Katrii, Ph. D. stud., N. Shabanova, master, S. Ostapchuk, stud., O. Savchuk, D. Sci.,
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

THE CHARACTERIZATION OF THE SOLUBLE FIBRIN MONOMER COMPLEXES IN PATIENTS WITH ACUTE AND ONE YEAR POST ACUTE ISCHEMIC STROKE

It was shown that atherothrombotic and cardioembolic subtypes of ischemic stroke in acute phase of the disease accompanied with the appearance of the high concentrated soluble fibrin monomer complexes in blood plasma. But the concentration returned to the norm one year post ischemic stroke attack. Instead the concentration, the qualitative content of the year post stroke SFMC fraction was characterized by the higher diversity in comparison with acute fraction both subtypes of ischemic stroke as well as the healthy donors.

The different qualitative content of the SFMC fraction was observed for the both tested subtypes of ischemic stroke. The higher diversity of SFMC fractions was showed for the cardioembolic subtypes of ischemic stroke.

Key words: soluble fibrin monomer complexes, ischemic stroke, hemostasis.

Introduction. Stroke is a cerebrovascular accident, which is characterized by structural and morphological changes in the brain tissue, and persistent neurological deficits. This pathology is the third leading cause of death and long term disability in developed countries [1]. Although the incidence of the disease, mankind has only a superficial understanding of the processes of ischemia and changes in hemostasis that accompany it.

One of the most common cases of ischemic stroke is atherothrombotic and cardioembolic subtype. Atherothrombotic stroke mainly occurs on the background of atherosclerosis of cerebral arteries. Atherosclerotic plaque narrows the lumen and promotes thrombosis. At the heart of cardioembolic stroke, cerebral vessel occlusion is a fragment of a blood clot or other emboli, which were formed in the cavities of the heart or its valves [2, 3].

Whereas the treatment of stroke is limited, the best way to reduce the negative effects of this pathological condition is timely prevention, treatment and rehabilitation individual approach [4]. Today remains a topical study of the causes and mechanisms of stroke and its subtypes, as well as search for new biomarkers that can be used in diagnostics to identify individuals at high risk for stroke, as well as to optimize and control treatment.

One of the markers of haemostatic deviation is concentration of soluble fibrin monomer complex (SFMC), which are intermediate products of the transformation of fibrinogen into fibrin. Accumulation SFMC indicates abnormal activation of blood coagulation and in violation of dynamic balance between the functioning of blood coagulation and fibrinolysis [5]. The composition may include a SFMC native fibrinogen and its decay products. SFMC are well-known early markers of thrombophilia. Assay complex forms fibrin monomer can detect pathological process in the early stages of pre-clinical [6, 7]. Level of SFMC is not directly dependent on heparin therapy or thrombolytic agents, which allows the figure for accurate diagnosis of thrombosis.

The purpose of this study was to analyse the content of soluble fibrin monomer complex in blood plasma in patients with atherothrombotic and cardioembolic ischemic stroke in acute phase and one year after disease.

Methods. It was performed clinical and laboratory examination of 122 patients with acute ischemic stroke for the study. Depending on the subtype of stroke patients were randomized to open by two groups: group 1 – patients with atherothrombotic ischemic stroke (n = 66) and group 2 – patients with cardioembolic ischemic stroke (n = 56). One year past acute phase of disease groups consisted of 57 patients for AIS and 56 patients for CIS. The age of patients at the time of the inspection averaged 73 ± 8 years. Patients were hospitalized in I and II neurological department of the Kyiv city clinical hospital №4. The diagnosis of ischemic stroke was confirmed by neuroimaging (CT or MRI of the brain). All patients or their relatives have been warned of a clinical study and gave written consent to participate in it. On the first day of admission to the hospital all the patients received aspirin 325 mg orally, followed by a daily intake of 100 mg of aspirin internally. Since the second day patients received prophylactic dose of low molecular weight heparin. Plasma samples from 35 healthy donors were taken as a control.

Blood samples were collected from the cubital vein of all patients from 8 to 9 o'clock in the morning on an empty stomach in a plastic tube with sodium citrate (38 g/l) in the final 9:1 and stirred gently (not shaking). The mixture was centrifuged for 15 min at 2,000 g at the room temperature. The resulting plasma was frozen at -20°C. Plasma samples were defrosted by warming in a water bath (37°C) no longer than 15 min, then stirred by turning the tube and immediately moved on the ice. With this method of defrosting decreased activity of coagulation factors not occurred.

To determine the content of soluble fibrin monomer complex o-phenanthroline test was used. This method unlike the widely used ethanol and protamine sulfate test is more informative, standardized and has great diagnostic value [8, 9]. This technique is based on an assessment of the advent of plasma fibrin particles investigated after adding 0,78 % o-phenanthroline solution (in the ratio 1:1). This mixture was centrifuged at 2,000g for 15 min at the room temperature. Further purification of precipitate was done by washing three times with addition of 0,9 % NaCl in volume equal to the initial volume of plasma. The concentration of SFMC was measured through the time record from the moment of addition of the reagent until the first plates of fibrin were precipitated. Measurements were carried out only to 150 seconds. Test was considered positive for appearance of visible light plates during the first 150 seconds. The time of the plates appearance was noted in seconds and concentration was calculated according the calibration chart [10].

For the next step SFMC were collected from the 1 ml of blood plasma of each pathology by incubation with 0,78 % o-phenanthroline per 5 min. Aliquots in volume 50 mkl of each tested fraction of SFMC were diluted 10 times by SDS-PAGE sample buffer and applied on in 8 % polyacrylamide gels in the presence of sodium dodecyl sulfate in denaturing conditions [11, 12]. Electrophoresis was done in the unit for vertical preparative disc electrophoresis (BioRad) in glass plates 1 mm thick in amperage 19 mA for concentrating and 35 mA for separating gels. Gels were stained with 0,125 % solution of coomassie G-250 in 25 % isopropanol and 10 % acetic acid. Washing of excess paint was performed using a 0,8 % solution of acetic acid.

Electrophoresis was followed by Western Blotting. 10 time diluted aliquots of SFMC were transferred into Amersham Hybond-C Membrane under standard conditions.

© Katrii T., Shabanova N., Ostapchuk S., Savchuk O., 2017

Western blot detection was performed using primary polyclonal anti-α-FDP in ration 1:2000 (Shijin International, Mongolia). Corresponding secondary antibodies (Sigma, USA) horseradish peroxidase-conjugated antibody in ratio 1:1500 were detected by 3,3'-diaminobenzidine (DAB) substrate 5 mg/ml with 30 % H_2O_2.

Statistical analysis was performed using statistical analysis applications of Microsoft® Excel. To assess intergroup differences the parametric Student test was used. The difference between the parameters was considered statistically significant at $p<0,05$. Analysis of electrophoregrams was performed by the scanning of the computer program TotalLab 2.01.

Results. SFMC fractions were obtained from each tested group: healthy donors, patients with acute AIS, acute CIS and the same group of patients one year past AIS or CIS were diagnosed.

The first stage of this study was to determining of the concentration of SFMC by o-phenanthroline test in blood plasma of patients with cardioembolic and atherothrombotic ischemic stroke in the acute phase of the disease and one year after. The data shown in a Table 1 summarize the dynamic changes of concentration of the SFMC. It was shown that both acute stroke fractions was significantly higher comparing to the healthy donors value and was equal 33,4±1,5 mg/l for AIS patients and 36,9±1,2 mg/l for CIS patients. Also, studies indicate that one year past acute phase this index was equal 8,1±2,4 mg/l for AIS and 13,8±2,6mg/l for CIS patients. Accordingly, concentrations of soluble fibrin monomer complexes become close to physiological one year past ischemic stroke.

Table 1. **Concentration of soluble fibrin monomer complexes in blood plasma of the patient with stroke**

Tested group	Concentration of SFMC (mg/l)
Healthy donors	2,0
AIS acute	33,4±1,5
AIS year past	8,1±2,4
CIS acute	36,9±1,2
CIS year past	13,8±2,6

At the second stage 8 % SDS-PAGE was performed. Our study showed presence of proteins with molecular weight from 20 kDa to higher that 330 kDa. Proteins with Mr about 330 kDa and higher are the soluble fibrin monomer complexes. It was also discovered fractions with Mr lover than 300 kDa which could witness about splitting by plasmin.

The next task of our work the qualitative composition of the SFMC fraction was determined through Western Blot analysis (Fig. 2). It was shoved that o-phenanthroline method of SFMC separation is accompanied by the additional precipitation of fibrinogen and fibrin fragments. The presence of SFMC with molecular weight higher 330 kDa as well as some fibrin and fibrinogen fragments with Mr corresponded to X 240 kDa, DD 180 kDa and Y 150 kDa were detected in healthy donors. Acute AIS fraction had the same content. The higher diversity of the proteins was observed in acute CIS and both year past stroke fractions. Molecular weights of the proteins from 10 to higher 330 kDa in these fractions were detected. It could be explained by activation of the fibrinolysis one year past ischemic stroke attack. Moreover the presence of fibrin and fibrinogen degradation products in the acute CIS fraction and absence of this fragments in acute AIS fractions showed the shifted it time fibrinolysis for AIS.

It is well known that fibrinogen is a 330-kDa soluble plasma protein. Fragmentation of fibrinogen occurs upon cleavages within the α-chain to release the αC fragments, thereby producing fragment X (260 kDa). Further cleavage of fragment X in the α-, β-, and γ-chains between the two disulfide rings in one half of the molecule produces fragment Y (160 kDa) and fragment D (100 kDa). Thus thrombin-treated fibrin fragments were noticed in each tested fractions. Further cleavage of fragment Y produces a second fragment D and fragment E (60 kDa) which were not noticed in healthy donors and acute AIC fractions.

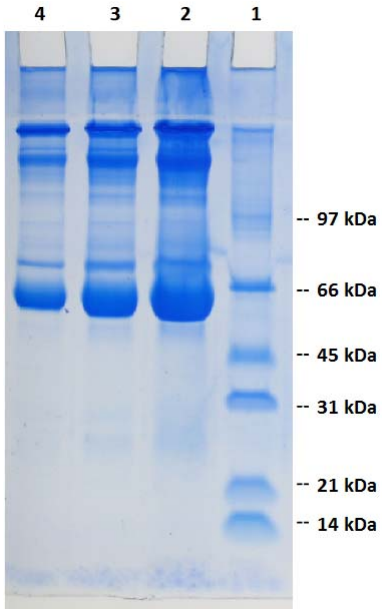


Fig. 1. SDS PAGE image of the fraction of soluble fibrin monomer complexes obtained from:
1. Molecular weight ladder; 2. Patients with AIS; 3. Patients with CIS; 4. Healthy donors

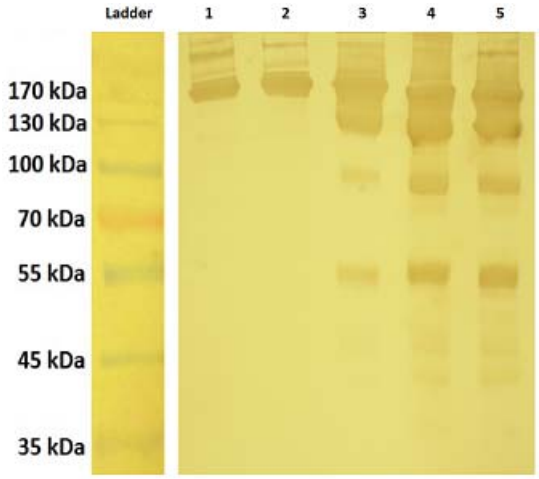


Fig. 2. Western Blot image of fraction of the soluble fibrin monomer complexes obtained from:
1. Healthy donors; 2. Patients with acute AIS; 3. Patients with acute CIS;
4. Patients with year past AIS; 5. Patients with year past CIS

Tables 2. **Content of fraction of soluble fibrin monomer complexes in plasma of ischemic stroke patients**

Healthy donors	AIS		CIS	
	Acute	Year past	Acute	Year past
>330	>330	>330	>330	>330
260	260	260	260	260
250	250	250	250	250
220	220	220	220	220
195	195	195	195	195
160	160	160	160	160
130	130	130	130	130
100	100	100	100	100
-	-	80	80	80
-	-	60	60	60
-	-	-	-	-
-	-	45	45	45
-	-	35	35	35
-	-	-	25	25
-	-	-	10	10

Conclusion. It was shoved that o-phenanthroline method of the detection of SFMC concentration is accompanied by the additional precipitation of fibrinogen and fibrin fragments. The presence of hipercoagulation marker as soluble fibrin monomer complexes in increased concentration in blood plasma of acute stroke patients was shown. This is evidence of coagulation activation. Nevertheless the concentrations of SFMC become more close to physiological one year past ischemic stroke. Instead of the concentration, the qualitative content of the year post stroke SFMC fraction was characterized by the higher diversity in comparison with acute fraction both subtypes of ischemic stroke. It could be explained by activation of the fibrinolysis one year past ischemic stroke attack. Moreover the presence of fibrin and fibrinogen degradation products in the acute CIS fraction and absence of this fragments in acute AIS fractions showed the shifted in time of the fibrinolysis process for AIS.

References

1. *GBD 2013 Mortality* and Causes of Death Collaborators. A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. – Lancet. – 2015. – Vol. 385. – P. 117–71.

2. *Adamson J.* Is stroke the most common cause of disability? / J. Adamson, A. Beswick, S. Ebrahim // Stroke Cerebrovasc Dis. – 2004. Vol. 13. – P. 171–177.

3. *Wolfe C.D.A.* The impact of stroke / C.D.A. Wolfe // Brit.Med.Bull., 2000. – Vol. 56, N 2. – P. 275-286.

4. *Swarowska M.* Hyperfibrinogenemia predicts long-term risk of death after ischemic stroke / M. Swarowska, A. Polczak, J. Pera et al. // J. Thromb. Thrombolysis, 2014. – Vol. 38. – P. 517–521.

5. *Sanjeev P.* Overview of the coagulation system / P. Sanjeev, R. Saroa, A. Palta // Indian. J. Anaesth., 2014. – Vol. 58, N 5. – P. 515–523.

6. *Tynngerd N.* Assays of different aspects of haemostasis – what do they measure? / N. Tynngerd, T. Lindahl, S. Ramstrum // Thromb J., 2015. – Vol. 13. – P. 8.

7. *Johansson P.I.* Management of major blood loss: an update. / P.I. Johansson, S.R. Ostrowski, N.H. Secher // Acta Anaesthesiol Scand., 2010. – Vol. 54. – P. 1039–49.

8. *Clinical* implication of plasma level of soluble fibrin monomer-fibrinogen complex in patients with abdominal aortic aneurysm / A. Hosaka et al. // J. Vasc. Surg., 2005. – Vol. 42, № 2. – P. 200–205.

9. *Momot A.* Methodology and clinical significance of paracoagulation phenantroline test. / A. Momot, V. Lakomov, S. Barkagan // The wedge. laboratory diagnosis, 1996. – Vol. 4. – P. 17–20.

10. *Takahashi D.* Evaluation of hypercoagulability using soluble fibrin monomer complex in sick newborns / D. Takahashi // Pediatr. Int., 2013. – Vol. 55, № 2. – P. 151–156.

11. Cleveland D. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. / Fischer S, Kirschner M, Laemmli UK.// Journal of Biological Chemistry. – 1977. Vol. 252. N. 3. – P. 1102-1106.

12. Weber K. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacriylamide gel electrophoresis./ Osborn M. // The Journal of Biological Chemistry. – 1969. Vol. 244. N.16. – P. 4406–4412.

References (Scopus)

1. GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. Lancet. 2015; 385: 117–71.

2. Adamson J. Beswick A, Ebrahim S. Is stroke the most common cause of disability? Stroke Cerebrovasc Dis. 2004;13: 171–177. English.

3. Wolfe C.D.A. The impact of stroke. Brit.Med.Bull. – 2000; 56(2). 275-286. English.

4. Swarowska M., Polczak A., Pera J., Klimkowicz-Mrowiec A., Slowik A., Dziedzic T. Hyperfibrinogenemia predicts long-term risk of death after ischemic stroke. J. Thromb. Thrombolysis. 2014; 38: 517–521. English.

5. Sanjeev Palta, Richa Saroa Anshu Palta Overview of the coagulation system. Indian J Anaesth. 2014 Sep-Oct; 58(5): 515–523. English.
6. Nahreen Tynngerd, Tomas L Lindahl, Sofia Ramstrцm Assays of different aspects of haemostasis – what do they measure? Thromb J. 2015; 13: 8. English.
7. Johansson PI, Ostrowski SR, Secher NH. Management of major blood loss: an update. Acta Anaesthesiol Scand. 2010;54:1039–49. English.
8. A. Hosaka et al. Clinical implication of plasma level of soluble fibrin monomer-fibrinogen complex in patients with abdominal aortic aneurysm. J. Vasc. Surg. 2005; 42(2): 200 – 205. English.
9. Momot A, Lakomov V, Barkagan S. Methodology and clinical significance of paracoagulation phenantroline test. The wedge. laboratory diagnosis. 1996;4:17-20. English.
10. D. Takahashi et al. Evaluation of hypercoagulability using soluble fibrin monomer complex in sick newborns. Pediatr. Int. 2013; 55(2): 151 – 156. English.
11. 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.
12. Weber K, Osborn M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacriylamide gel electrophoresis. The Journal of Biological Chemistry. 1969;244(16):4406–4412. English.

Submitted on 20.12.16

Т. Катрій, асп., Н. Шабанова, маг., С. Остапчук, студ., О. Савчук, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ХАРАКТЕРИСТИКУ РОЗЧИННИХ ФІБРИН-МОНОМЕРНИХ КОМПЛЕКСІВ У ХВОРИХ ІШЕМІЧНИМ ІНСУЛЬТОМ У ГОСТРУ ФАЗУ ТА ЧЕРЕЗ РІК ПІСЛЯ ПЕРЕНЕСЕНОЇ ГОСТРОЇ ФАЗИ

Показано, що о-фенантроліновий метод визначення концентрації розчинних фібрин мономерних комплексів супроводжується додатковим осадженням фрагментів фібриногену та фібрину у плазмі крові. Доведено, що за атеротромботичного та кардіоемболічного підтипів ішемічного інсульту в гострій фазі захворювання у плазмі крові присутні висококонцентровані розчинні фібрин-мономерні комплекси, що є показником високої активності коагуляційної ланки системи гемостазу. Проте їх концентрація повертається до норми через один рік після перенесеної гострої фази. На відміну від концентрації, її якісний вміст для обох підтипів ішемічного інсульту характеризується більшою різноманітністю через рік після перенесеної гострої фази. Присутність фрагментів фібриногену та фібрину в обох річних фракціях інсультів доведено, що є свідченням активації фібринолітичної ланки гемостазу через рік після перенесеного захворювання. Наявність фрагментів фібриногену і фібрину в гостру фазу кардіоемболічного ішемічного інсульту та відсутність їх у гостру фазу атеротромботичного ішемічного інсульту вказує на відсутність якісної відповіді системи фібринолізу в гостру фазу атеротромботичного ішемічного інсульту.

Ключові слова: розчинний фібрин мономерних комплексів, ішемічний інсульт, гемостаз.

Т. Катрий, асп., Н. Шабанова, маг., С. Остапчук, студ., А. Савчук, д-р биол. наук,
Киевський национальный университет имени Тараса Шевченка, Киев, Украина

ХАРАКТЕРИСТИКА РАСТВОРИМЫХ ФИБРИН-МОНОМЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ У БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКИМ ИНСУЛЬТОМ В ОСТРУЮ ФАЗУ И ЧЕРЕЗ ГОД ПОСЛЕ ПЕРЕНЕСЕННОЙ ОСТРОГОЙ ФАЗЫ

Было показано, что о-фенантролиновый метод определения концентрации растворимых фибрин мономерных комплексов сопровождается преципитацией фрагментов фибриноген фибрина в плазме крови. Доказано, что атеротромботический и кардиоэмболический подтипы ишемического инсульта в острой фазе заболевания сопровождается появлением высокой концентрации растворимых фибрин-мономерных комплексов в плазме крови, что является показателем активации коагуляции. Однако их концентрация возвращается к норме через один год после острой фазы. В отличии от концентрации исследуемой фракции, ее качественный контент для обоих подтипов ишемического инсульта характеризуется большим разнообразием через год после перенесенной острой фазы по сравнению с аналогичной фракцией полученной в острую фазу. Наличие фрагментов фибриногена и фибрина в обеих годовых фракциях было показано, что является свидетельством активации фибринолиза через год после атаки ишемического инсульта. Кроме этого присутствие фрагментов фибриногена и фибрина в острой фазе кардиоэмболического ишемического инсульта в отличии от острой фазы атеротромботического ишемического инсульта говорит об отсутствии качественного ответа системы фибринолиза в острую фазу атеротромботического ишемического инсульта.

Ключевые слова: растворимый фибрин мономерных комплексов, ишемический инсульт, гемостаз.

УДК 57.089.7

Є. Опейда, асп., М. Рудик, канд. біол. наук,
В. Святецька, інж. 1-кат., Л. Сківка, д-р біол. наук,
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна
О. Федорчук, канд. біол. наук,
Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р.Є. Кавецького НАН України, Київ, Україна

РЕАКЦІЯ ЛІМФОЇДНИХ ОРГАНІВ ЩУРІВ НА РІСТ ГЛІОМИ С6

Дослідження реакції периферичних організованих лімфоїдних структур на присутність злоякісної пухлини в мозку відкриває перспективи застосування імунотерапевтичних підходів до лікування цього захворювання, спрямованих на активацію презентації пухлинних антигенів поза зоною росту злоякісного новоутворення. Метою роботи була оцінка вагових індексів і клітинності лімфоїдних органів за умов росту гліоми С6 у щурів. Встановлено, що ріст гліоми С6 супроводжується зміною клітинності органів лімфатичної системи. Зареєстровані зміни вказують на ймовірність презентації антигенів гліоми С6 у периферичних організованих лімфоїдних утвореннях, а також на негативний вплив росту гліоми С6 на гомеостаз тимусу та селезінки.

Ключові слова: лімфоїдні органи, гліома, клітинність органу, ваговий індекс.

Вступ. Тривалий час загально визнаним вважався постулат про те, що мозок є "імунологічно привілейованою" тканиною, ізольованою від імунної системи гемато-енцефалічним бар'єром. Відсутність лімфатичних судин у мозку, згідно цього постулату, унеможливлює транспорт мозкових антигенів у периферичні організовані лімфоїдні структури [1]. Наразі відомо, що розчинні антигени і клітини з ЦНС здатні потрапляти у периферичні лімфоїдні органи шляхом дренажу тканинної та спинномозкової рідини назальними та шийними лімфовузлами. З кров'ю мозкові антигени можуть також потрапляти у селезінку [2].

Реакція організованих лімфоїдних структур на присутність злоякісної пухлини у мозку є важливим питанням фундаментальної і прикладної імунології. Оцінка вагових та клітинних показників лімфоїдних органів ві-

© Опейда Є., Рудик М., Святецька В., Сківка Л., Федорчук О., 2017

дображає загальний стан імунної реактивності на рівні організму та її генералізовану реакцію на пухлинний ріст в імунологічно привілейованому компартменті [3]. Крім того, вивчення феномену презентації антигенів пухлин головного мозку у периферичних організованих лімфоїдних структурах відкриває перспективи застосування імунотерапевтичних підходів до лікування цього захворювання, спрямованих на активацію презентації пухлинних антигенів поза зоною росту пухлини. Провідне місце у структурі злоякісних новоутворень ЦНС займають гліоми, які складають близько 40-45 % усіх інтракраніальних пухлин. Гліоми – це пухлини з високим ступенем злоякісності, котрі уражують переважно осіб працездатного віку [4, 5]. Згідно статистичних даних, гліоми складають усього 1,4 % від усіх діагностованих у клініці пухлин, однак не зважаючи на їх малу частку, прогноз для пацієнтів з гліомами є одним із найгірших. Так, середня тривалість життя пацієнтів зі злоякісними гліомами мозку в Україні складає близько 8 міс., у США – 14 міс. з моменту встановлення діагнозу [6]. Саме тому проблема лікування пацієнтів з гліомами різного ступеню злоякісності наразі є однією з найгостріших у клінічній онкології. Традиційні методи лікування гліом, серед яких основним є хірургічне, залишаються мало результативними і не знижують смертності від цієї патології. Перспективним напрямком у лікуванні гліом вважають імунотерапію [7, 8].

У роботі використовували гліому мозку щурів С6, отриману Benda у 1968 році у результаті хімічної індукції N,N-нітрозо-метилсечовиною [9, 10]. Вона характеризується низькою васкуляризацією, високоінвазивним ростом та відсутністю метастазів поза межами ЦНС. С6 вважають моделлю, яка є найбільш близькою до гліобластоми людини [11, 12], тому ця лінія як модельна застосовується для проведення доклінічних досліджень нових хіміопрепаратів, рекомендованих при пухлинах мозку.

Доведено, що розвиток гліом супроводжується порушенням гомеостазу тимусу – лімфоїдного органу, який має виключне значення у протипухлинному захисті організму [13]. Поруч з тимусом, важливу роль у протипухлинній резистентності відіграють також селезінка і печінка. Селезінка є осередком активації антитілогенезу у відповідь на Т-залежні антигени, основним джерелом природних кілерних клітин у мишей і щурів. Печінка є основним органом екстратимічного дозрівання Т-лімфоцитів у випадку порушення тимічного гомеостазу, а також органом, що регулює локальні і системні запальні імунні реакції. Крім того, селезінка і печінка є осередками екстрамедулярного гемопоезу, активація якого властива пухлинному росту та асоційованому з ним паранеопластичному синдрому і супроводжується гепато- і спленомегалією. Реакція печінки і селезінки в умовах росту пухлин головного мозку практично не досліджена.

Метою даної роботи була оцінка вагових індексів та клітинності лімфоїдних органів за умов росту гліоми С6 у щурів.

Матеріали та методи досліджень. Длявнутрішньомозкової інокуляції пухлинних клітин та локальної імунотерапії цієї пухлини, запланованої у подальших дослідженнях, нами було розроблено пристрій для багатократних внутрішньомозкових експериментальних досліджень, що містить інтракраніальний катетер (№ заявки на винахід **a 2016 07307** від 05.07.2016).

Дослідження проведені на білих нелінійних статевозрілих щурах (2-3 місячних) масою 200-250 г розведення віварію ННЦ "Інституту біології та медицини" КНУ імені Тараса Шевченка. Після рандомізації за вагою тварини були поділені на три групи по вісім тварин у кожній: 1 група – інтактні тварини, 2 група – тварини, яким робили операцію по встановленню інтракраніального катетера без перещеплювання пухлини, 3 група – тварини, яким встановлювали інтракраніальний катетер та перещеплювали пухлину. Усі дослідження на тваринах здійснювали згідно із нормами, встановленими законом України №3447-IV "Про захист тварин від жорстокого поводження" і норм, прийнятих в Європейській конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних і наукових цілей від 20.09.1985 [14].

Культуру клітин гліоми щурів С6 було отримано з Національного банку клітинних ліній людини та тварин при ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Клітини лінії гліоми щурів С6 культивували у культуральному пластику класу cell+ (Sarsted, Німеччина) у повному культуральному середовищі DMEM у CO_2-інкубаторі за 37 °С. При пересівах клітини знімали трипсинізацією (0,1 % розчин трипсину). Для перещеплення тваринам брали клітини з третього пасажу на період формування половини від конфлюенту (фаза експоненційного росту культури).

Перещеплення гліоми С6 щурам проводили після загальної анестезії із застосуванням в/ч кетаміну (0,1 мг/г тварини) і седазину (0,02 мг/г тварини) з використанням пристрою для багатократних внутрішньомозкових експериментальних дослідженьметодом інтрацеребральної інокуляції 50 мкл клітинної суспензії (600 тис. клітин на тварину) у ліву тім'яну зону (передній ріг лівого бокового шлуночку) на відстані 3 мм від *sinus sagittalis* для уникнення інтракраніальної кровотечі. Тваринам також безпосередньо перед операцією вводили 0,25 % маркаїну в дозі 0,04 мл/г для полегшення болю протягом 6-8 годин. Контроль пухлинного росту здійснювали за показниками середньої тривалості життя тварин та їх вагою в динаміці після інокуляції пухлинних клітин.

Реакцію органів імунної системи щурів: регіонарних (по відношенню до місця введення пухлинних клітин) шийних лімфовузлів, селезінки, тимусу, а також печінки оцінювали за відносною масою органу (ваговим індексом), котрий розраховували за формулою: маса органу/загальна маса тварини, а також за відносною клітинністю органу (відносною кількістю каріоцитів), який визначали за формулою: абсолютна клітинність/маса органу [15]. Абсолютну клітинність органів визначали у тканинному гомогенаті, отриманому шляхом механічної гомогенізації з наступним осмотичним лізисом еритроцитів.

Для визначення сироваткового рівня циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) використовували метод преципітації в 3,75 % поліетиленгліколі (ПЕГ) 6000 (в мікромодифікації). Паралельні розведення досліджуваної сироватки інкубували 1 год. за кімнатної температури в борно-боратному буфері (pH=8,4) та ПЕГ. Вимірювали оптичну густину преципітату за довжини хвилі 450 нм [16].

Статистичну обробку результатів проводили методами варіаційної статистики з розрахунком середнього значення, середнього квадратичного відхилення(σ) та середньої квадратичної похибки(m). Для визначення вірогідної відмінності показників використовували t-критерій Стьюдента [14].

Результати та їх обговорення.

Ріст гліоми С6 супроводжувався зниженням маси дослідних тварин, починаючи з 10 доби після інокуляції пухлинних клітин (табл.1). На момент закінчення експерименту маса тварин з пухлинами була майже у півтора рази нижчою від маси контрольних щурів. Слід зазначити, що встановлення пристрою для багатократних внутрішньомозкових експериментальних досліджень не впливало на масу дослідних тварин.

***Таблиця* 1. Вага щурів після перещеплення пухлини. (n=8 у всіх групах)**

Групи тварин	1й день	4й день	7й день	10й день	13й день	16й день	21й день
Інтактні тварини	231,8± 13,28 г	247± 9,56 г	265± 10,11 г	275,8± 9,76 г	282,4± 11,7 г	295,2± 10,4 г	305,5± 14,58 г
Інтактні тварини з інтракраніальним катетером	233,4± 8,98 г	244,5± 10,36 г	256,25± 4,73 г	278,75± 9,91 г	290,5± 10,4 г	302± 12,36 г	317± 11,48 г
Тварини з гліомою С6	235,6± 9,68 г	238,5± 7,21 г	245,25± 6,96 г	244,5± 17,09 г	239± 15,54 г	222,6± 31,6 г #	225± 17,22 г *#

* – p<0,05 відносно показників щурів відповідної контрольної групи.
# – p<0,05 відносно показників щурів з катетером.

Тривалість життя тварин з гліомою на момент закінчення експерименту (21 доба після трансплантації пухлинних клітин) була на 15 % меншою за аналогічний показник контрольних тварин (рис. 1).Середня тривалість життя інтактних неоперованих тварин та тварин з інтракраніальним катетером достовірно не відрізнялася.

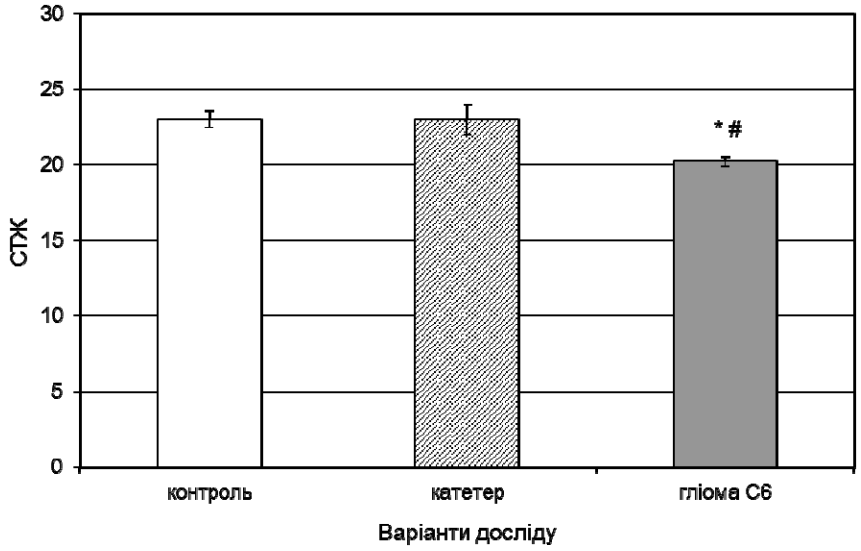


Рис.1. Середня тривалість життя щурів на 21 добу після перещеплення гліоми С6 (n=8 у всіх групах)

* – p<0,05 відносно показників щурів відповідної контрольної групи.
# – p<0,05 відносно показників щурів з катетером.

Порівняльний аналіз вагових показників і клітинності лімфоїдних органів у контрольних тварин і тварин з гліомою С6 показав наступне. Вагові індекси дренуючих шийних лімфовузлів у тварин з пухлиною не відрізнялися достовірно від аналогічних показників контрольних щурів (табл.2). Однак кількість каріоцитів у реґіонарних по відношенню до зони пухлинного росту лімфовузлах була достовірно вищою у тварин з пухлинами, що вказує на імовірну презентацію пухлинних антигенів у цьому організованому лімфоїдному утворі.

Функції тимусу полягають у регуляторному впливі на рівень як клітинного, так і гуморального імунітету шляхом експорту на периферію ефекторних та регуляторних клітин. У наших дослідженнях відносна вага тимусу у щурів з гліомою С6 не відрізнялася від такої у контрольних тварин (табл.2).

***Таблиця* 2. Вагові індекси і відносна клітинність шийних лімфовузлів, тимусу, селезінки та печінки у щурів з гліомою С6, n=8 у всіх групах**

Показник	Інтактні тварини	Інтактні тварини з інтракраніальним катетером	Тварини з гліомою С6
Ваговий індекс лімфовузлів (ум.од.)	$2,52\pm0,54Ч10^{-4}$	$2,47\pm0,15Ч10^{-4}$	$2,30\pm0,6Ч10^{-4}$
Клітинність лімфовузлів (кількість каріоцитів/г ваги органу)	$60,64\pm13,6Ч10^{7}$	$63,23\pm14,2Ч10^{7}$	$113,16\pm14,1Ч10^{7}$
Ваговий індекс тимуса (ум.од.)	$14,59\pm1,28Ч10^{-4}$	$15,12\pm2,14Ч10^{-4}$	$13,03\pm1,06Ч10^{-4}$
Клітинність тимусу (кількість каріоцитів/г ваги органу)	$29,95\pm5,61Ч10^{7}$	$35,48\pm4,91Ч10^{7}$	$13,75\pm4,99Ч10^{7\#}$
Ваговий індекс селезінки (ум.од.)	$67,22\pm6,86Ч10^{-4}$	$70,73\pm7,61Ч10^{-4}$	$49,91\pm7,05Ч10^{-4*}$
Клітинність селезінки (кількість каріоцитів/г ваги органу)	$78,13\pm4,08Ч10^{7}$	$84,2\pm1,56Ч10^{7}$	$52,53\pm4,48Ч10^{7\#}$
Ваговий індекс печінки (ум.од.)	$41,14\pm0,21Ч10^{-4}$	$38,77\pm0,66Ч10^{-4}$	$36,47\pm1,5Ч10^{-4}$
Клітинність печінки (кількість каріоцитів/г ваги органу)	$122,33\pm5,6Ч10^{7}$	$115,66\pm7,8Ч10^{7*}$	$151,66\pm6,3Ч10^{7}$

– p<0,05 відносно показників клітинності у контрольних щурів.

Зареєстровано статистично вірогідне зменшення кількості тимоцитів, що вказує на негативний вплив росту гліом на гомеостаз тимусу і узгоджується з даними інших дослідницьких груп [13]. Показники тимусу у тварин з катетером не відрізнялися від таких у контрольних неоперованих тварин.

Мікрооточення селезінки сприяє міжклітинним контактам і генерації імунної відповіді. Головні події, які відбуваються в селезінці – індукція Т-залежної В-клітинної імунної відповіді, генерація антитілопродукуючих В-лімфоцитів і проліферація CD8+ Т-лімфоцитів. [17]. За результатами наших досліджень відмічено зниження вагового індексу та достовірне зниження кількості каріоцитів у щурів з гліомою С6 порівняно з показниками контрольних інтактних тварин (табл.2). Можна припустити, що зареєстрована гіпоспленія є наслідком загальної кахексії, притаманної агресивному перебігу пухлинного процесу за росту гліом. Крім того, однією з причин зменшення показника клітинності селезінки може бути нещодавно описаний експорт селезінкових мієлоїдних супресорних клітин у зону пухлинного росту [18]. Показники вагових індексів і клітинності селезінки тварин з катетером не відрізнялися від аналогічних показників неоперованих тварин.

Вагові показники печінки та клітинність органу у груп щурів, яким проводили операцію без перещеплення пухлини, також були подібними до показників неоперованих тварин (табл.2). Зареєстровано зменшення вагового індексу печінки і значне підвищення відносної кількості печінкових каріоцитів у щурів з пухлиною, що вказує на наявність запалення у супроводі деструктивно-дегенеративних процесів в органі, загальну інтоксикацію організму з явищем кахексії, зареєстровані також у тварин з гліомою іншими дослідницькими групами [19].

Додатково до аналізу вагових показників і клітинності лімфоїдних органів ми досліджували сироватковий рівень ЦІК (рис. 2). За фізіологічних умов, утворення та присутність ЦІК у біологічних рідинах є одним з проявів імунної відповіді організму на надходження антигенів. Утворені імунні комплекси деякий час циркулюють в лімфі і крові, після чого відбувається їх елімінація фагоцитами печінки і селезінки. Рівень ЦІК в сироватці крові є важливим показником імунної реактивності, оскільки відображає не лише ступінь навантаження організму антигенами, а й дегенеративні явища у тканинах [20].

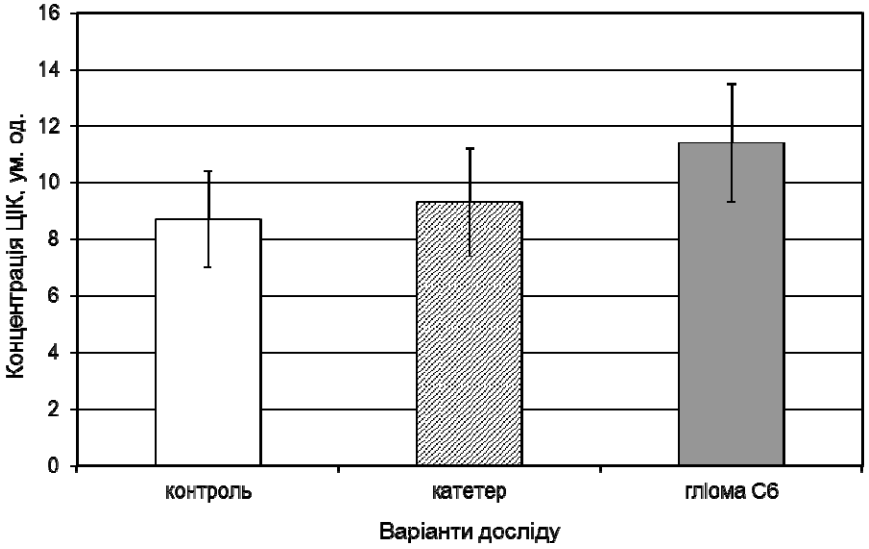


Рис.2. Рівень циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові щурів з гліомою С6 (n=8 у всіх групах)

За результатами наших досліджень незначно підвищений сироватковий рівень ЦІК спостерігався у групі тварин, яким перещеплювали пухлину. Слід відмітити значну індивідуальну варіабельність цього показника у тварин усіх дослідних груп.

Висновок. Таким чином,за результатами наших спостережень ріст гліоми С6 супроводжується зміною клітинності органів лімфатичної системи, залучених у презентацію антигену і генерацію адаптивної імунної відповіді. Зареєстровані зміни вказують на імовірність презентації антигенів гліоми С6 у периферичних організованих лімфоїдних утворах, а також на негативний вплив росту гліоми С6 на гомеостаз тимусу і селезінки.

Список використаних джерел

1. *Engelhardt Britta.* The movers and shapers in immune privilege of the CNS / Britta Engelhardt, Peter Vajkoczy& Roy OWeller // Nature Immunology, 2017. – Vol. 18. – P. 123–131.

2. *Alex F. de Vos.* Transferof Central Nervous System Autoantigens and Presentationin Secondary Lymphoid Organs / Alex F. de Vos, Marjanvan Meurs, P. HerbertBrok // JImmunol., 2002. – Vol. 169, № 10. – P. 5415-5423.

3. *Mebius R.E.* Structure and function of the spleen / R.E. Mebius, G. Kraal // Nat Rev Immunol., 2005. – Vol. 5, № 8. – P. 606-616.

4. *McNeill K.A.* Epidemiology of Brain Tumors / K.A. McNeill // Neurol Clin., 2016. – Vol. 34, № 4. – P. 981-998.

5. *Трашков А. П.* Глиальные опухоли головного мозга: общие принципы диагностики и лечения / А. П. Трашков, А. Л. Спирин , Н. В. Цыган // Педиатр, 2015. – Т. VI, № 4. – С. 75-84.

6. *Exciting* new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma / E. G. Meir, C. G. Hadjipanayis, A. D. Norden et al. // CA Cancer J. Clin., 2010. – № 60. – P. 166-193.

7. *Dunn-Pirio A.M.* Immunotherapy approaches in the treatment of malignant brain tumors / A.M. Dunn-Pirio, G. Vlahovic // Cancer., 2017. – Vol. 123, № 5. – P. 734-750.

8. *Farber S.H.* The Safety of available immunotherapy for the treatment of glioblastoma / S.H. Farber, A.A. Elsamadicy, A.F. Atik // Expert Opin Drug Saf., 2017. – Vol. 16, № 3. – P. 277-287.

9. *Barth R. F.* Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the 9L, C6, T9, F98, RG2 (D74), RT-2 and CNS-1 gliomas / R.F. Barth // J. Neuro-Oncology, 1998. – № 96. – P. 91–102.

10. *Grobben G.* Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion / G. Grobben, P. Deyn, H. Slegers // Cell Tissue Res., 2002. – № 310. – P. 257-270.

11. *Histopathology*, invasion, migration and tumorigenicity in the C6 rat glioma model / C. Kemerli, M.M. Taskin, N. Sutpideler et al. // Turkish Neurosurgery, 2005. – Vol. 15, № 3. – P. 109-115.

12. *Tumormodelsincancerresearch* ; Ed. B. Teicher. – N.-Y. : Humana Press, 2011. – 693 p.

13. *Structural* and functional features of central nervous system lymphatic vessels / A. Louveau, I. Smirnov, T.J. Keyes et al. // Nature, 2015. – № 1. – P. 523-537.

14. *Резников О.* Проблеми етики при проведенні експериментальних медичних і біологічних досліджень на тваринах / О. Резников // Вісн. НАН України, 2001. – № 1. – С. 5-7.

15. *Kozlowska E.* Sensitivity of mouse lymphoid and nonlymphoid organsto. Silesian air pollutants / E. Kozlowska, J. Kopec-Szlezak, N. Drela // Ecotoxicol. Environ. Saf., 1997. – № 37. – P. 10-16.

16. *Передерій В.Г.* Основи внутрішньої медицини / В.Г. Передерій, С.М. Ткач. – Київ : Нова Книга, 2010. – 1006 с.

17. *Giovanni Tarantino.* Liver-spleen axis: Intersection between immunity, infection sand metabolism / Giovanni Tarantino, Antonella Scalera, Carmine Finelli // World J. Gastroenterol., 2013. – Vol. 19, № 23. – P. 3534–3542.

18. *Maenhout S.K.* Location, location, location: functionalandphenotypicheterogeneitybetweentumor-infiltratingandnon-infiltratingmyeloid-derivedsuppressorcells/ S.K. Maenhout, K. Thielemans, J.L. Aerts // Oncoimmunology, 2014. – Vol. 3, № 10. – e956579.

19. *Pouliquen D.L.* Hepatic mitochondrial function and brain tumours / D.L. Pouliquen //Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care, 2007. – Vol. 10, № 4. – P. 475-479.

20. *Egner W.* The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE / W. Egner // J. Clin. Pathol., 2000. – № 6. – P. 424-432.

References

1. Britta Engelhardt, Peter Vajkoczy& Roy OWeller. The movers and shapers in immune privilege of the CNS. Nature Immunology. 2017:18:123-131.

2. Alex F. deVos. Transfer of Central Nervous System Autoantigens and Presentation in Secondary Lymphoid Organs. JImmunol. 2002:169(10):5415-5423.

3. Mebius R.E., Kraal G. Structure and function of the spleen. Nat Rev Immunol. 2005:5(8):606-616.

4. McNeill K.A. Epidemiologyof Brain Tumors. Neurol Clin. 2016:34(4):981-998.

5. Trashkov A.P., Spirin A.L., Tsygan N.V. Glialnyeopyholigolovnogomozga:obshyeprinzupudiagnostykyandlechenya. Pediatr. 2015:4:75-84. Russian.

6. Meir E. G., Hadjipanayis C. G., Norden A. D. etal. Excitingnewadvancesinneuro-oncology: theavenuetoacureformalignant glioma. CA Cancer J. Clin. 2010:60:166-193.

7. Dunn-Pirio AM, Vlahovic G. Immunotherapy approaches in the treatment of malignant brain tumors. Cancer. 2017:123(5):734-750.

8. Farber SH, Elsamadicy AA, Atik AF, Suryadevara CM, Chongsathidkiet P, Fecci PE, Sampson JH. The Safety of available immunotherapy for the treatment of glioblastoma. Expert Opin Drug Saf. 2017:16(3):277-287.

9. Barth R. F. Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the 9L, C6, T9, F98, RG2 (D74), RT-2 and CNS-1 gliomas. J. Neuro-Oncology. 1998:96:91-102.

10. Grobben G., Deyn P., Slegers H. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. Cell Tissue Res. 2002:310:257-270.

11.KemerliC., TaskinM. M., SutpidelerN. etal. Histopathology, invasion, migration and tumorigenicity in the C6 rat glioma model. Turkish Neurosurgery. 2005:15(3):109-115.

12.Tumormodelsincancerresearch / Ed. B. Teicher. -N.-Y.: HumanaPress, 2011:693 p.

13.LouveauA, SmirnovI, KeyesTJ, EcclesJD, RouhaniSJ, PeskeJD, etal. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. Nature. 2015:1:523-337.

14.Reznikov A. Problemy e'tiki pri provedenii e'ksperimental'nyh medicinskih i biologicheskih issledovanij na zhivotnyh. Vestn. NANUkrainy. 2001:1:5-7. Russian.

15. Kozlowska E., J. Kopec-Szlezak, N. Drela. Sensitivity of mouse lymphoid and nonlymphoid organsto. Silesian air pollutants. Ecotoxicol. Environ. Saf. 1997:37:10-16.

16. Pereduy V.G., Tkach S.M. Osnovyvnyntrysnyoymedyzyny / Pereduy V.G., Tkach S.M. . – Kyiv. Nova Knuga. 2010:1006. Ukranian.

17. Giovanni Tarantino, Antonella Scalera, Carmine Finelli. Liver-spleen axis: Intersection between immunity, infection sand metabolism. World. J. Gastroenterol. 2013:19(23): 3534-3542.

18. Maenhout S.K., Thielemans K., Aerts J.L. Location, location, location: functional and phenotypic heterogeneity between tumor-infiltratin gandnon-infiltratingmyeloid-derivedsuppressorcells. Oncoimmunology. 2014: 15; 3(10): e956579.

19. Pouliquen D.L. Hepatic mitochondrial function and brain tumours. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2007:10(4):475-479.

20. Egner W.The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. J Clin Pathol. 2000:6:424-432.

Надійшла до редколегії 21.03.17

Е. Опейда, асп., М. Рудик, канд. биол. наук,
В. Святецкая, инж. 1 кат., Л. Скивка, д-р биол. наук,
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченка, Киев, Украина,
А. Федорчук, канд. биол. наук,
Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии имени Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев, Украина

РЕАКЦИЯ ЛИМФОИДНЫХ ОРГАНОВ КРЫС НА РОСТ ГЛИОМЫ С6

Исследование реакцииперифирических организованных лимфоидных структур на присутствие злокачественной опухоли в мозге открывает перспективы применения иммунотерапевтических подходов к лечению этого заболевания вне зоны роста злокачественного новообразования. Целью работы была оценка весовых индексов и клеточности лимфоидных органов в условиях роста глиомы С6 у крыс. Установлено, что рост глиомы сопровождается изменениями клеточности органов лимфатической системы. Зарегистрированные изменения указывают на вероятность презентации антигенов глиомы С6 в периферических лимфоидных структурах, а также на негативное влияние роста глиомы на гомеостаз тимуса и селезенки.

Ключевые слова: лимфоидные органы, глиома, клеточность органа, масовый индекс.

I. Opeida, Ph. D. stud., M. Rudyk, Ph. D.,
V. Svyatetska, master, L. Skivka, D. Sci.,
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
O. Fedorchuk, Ph. D.,
Kavetsky Institute of Experimental pathology, onkology and radiobiology, NASU, Kyiv, Ukraine

REACTION OF LYMPHOIDAL ORGANS OF RATS TOTHE GROWTH OF GLIOMA C6

The study of the responce of peripheral lymphoid structures to the presence of malignant tumor in the brain offers the challenge for the use of immunotherapeutic approaches for the treatment of this disease. This work was aimed to evaluate weight indices and cellularity of lymphoid organs in rat with C6 glioma. One was found that the growth of glioma is accompanied by changes in the cellularity of the organs of the lymphatic system. The observed changes indicate the likelihood of the presentation of C6 glioma antigens in peripheral lymphoid structures, as well as the negative impact of glioma growth on thymus and spleen homeostasis.

Key words: lymphoid organs, glioma, cellularity of the organ, mass index.

Наукове видання

ВІСНИК

КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ПРОБЛЕМИ РЕГУЛЯЦІЇ ФІЗІОЛОГІЧНИХ ФУНКЦІЙ

Випуск 1(22)

Оригінал-макет виготовлено ВПЦ "Київський університет"

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

Формат 60x84$^{1/8}$. Ум. друк. арк. 7,8. Наклад 300. Зам. № 216-8018.
Гарнітура Arial. Папір офсетний. Друк офсетний. Вид. № Б 6.
Підписано до друку 09.06.17

Видавець і виготовлювач
ВПЦ "Київський університет"
01601, Київ, б-р Т. Шевченка, 14, кімн. 43
☎ (38044) 239 32 22; (38044) 239 31 72; тел./факс (38044) 239 31 28
e-mail: vpc@univ.kiev.ua
http: vpc.univ.kiev.ua
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 1103 від 31.10.02