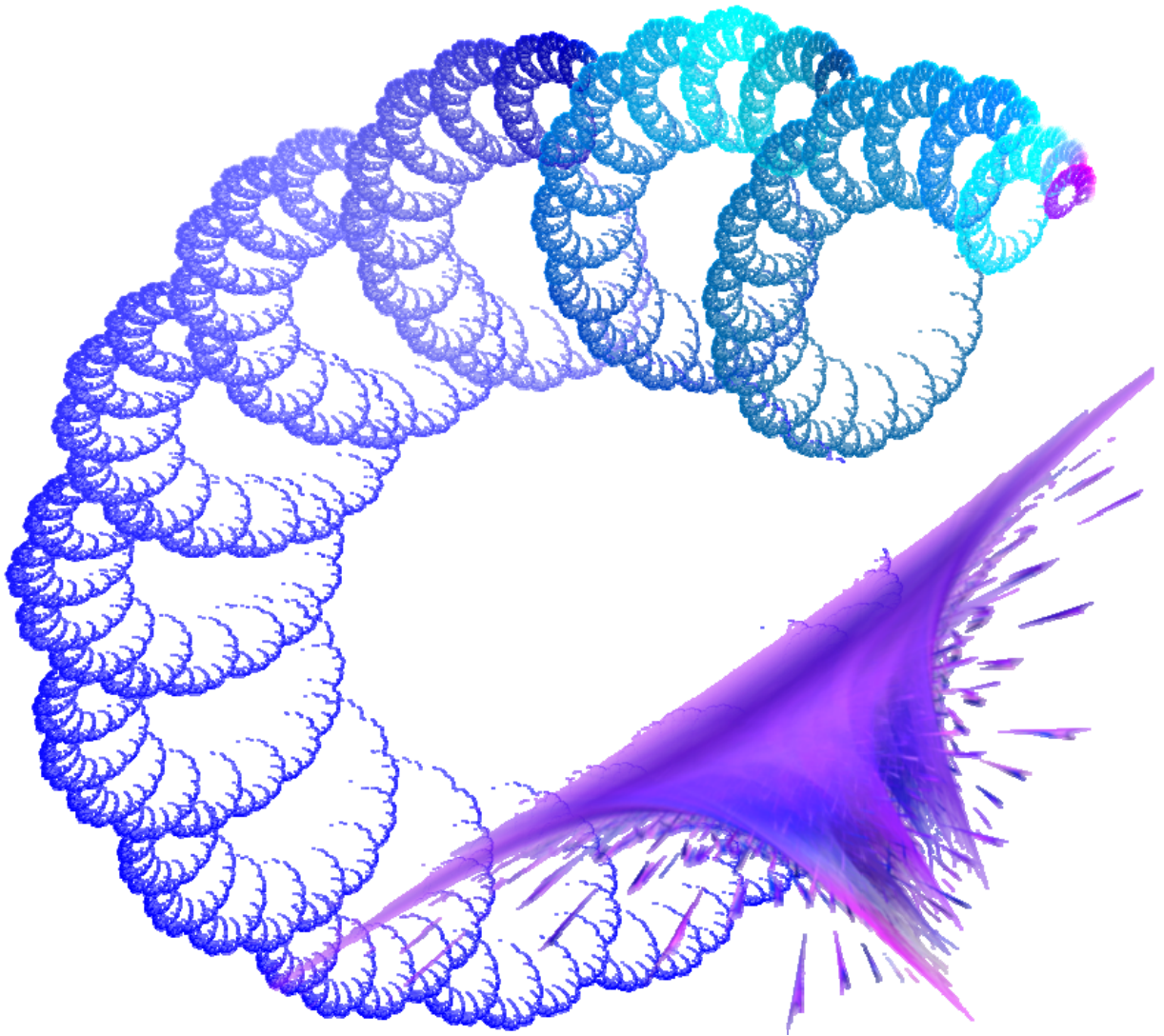
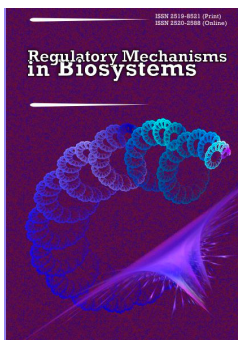


ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)

Regulatory Mechanisms in Biosystems



Volume 8(1)



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)

Aims and scope. *Regulatory Mechanisms in Biosystems* publishes peer-reviewed original research and review articles across all aspects of regulatory mechanisms in biological systems from the molecular level of organisation to the level of the organism. This journal mostly focuses on physiological mechanisms of regulation of metabolic processes, biochemical and physiological features of any species including human beings. This journal covers a wide range of regulatory mechanisms in biological systems that are associated both with natural processes and those transformed under the influence of chemicals and drugs, and any other man-made factors. We will publish papers concerned solely with clinical case studies and clinical trials if such articles address important questions in regulatory mechanisms in biosystems. *Regulatory Mechanisms in Biosystems* focuses on good-quality research, reporting scientifically sound observations and valid conclusions, which bring new and important information to the attention of the wider international scientific community. The journal publishes contributions in the following basic areas: biochemistry, bioinformatics, biophysics, cell biology, endocrinology, genetics, immunology, microbiology, molecular biology, physiology, neuroscience, pharmacology, toxicology.

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief:

Prof., D. Sc., *O. Y. Pakhomov*, Department of Zoology and Ecology, Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Ukraine.

Deputy Editors:

Prof. *I. M. Bondarenko*, M. D., Chief of Department of Oncology, Dnipropetrovsk State Medical Academy, Ukraine;

Prof. *J. A. McLachlan*, Department of Pharmacology, School of Medicine, Tulane University, New Orleans, USA;

Dr. *I. Melamed*, M. D., Department of Neurosurgery, Soroka Medical Center, Ben-Gurion University of the Negev, Beersheba, Israel;

Prof., Ph. D., *S. G. Pierzynowski*, Department of Biology, Lund University, Lund, Sweden;

Executive Editor:

As. Prof., Ph. D., *V. V. Brygadyrenko*, Department of Zoology and Ecology, Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Ukraine.

Editorial Board:

Prof. *P. P. Bachynsky*, M. D., Department of Clinical and Laboratory Diagnostics, Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Ukraine;

Prof., Dr. hab., *W. Barabasz*, Department of Microbiology, Agricultural University of Krakow, Poland;

D. Sc., *Z. Bedő*, Agricultural Research Institute of the Hungarian Academy of Sciences, Hungary;

Prof. *Y. S. Bereznytsky*, M. D., Department of Surgery No 1, Dnipropetrovsk State Medical Academy, Ukraine;

Dr. *M. Boyko*, Ph. D., Department of Anesthesiology, Faculty of Health Sciences, Ben-Gurion University of the Negev, Beersheba, Israel;

P. W. Bradbeer, Alfred Nobel University, Dnipro, Ukraine;

Prof. *A. D. Diudium*, M. D., Department of Dermatovenerology, Dnipropetrovsk State Medical Academy, Ukraine;

Prof., Dr., *G. Fedak*, Eastern Cereal and Oilseed Research Centre (ECORC), Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC), Canada;

As. Prof., Ph. D., *V. Y. Gasso*, Department of Zoology and Ecology, Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Ukraine;

A. O. Huslysty, Department of Geobotany, Soil Science and Ecology, Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Ukraine;

Dr., *S. Kozytka*, Institut fuer Molekulare Infektionsbiologie, Universitaet Wuerzburg, Deutschland;

Prof. *G. M. Kremenchutsky*, M. D., Department of Microbiology, Virology, Immunology and Epidemiology, Dnipropetrovsk State Medical Academy, Ukraine;

Prof., D. Sc., *F. I. Kulikova*, M. D., Department of X-ray Diagnostics, Mechnikov Dnipropetrovsk Regional Clinical Hospital, Ukraine;

Dr., *P. Kuschik*, Department of Environmental Biotechnology, Helmholtz Centre for Environmental Research – UFZ, Leipzig, Germany;

Prof. *O. Y. Loskutov*, M. D., Department of Traumatology and Orthopaedics, Dnipropetrovsk State Medical Academy, Ukraine;

Prof., D. Sc., *O. A. Lykholat*, Department of Goods Knowledge and Custom Expertise, University of Custom Business and Finance, Ukraine;

Prof., D. Sc., *V. S. Nedzvetsky*, Department of Biophysics and Biochemistry, Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Ukraine;

Prof., D. Sc., *V. P. Semenchenko*, Laboratory of Hydrobiology, SSIU “SIC NAS Belarus on Bioresources”, Republic of Belarus;

Prof., D. Sc., *O. V. Severynovska*, Department of Human and Animals Physiology, Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Ukraine;

Prof., D. Sc., *T. M. Shevchenko*, Department of Clinical and Laboratory Diagnostics, Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Ukraine;

Sc. D., *P. B. Tchounwou*, NIH-RCMI Center for Environmental Health, College of Science, Engineering & Technology, Jackson State University, Jackson, USA;

Prof. *S. M. Tymchuk*, M. D., Department of ENT-Oncology, Mechnikov Dnipropetrovsk Regional Clinical Hospital, Ukraine;

Prof., D. Sc., *G. O. Ushakova*, Department of Biophysics and Biochemistry, Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Ukraine;

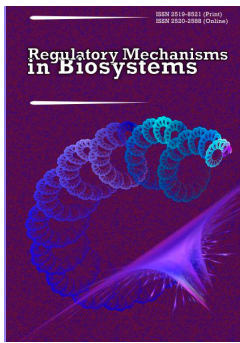
Prof., D. Sc., *A. I. Vinnikov*, Department of Microbiology, Virology and Biotechnology, Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Ukraine;

Prof. *T. M. Yeroshkina*, M. D., Department of Clinical and Laboratory Diagnostics, Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Ukraine.

Literary Editors: *P. W. Bradbeer*, *M. O. Tikhomyrov*, *V. D. Malovyk*. **Cover Design:** *A. O. Huslysty*, *P. S. Usenko*. **Text Layout:** *V. V. Brygadyrenko*.

Publication information. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, ISSN 2519-8521 (Print), ISSN 2520-2588 (Online). Subscription prices are available upon request from the Publisher or from the journal's website (www.medicine.dp.ua). Subscriptions are accepted on a prepaid basis only and are entered on a calendar year basis. Issues are sent by standard mail (surface within Europe, air delivery outside Europe). Priority rates are available upon request. Claims for missing issues should be made within six months of the date of dispatch.

Approved by the Scientific Council of Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Gagarin Ave., 72, Dnipro, 49010, Ukraine



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(1), 3–10
doi: 10.15421/021701

Borna disease virus and its role in the pathology of animals and humans

A. O. Mikheev

Bukovinian State Medical University, Chernivtsi, Ukraine

Article info

Received 14.12.2016

Received in revised form
25.12.2016

Accepted 28.12.2016

*Bukovinian State Medical
University, Theatralna sq., 2,
Chernivtsi, 58002, Ukraine
Tel.: +38-099-631-04-11
E-mail: maos@bsmu.edu.ua*

Mikheev, A. O. (2017). Borna disease virus and its role in the pathology of animals and humans. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8(1), 3–10. doi: 10.15421/021701

Infectious diseases that are caused by numerous pathogenic microorganisms – bacteria, viruses, protozoa or fungi – can be transmitted from patients or carriers to healthy people or animals. A large group of infectious disease is caused by pathogens of animal infections – zoonoses. The issue of zoonoses is of great significance in human pathology and requires comprehensive study. This is of particular relevance to Ukraine, as the question of prevalence, level within the population and threats to human life and health from zoonoses, though highly important, has remained insufficiently studied. Information about many of these pathogens is absent in the existing scientific literature accessible in Ukraine – both veterinary and medical. This applies, in particular, to a causative agent of viral zoonoses the Borna disease virus or Bornavirus. For this purpose, an analysis of the literature concerning the role of the Bornavirus in the pathology of animals and humans was conducted. It is well known that a large number of pathogens of animal infections (zoonoses), including viral, pose a potential threat to human health. Among these potential threats is the Borna disease virus belonging to the family of Bornaviridae, order Mononegavirales. This order includes representatives of deadly human diseases like rabies (family Rhabdoviridae), Ebola virus (family Filoviridae) and Nipah virus (family Paramyxoviridae). Borna virus disease affects mainly mammals, but can infect birds and even reptiles (Aspid bornavirus). It is established that Bornaviruses have a wide range of natural hosts (horses, sheeps, cats, bats and various birds), including domestic animals, which poses a potential threat to human health. This is evidenced by numerous, although contradictory, research into the role of the Borna disease virus in human pathologies such as schizophrenia, depression, prolonged fatigue syndrome, multiple sclerosis and others. Analysis of the literature clearly shows the important role of the Borna disease virus in a variety of mental and behavioural changes in animals, both wild and domestic. However, the large amount of contradictory data and studies cannot yet provide a clear picture of the role of this virus in human pathology. On the one hand, there are clear data of the presence of RNA of the Borna disease virus and antibodies to it in patients with psychoneurotic changes. On the other, there is no clear understanding of the infectivity of the virus in humans and its transmission from animals to humans and from person to person. These questions require further research and comprehensive study, particularly on the territory of Ukraine.

Keywords: zoonoses; infectious diseases; Bornaviruses; diseases of humans and animals

Вірус хвороби Борна та його значення в патології тварин і людини

A. O. Міхеєв

Буковинський державний медичний університет, Чернівці, Україна

Проведено аналіз літературних джерел, які стосуються ролі вірусу Борна у патології тварин і людини. Велика кількість збудників тваринних інфекцій (зоонозів), зокрема, вірусних, становить потенційну загрозу здоров'ю людини. Серед таких потенційних загроз – вірус хвороби Борна, що належить до родини Bornaviridae, порядку Mononegavirales. До цього порядку входять представники таких смертельних для людини захворювань як сказ (родина Rhabdoviridae), вірус Ебола (родина Filoviridae), вірус Ніпах (родина Paramyxoviridae). Вірус хвороби Борна вражає переважно ссавців, проте може вражати птахів і навіть плазунів (борнавірус аспідових). Борнавіруси мають велике коло природних господарів (коні, вівці, котяті, кажани, гризуни, комахоїдні, різноманітні птахи), у тому числі серед домашніх тварин, уражають переважно нервову систему з розвитком безсимптомного носійства або менінгоенцефалітів, енцефалітів, поведінковими розладами тощо. А це може являти потенційну загрозу здоров'ю людини. Про це свідчать численні, хоча і суперечливі, дослідження стосовно ролі вірусу хвороби Борна у таких патологіях людини як шизофренія, депресія, синдром тривалої втоми, розсіяний склероз тощо. Проаналізувавши велику кількість літературних джерел, можна підтвердити суттєву роль вірусу хвороби Борна у патології людини та тварин, проте в Україні питання стосовно його поширення, циркуляції та патогенності практично не розглядається. Тому важливі подальші дослідження поширеності цього вірусу серед диких і домашніх тварин, установлення його значення у патології людини.

Ключові слова: борнавіруси; зоонози; інфекційні захворювання; патологія людини

Вступ

Інфекційні захворювання, які викликають численні патогенні мікроорганізми (бактерії, віруси, найпростіші або гриби), здатні передаватися від хворих або носіїв до здорових людей чи тварин. Велику групу таких інфекційних захворювань складають збудники тваринних інфекцій – зоонози (Gorohov et al., 2012). У медицині та ветеринарії зоонози, у тому числі вірусної природи, традиційно належали до інфекцій, що притаманні тільки тваринам (Sidorchuk, 2014). Серед них велика група транскордонних емерджентних інфекцій, що є досить екзотичним для України: віруси лихоманки Західного Нілу, атипової пневмонії, пташиного (H₅) та свинячого (H₁) грипу, хвороби Борна, Ебола, Марбург, Ласса, Ніпах та інші (Bisjuk, 2014). Однак багато з них мають здатність до міжвидової передачі від птахів до ссавців і навпаки, та, нарешті, від тварин або птахів до людини, тобто зооантропонози (Grynevych and Markovych, 2012; Markovych and Grynevych, 2013; Christou, 2011; Wang and Crameri, 2014). Зокрема, це також представники різноманітних родин вірусів – Poxviridae, Flaviviridae, Filoviridae, Reoviridae, Bornaviridae, Picobornaviridae. Останніми роками список таких захворювань суттєво розширився, а спалахи, що раніше мали локальний характер, переростають в епідемії (Grynevych et al., 2012). Причина цього – розширення території проживання людини, урбанізація, наявність достатньо великої кількості синантропних тварин, птахів і комах (пацюки, летючі миші, голуби, таргани), які є природними джерелами та резервуарами таких інфекцій (Stegniy et al., 2014; Rosenberg, 2015). Спрогнозувати епідемію, спричинену збудниками вірусних зоонозів серед людей, складно, а часто неможливо (Dacheux et al., 2014; Makarov, 2011; Hasnatinov and Danchinova, 2011). Адже не всі збудники зоонозних інфекцій – «класичні» зоонози, багато з них здатні адаптуватися до нових господарів, у тому числі людини. Особливо це стосується тих патогенів, які мають широке коло тваринних господарів і досить тривалий інкубаційний період (Temmam et al., 2014).

Питання зоонозів, зокрема, вірусних, та їх значення в патології людини актуальне та потребує всебічного вивчення. Адже останніми роками це стало серйозною проблемою охорони здоров'я, оскільки близько 60–80% нових вірусних інфекцій людини мають саме тваринне походження (Wang and Crameri, 2014). Зокрема, це стосується України, оскільки питання поширеності, популяційного рівня та загрози життю та здоров'ю людини стосовно зоонозів, особливо вірусних, вивчене недостатньо. Часто у доступній літературі міститься досить мало відомостей про природні резервуари збудників зоонозних інфекцій та їх епідеміологію, а повноцінна інформація про деякі з таких збудників взагалі відсутня в наявній науковій літературі України – як ветеринарній (Fotin et al., 2010), так і біологічній та медичній. Зокрема, це стосується таких збудників вірусних зоонозів як віруси хвороби Борна, або борнавіруси. Водночас у світі це питання обговорюється досить давно і з різних точок зору – від значення вірусів, у тому числі борнавірусів, в еволюції до розвитку психічних розладів у людини. Мета цього огляду літератури – з'ясувати значення вірусу хвороби Борна в захворюваннях тварин і людини, зокрема, в Україні.

Загальні відомості про родину Bornaviridae

Вірус хвороби Борна, борнавірус (Bornavirus, Borna disease virus (BDV)) – типовий представник родини Борнавіруси (Bornaviridae), що належить до порядку Mononegavirales (Kalinina, 2014). Віріони вірусів мають сферичну форму, розміром до 130 нм діаметром, спірального типу симетрії. Як генетичний матеріал вірус містить односпірально лінійну РНК, несегментовану, з негативною полярністю. Геном має певну подібність до геному іншого представника порядку – родини Рабдовируси (Rabdoviridae). Транскрипція та реплікація борнавірусів відбу-

вається винятково в ядрі зараженої клітини, що відрізняє його від більшості інших РНК-вмісних вірусів та свідчить про досить давнє походження. У процесі реплікації вірус вмонтує ДНК копії свого геному в ДНК клітини господаря, які під час мітотичного поділу передаються дочірнім клітинам (Matsumoto et al., 2012). Це, можливо, сприяє формуванню повільно прогресуючої або хронічної інфекції. Проникають борнавіруси у клітину хазяїна шляхом рецепторно опосередкованого ендцитозу, а залишають інфіковану клітину шляхом брунькування через ЦПМ у сусідню клітину. Здатні поширюватися по міжклітинних зв'язках. Часто при цьому віруси не проявляють цитопатичного ефекту та не порушують нормального функціонування клітин.

Антигенні властивості борнавірусів представлені декількома детермінантами (білками), які кодуються в РНК. Це розчинний антиген (s-антиген), який містить білки нуклеопротеїн N (p40), фосфопротеїн P (p24), мембранний глікопротеїн M (gp18), мембранний глікопротеїн G (gp94), полімеразу L (p190) та X протеїн (p10), функції якого ще не з'ясовані, серед яких найбільше значення у діагностиці захворювань, спричинених борнавірусами, мають p40 та p24 (de la Torre, 1994; Ikuta et al., 2002; Bode and Ludwig, 2003). В організмі тварин і, можливо, людини ці детермінанти викликають відповідну імунну відповідь, а антитіла до борнавірусів залежать від виду ураженого організму та проявляють перехресну реактивність.

Борнавіруси досить стійкі у зовнішньому середовищі. Вони здатні залишатися інфекційними за низьких температур упродовж року, близько тижня за кімнатної температури, стійкі до висушування, але чутливі до ультрафіолету та низьких значень рН (Planz et al., 1999).

У лабораторних умовах вдається культивувати вірус у культурах клітин ембріонального походження (тканина нирок або ЦНС ембріона людини, гліальні клітини кроля), а також Vero, MDCK, гліома шурів.

Згідно з міжнародною класифікацією, за даними Міжнародного комітету з таксономії вірусів (ICTV), до родини Борнавіруси (Bornaviridae) належить один рід, в якому 7 основних видів борнавірусів:

- Elapid 1 bornavirus (змійний борнавірус, вірус уражає представників родини Аспідові (Elapidae);
- Mammalian 1 bornavirus (типовий представник, уражає представників класу Ссавці (Mammalia), основний збудник хвороби Борна);
- Passeriform 1 bornavirus (пташиний борнавірус, уражає різних представників ряду Горобцеподібні (Passeriformes);
- Passeriform 2 bornavirus (пташиний борнавірус, уражає різних представників ряду Горобцеподібні (Passeriformes);
- Psittaciform 1 bornavirus (пташиний борнавірус, уражає різних представників ряду Папугоподібні (Psittaciformes);
- Psittaciform 2 bornavirus (пташиний борнавірус, уражає різних представників ряду Папугоподібні (Psittaciformes);
- Waterbird 1 bornavirus (пташиний борнавірус, уражає різні види водоплавних птахів) (Kuhn et al., 2015; Afonso et al., 2016).

Біологічні особливості борнавірусів

Вірус хвороби Борна – специфічний вірус, із високою тропністю до нервової системи, який переважно вражає тварин (зоонозна інфекція) (Kinnunen et al., 2013). Природними господарями борнавірусів вважаються коні та вівці, у яких ці віруси викликають чіткі неврологічні ураження – енцефаліти, енцефаломієліти, що часто закінчуються загибеллю тварин (Richt et al., 1997; Ludwig and Bode, 2000; Tizard et al., 2016). Окрім коней і овець вірус здатний інфікувати досить широкий спектр інших теплокровних тварин, має специфічний цикл реплікації, що спричиняє порушення сигнальних шляхів у ЦНС із виникненням невропатії, ураженням лімбічної системи (Bonnaud et al., 2015; Liu et al., 2015; Lennartz et al., 2016). Залежно від віку та виду господаря, іноді статі та часу зара-

ження, а також особливостей імунної системи вірусна хвороба Борна може перебігати як безсимптомно (Lundgren et al., 1993; Richt and Rott, 2001), так і спричиняти широкий спектр поведінкових розладів (Staheli et al., 2000; de la Torre, 2002; Hornig et al., 2003).

Із того часу, як було встановлено, що ВХБ викликає захворювання ЦНС у багатьох видів хребетних, він став моделлю для вивчення персистенції вірусної інфекції ЦНС, оскільки його одноланцюгова РНК реплікується в ядрі клітин-мішеней (Feschotte, 2010; Horie et al., 2010). Борнавіруси здатні вражати безпосередньо нейрони, астроцити, клітини глії, а також окрім клітин ЦНС може бути виявлений у клітинах периферійної нервової системи, крові, вилочкової залози та кісткового мозку (Carbone, 2001). Він здатен вмонтовувати свій генетичний матеріал у геном хазяїна та змінювати його. Це також призводить до тяжких, часто смертельних, енцефалітів у чутливих видів тварин, може викликати стійке захворювання неврологічного характеру, пов'язане з різними поведінковими змінами, а також ретиніти та сліпоту (Tizard et al., 2016; Wensman et al., 2016). Хоча міжвидова передача цього вірусу остаточно не доведена, слід мати на увазі, що він може бути й зооантропономом (Bode and Ludwig, 2003; Brnic et al., 2011).

Як основні можливі шляхи передачі вірусу більшість авторів вказує повітряно-крапельний, контактний, особливо через різноманітні uszkodження шкірних покривів, різні виділення (фекалії та сеча тварин, аліментарний, а також вертикальний) (Carbone, 2001; Okamoto et al., 2003; Kerski et al., 2012). Не доведеною залишається можливість прямої передачі борнавірусів від тварин до людини при догляді, полюванні, вирощуванні на фермах чи утримуванні вдома.

Екологія та поширення борнавірусів

Оскільки природні господарі борнавірусів – коні та віці, географічне поширення хвороби Борна тривалий час було невідомим або прив'язаним до ареалів поширення саме цих тварин (Natalski et al., 1997). Як природна інфекція цей вірус зареєстрований у Центральній Європі, Північній Америці, Азії (Японія, Ізраїль). Таке географічне обмеження, можливо, було наслідком відсутності надійного методу та тест-систем для постановки діагнозу інфекції або відмови розглядати вірус Борна як можливий збудник інфекції тварин або навіть людини.

Водночас недавні численні повідомлення про можливість безсимптомного природного носійства у тварин свідчать, що вірус, можливо, навіть набагато ширше поширений, ніж вважалося. Вірус хвороби Борна (ВХБ) розповсюджений по всьому світі, вражає переважно диких і домашніх тварин – кролів, коней, овець, собак, лисидь, єнотів і навіть страусів (Kinnunen et al., 2013; Lutz et al., 2015; Kuhn et al., 2015; Bourg et al., 2016).

У природних умовах захворювання встановлене також у великої рогатої худоби та кішок (Caplazi et al., 1994; Lundgren et al., 1995; Lutz et al., 2015). В останніх спостерігається явище спонтанного негнійного енцефаломієліту, порушення ходи («хитка хвороба»), зміни у поведінці, втрата нюху. При цьому ризик заразитися в котів у сільській місцевості набагато вищий, ніж у міській. Це, очевидно, пов'язано з великою кількістю різноманітних дрібних гризунів. Крім того, автори як можливий фактор поширення та передачі борнавірусів у даному випадку розглядають кліщів, які паразитують на землерийках та інших комахоїдних. Основні прояви ВХБ у великої рогатої худоби – важкий прогресуючий розлад ЦНС із виявленням вірусу в нейронах головного мозку тварин та високим титром антитіл у сироватці крові. Як вказують самі автори, це був випадок природного інфікування тварин (Caplazi et al., 1994).

В експериментальних умовах до вірусу також чутливі багато різних тварин: від птахів до гризунів та приматів (Stitz et al., 1980; Dittrich et al., 1989; Berg et al., 2001). Серед можливих представників диких птахів як природний резервуар автори вказують диких качок або крижнів (*Anas platyrhynchos*) і галок

(*Corvus monedula*). У лабораторних щурів за умов експериментального зараження вірусом хвороби Борна спостерігали істотне зниження здатності до навчання у лабіринті, уникати біль, зміну поведінки. За внутрішньомозкового інфікування в лабораторних умовах макак-резусів суспензією мозку кролів, яка містила борнавірус, у тварин спостерігали ознаки енцефаломієліту та ретинопатію. Це підтверджувалося за допомогою імуоелектрофорезу з виявленням вірусспецифічних антитіл у сироватці крові та спинномозковій рідині піддослідних тварин. У природі різні птахи (горобці, папути, чайки, голуби, водоплавні птахи) – природні резервуари, вони самі можуть хворіти пташиними видами борнавірусів (Passeriform, Psittaciform і Waterbird bornavirus) із розвитком енцефаломієліту (Staheli et al., 2010). Крім ураження ЦНС (лімфоцитарний енцефаліт) у птахів, зокрема, з ряду Папугоподібні, може спостерігатися ураження шлунково-кишкового тракту, порушення травлення, і, як наслідок, виснаження, втрата апетиту та ваги, часто з летальним завершенням. А часто незаконна торгівля різними видами цих птахів спричинює неконтрольоване поширення інфекції серед інших видів, у тому числі домашньої птиці (Berg et al., 2001). Серед представників ряду Папугоподібні встановлено можливість вертикальної передачі борнавірусів від заражених батьків до потомства (Kerski et al., 2012). Це підтверджено виявленням РНК пташиного борнавірусу в головному мозку, сироватці крові та пір'ї як у батьків, так і потомства.

Нещодавні дослідження також показали здатність вірусу Борна циркулювати серед представників рукокрилих та комахоїдних – кажанів та білочеревих білозубок (Dacheux et al., 2014; Düttwald, 2014). Оскільки кажани – природний резервуар багатьох вірусних інфекцій, вони часто перебувають у тісному контакті з людиною. Дослідження популяції комахоїдних кажанів у Франції показало наявність у їх організмі представників багатьох родин вірусів, у тому числі борнавірусів. Тому дослідники зробили висновок про значну роль цих тварин у поширенні зоонозних вірусних інфекцій. Водночас, білочереві білозубки виявилися одним із потенційних резервуарів борнавірусів в ендемічних регіонах Центральної Європи (Швейцарія, Німеччина). У відібраних для дослідження тварин із високою вірогідністю підтверджено наявність ВХБ і його багаторічну циркуляцію серед цих тварин. Робиться висновок про важливу роль даного виду тварин як природного господаря вірусу хвороби Борна.

Також чутливі до борнавірусів гризуни, зокрема, миші, які заражаються цим вірусом і, можливо, передають інфекцію як одне одному, так і спадково (Okamoto et al., 2003). Останнє доведено експериментально за внутрішньоочеревинного зараження вагітних мишей штамом вірусу хвороби Борна. Дослідники встановили, що хронічна інфекція ВХБ може індукувати вертикальну передачу вірусу під час вагітності.

Виявлення борнавірусів у біологічному матеріалі

Сучасна наука має у своєму арсеналі різні методи та способи для виявлення різних патогенів у досліджуваному матеріалі. Особливо це стосується вірусів, адже для їх виявлення та ідентифікації потрібно витратити набагато більше часу та ресурсів, ніж для інших патогенів (бактерій, грибів, найпростіших тощо). Крім того, тут необхідна висока точність та мінімум часу. Адже рання діагностика сприяє швидкому встановленню етіологічного фактора та дозволяє своєчасно вжити профілактичні заходи. У випадку дослідження збудників зоонозних інфекцій, особливо тих, що мають прихований перебіг, виникають певні труднощі у підборі матеріалу та адекватних методів лабораторної діагностики. За більшості вірусних інфекцій основна увага відводиться експрес-методам діагностики, серологічним і молекулярно-біологічним методам.

Із метою виявлення борнавірусів для дослідження найчастіше беруть зразки крові тварин (Dacheux et al., 2014; Düttwald, 2014; Lutz et al., 2015; Kuhn et al., 2015) або людини (Amsterdam et al., 1985; Takahashi et al., 1997; Patti et al., 2008;

Flower et al., 2008; Barrantes et al., 2012; Zhang et al., 2014; Liu et al., 2015; Mazaheri-Tehrani et al., 2014; Zaliunaite et al., 2016). Також досліджуваним матеріалом може бути спинномозкова рідина (Rott et al., 1991; de la Torre et al., 1996; Zhang et al., 2014), біоптати головного мозку (Kinnunen et al., 2013; Hoffmann et al., 2015; Lutz et al., 2015) як тварин, так і людини. Крім цього, від тварин можна брати інший матеріал – пір'я та яйця птахів (Dittrich et al., 1989; Berg et al., 2001; Staeheli et al., 2010; Kerski et al., 2012), біоптати вилокової залози та кісткового мозку (Carbone, 2001; Bode and Ludwig, 2003), випорожнення та сечу комахоїдних кажанів (Dacheux et al., 2014), гризунів (Lutz et al., 2015), а також мазки з ротоглотки, органи загиблих тварин та інший матеріал.

Основні методи дослідження матеріалу від тварин із метою виявлення власне борнавірусів можуть бути: електронномікроскопічний (Richt et al., 1997; Ludwig, Bode, 2000; Kinnunen et al., 2013; Kuhn et al., 2015) із виявленням вірусних включень у заражених клітинах головного мозку (de la Torre et al., 1996; Ikuta et al., 2002; Staeheli et al., 2010; Matsumoto et al., 2012; Hoffmann et al., 2015), гістологічний або імуногістологічний (de la Torre et al., 1996; Richt et al., 1997; Düntwald et al., 2014; Bourg et al., 2016; Wensman et al., 2016) чи вірусологічний із зараженням чутливих ліній клітин, таких як Vero, MDCK, нервова та ниркова тканина ембріона людини, ембріональні гліальні клітини кролика, гліома шурів (Lundgren et al., 1995; Ludwig and Bode, 2000; Carbone, 2001; Bode and Ludwig, 2003; Kinnunen et al., 2013). Інший важливий метод для встановлення борнавірусів у матеріалі – визначення наявності їх РНК із використанням ПЛР (de la Torre et al., 1996; Takahashi et al., 1997; Iwahashi et al., 1997; Planz et al., 1999; Carbone, 2001; Nakamura et al., 2000; Brnic et al., 2011; Barrantes et al., 2012; Kinnunen et al., 2013; Dacheux et al., 2014; Bonnaud et al., 2015; Hoffmann et al., 2015; Liu et al., 2015).

Для серологічної діагностики з метою виявлення специфічних антитіл до борнавірусів чи їх антигенів у сироватці крові як у тварин, так і людини найчастіше використовують ІФА (Amsterdam et al., 1985; Rott et al., 1985, 2001; Waltrip et al., 1995; Bode et al., 1996; Carbone, 2001; Hornig et al., 2012), імуноблотинг (Iwahashi et al., 1997; Carbone, 2001), вестерн-блот (Waltrip et al., 1995; Flower et al., 2008; Zhang et al., 2014), визначення концентрації циркулюючих імунних комплексів до ВХБ (Bode and Ludwig, 2003; Donfrancesco et al., 2008; Patti et al., 2008; Scholbach and Bode, 2008; Mazaheri-Tehrani et al., 2014; Liu et al., 2015; Zaliunaite et al., 2016), РЕМА (ELISA) (Carbone, 2001; Zhang et al., 2014), радіоімунний аналіз (Matsunaga et al., 2008).

Значення борнавірусів у патології людини

Питання про інфекційність вірусу Борна для тварин не залишає сумнівів. Його здатність викликати неврологічні та поведінкові розлади у свійських тварин (коні, вівці) також показана для інших видів хребетних тварин, у тому числі лабораторних (пацюки, миші) (Ikuta et al., 2002). Численні дослідження з вивчення його циркуляції серед диких і домашніх тварин, вплив на поведінкові реакції, порушення з боку сенсорних систем, зміну поведінки та інше з'являються чи не щороку (Kinnunen et al., 2013; Bonnaud et al., 2015; Kuhn et al., 2015; Lennartz et al., 2016).

Крім того, останніми роками з'являються відомості про наявність самого вірусу Борна чи антитіл до нього у крові людей, які страждають порушеннями психіки (шизофренія, біполярні розлади, тривожні розлади, синдром хронічної втоми, розсіяний склероз, бічний аміотрофічний склероз, недоумкуватість, гліобластома і навіть депресія). Серологічні та молекулярно-епідеміологічні дослідження показали, що ВХБ може інфікувати людей, викликаючи вказані нейропсихічні порушення. Перші дані про наявність антитіл у сироватці крові до вірусу Борна в людей описані ще у 1985–1999 рр.

Дослідження зразків сироватки крові 265 пацієнтів із депресією та 105 здорових волонтерів виявило вірусспецифічні антитіла до ВХБ лише у хворих (12 пацієнтів) і у жодного здорового піддослідного (Amsterdam et al., 1985). Антитіла також виявляли за допомогою методу непрямой імуофлуоресценції в сироватці крові психіатричних пацієнтів (16 з 979 обстежених), що стало поштовхом для подальших досліджень ролі ВХБ у патології людини (Rott et al., 1985). Згодом аналогічні антитіла виявлені в сироватці крові 4–7% пацієнтів із психічними розладами під час скринінгового обстеження понад 5 000 хворих у Німеччині, США та Японії (Rott et al., 1991). Крім того, наявність борнавірусу у цих пацієнтів дослідники підтвердили шляхом інокуляції спинномозкової рідини хворих у культуру клітин кроля.

Використання непрямой імуофлуоресценції та вестерн-блоту дозволило встановити наявність специфічних антитіл до білків ВХБ у хворих на шизофренію в США (Waltrip et al., 1995). Дослідження стосувалося 90 пацієнтів і контрольної групи, що складалася з 20 здорових добровольців. У 13 з 90 хворих (14,4%) підтверджено наявність антитіл до борнавірусу, чого не спостерігали в контролі. Гістопатологічні зміни під час аутопсії мозку пацієнтів із психічними розладами, втратою пам'яті та депресією корелювали з наявністю антигенів та РНК борнавірусу в чотирьох із п'яти пацієнтів, що підтверджено імунохімічно та за допомогою ПЛР (de la Torre et al., 1996).

Інфекційний борнавірус виділений також від пацієнтів психіатричних клінік у мононуклеарних клітинах периферичної крові (Bode et al., 1996). Дослідникам вдалося не лише показати наявність у 33 психічно хворих пацієнтів антитіл до ВХБ, а й виділити та ідентифікувати вірус, заразити ним експериментальних тварин. Генетичні та біологічні властивості вказаного борнавірусу схожі з тваринними, проте мають певні унікальні властивості в кожному дослідженому випадку. Іншими дослідженнями показано наявність антитіл у сироватці крові, що реагують зі специфічними антигенами ВХБ, у пацієнтів із нервово-психічними розладами (Richt et al., 1997). Проте автори пишуть, що не виявили ні РНК борнавірусу, ні його антигенів у цих пацієнтів, а саме захворювання, на їхню думку, спричинене опосередкованою Т-лімфоцитами імунною відповіддю.

Суттєве скринінгове дослідження серед 67 пацієнтів з шизофренією в Японії показало наявність антитіл до борнавірусу у 45% обстежених (Iwahashi et al., 1997). Хоча дослідники не встановили епідеміологію збудника у даних хворих, вони припускають відсутність внутрішньолікарняного зараження, а також відсутність зв'язку між вірусом і віком пацієнтів, процедур переливання крові чи особливостями лікування. Окрім того, виявлено за допомогою ПЛР вірусу РНК борнавірусу та його антигени шляхом імуногістохімічного дослідження в мозковій тканині, яку отримали в результаті аутопсії від психічно хворих пацієнтів із шизофренією та здорових людей помертно (Nakamura et al., 2000). У подальшому дослідники заразили гомогенатом мозкової тканини пацієнтів піщанок і шурів шляхом внутрішньомозкової ін'єкції, а також інфікували культуру клітин Vero для подальшої ідентифікації вірусу. Дослідникам удалося відтворити інфекцію та підтвердити гіпотезу стосовно ролі ВХБ у розвитку психічних захворювань людини.

Інші дослідження, проведені в Японії, стосувалися вивчення зразків сироватки крові 304 пацієнтів психіатричних клінік з різними розладами та 378 зразків від здорових донорів на предмет виявлення в них специфічних імуноглобулінів IgM та IgG до ВХБ за допомогою радіоімунного аналізу (Matsunaga et al., 2008). Специфічні антитіла (IgG) до ВХБ, виявлені в обох групах дослідження, були нижче середнього рівня та достовірно не відрізнялися між собою, а ось вміст IgM не зменшувався тривалий час. Останнє автори пояснюють можливою затримкою імунної відповіді до борнавірусу та, можливо, ширшим поширенням останнього серед населення, ніж передбачалося раніше. У працівників ферм із розведення коней у місті

Саппоро (Японія) відсоток виявлення РНК ВХБ суттєво вищий, ніж по інших регіонах країни та відносно здорових донорів крові (Takahashi et al., 1997). Виявлення інфекції у людей при цьому тісно корелює з аналогічною ситуацією у хворих тварин, тому дослідники припускають можливість передачі борнавірусу горизонтально від інфікованих коней до людини під час тісних контактів.

Достатньо об'ємні експериментальні дослідження, проведені в Німеччині стосовно ролі борнавірусів у патології людини показали, що часто під час виявлення в клітинах крові (гранулоцити) пацієнтів із психічними розладами (шизофренія та депресія) РНК вірусу не супроводжується гуморальною та клітинною імунною відповіддю (Planz et al., 1999). При цьому дослідники не відкидають певного значення ВХБ у розвитку психічних захворювань людини, проте припускають, що наявність вірусу в організмі таких людей може супроводжуватися суттєвим імунодепресивним ефектом і загальним зниженням імунореактивності. На думку авторів дослідження, виявлення ними борнавірусу в клітинах периферичної крові може пояснити труднощі попередніх досліджень із виявлення інфекційного ВХБ в організмі хворих тварин і пацієнтів із психічними розладами, а подібності послідовностей виділених вірусів від тварин і людей можуть свідчити про спільність їх і необхідність подальших досліджень.

Один із можливих шляхів передачі багатьох вірусних інфекцій – трансмісивний. Тому дослідження, які стосуються наявності вірусу хвороби Борна у крові хворих і здорових людей, проводили неодноразово. Одне з таких масових досліджень, проведене в Австралії, стосувалося вивчення зразків крові не лише психічно хворих пацієнтів (290 проб від пацієнтів із депресією), а і здорових донорів (219 проб) та 214 вагітних жінок (Flower et al., 2008). В 11 психіатричних пацієнтів за допомогою ІФА, вестерн-блоту, РІФ підтверджено наявність вірусних антигенів у сироватці крові. Водночас серед вагітних підтверджено лише три позитивні результати та два позитивні результати у здорових донорів. Окремо обстежено групу пацієнтів, які мали багаторазові процедури переливання крові: зі 168 зразків у 21 випадку підтверджено наявність антигенів ВХБ. На думку дослідників, багаторазове переливання крові може бути одним із факторів можливого зараження борнавірусами. Тому вони пропонують проводити ретельніше обстеження донорської крові.

Інше важливе питання стосовно епідеміології борнавірусів серед людей – поширеність серед дитячого населення, адже це важливо з огляду того, що діти часто контактують із різними тваринами (домашніми чи свійськими), досить часто можуть заражатися зоонозними інфекціями (Scholbach and Bode, 2008). Із приводу цього численні дослідження дітей провели різні групи дослідників в Італії (Donfrancesco et al., 2008; Patti et al., 2008; Scholbach and Bode, 2008). Вивчено зразки крові понад 2 000 дітей із різних регіонів Італії, як здорових, так і з психічними розладами (біполярні розлади, депресія). У сироватці крові вивчали такі маркери інфекції як циркулюючі імунні комплекси та антитіла до основних білків борнавірусів (N (p40) і P (p24)) із використанням імуноферментного аналізу. Отримані різними групами дослідників результати свідчать, що майже у половини обстежених здорових пацієнтів наявні в сироватці крові маркери ВХБ. Водночас не виявлено істотної різниці аналогічних показників між психічно хворими дітьми та здоровими. Хоча автори не проводять чітких паралелей між борнавірусами, психічними розладами у дітей, а також дорослих, проте вони пропонують проводити подальші дослідження з метою з'ясування ролі борнавірусів у розвитку психічних захворювань у дитячому віці.

Також про можливу роль вірусу Борна у розвитку психоневротичних патологій у людини пишуть дослідники в останні роки. У період 2011–2013 рр. із симптомами енцефаліту померло троє селекціонерів білок. Вказані тварини також мали енцефаліти з аналогічними клінічними ознаками та загинули в

досить короткий період (2–4 місяці) після появи клінічних симптомів. Застосування метагеномного підходу дослідження з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) дало змогу виявити наявність раніше невідомого борнавірусу у зразках головного мозку від цих трьох пацієнтів, який відповідав аналогічному вірусу від досліджуваних тварин із майже 80% ідентичністю (Hoffmann et al., 2015). Одними з можливих шляхів передачі вірусу від тварин до людини автори вказують укуси та подряпини від білок. Інші дослідження, проведені в декількох провінціях Китаю серед хворих на різні психоневротичні розлади та здорових пацієнтів із виявлення зразків РНК вірусу хвороби Борна в церебральній рідині (1 481 проба) та периферійній крові (1 679 проб) (Zhang et al., 2014), показали її наявність у значній кількості пацієнтів із вірусним енцефалітом (6,7%), шизофренією (9,9%) і навіть синдромом хронічної втоми (12,7%). У багатьох обстежених пацієнтів виявлено антитіла до ВХБ при таких захворюваннях як розсіяний склероз (25,0%) та хвороба Паркінсона (22,7%). Це дослідження доводить наявність вірусу хвороби Борна серед населення декількох провінцій Китаю та показує значення цього вірусу у патології людини (при шизофренії, розсіяному склерозі та навіть хворобі Паркінсона).

Група дослідників із Китаю також виявила наявність ВХБ у пацієнтів із важкою депресією та психоневротичними розладами (Liu et al., 2015). Проведене ними скринінгове дослідження стосувалося визначення наявності середньомолекулярних циркулюючих імунних комплексів, РНК вірусу та специфічних антитіл у сироватці крові з 1 529 проб. Із них 534 проби відібрано у хворих на депресивні стани, 615 проб взято від медичного персоналу, який контактував із цими хворими, та 380 проб – від практично здорових волонтерів. Рівень ЦІК у пацієнтів вірогідно перевищував аналогічний рівень у здорових людей (18,2% проти 11,1%), а у медичного персоналу цей відсоток складав аж 21,8%. Аналогічна тенденція спостерігалася також стосовно виявлення антитіл і РНК вірусу. Така поширеність ВХБ серед медичних працівників може свідчити про циркуляцію вірусу серед співробітників психіатричних клінік без розвитку в них симптомів захворювання, а подібність РНК вірусу у пацієнтів і медпрацівників може свідчити про високий ризик професійного зараження у процесі тривалого спілкування.

Вірус хвороби Борна спричинює імунопатологічні ураження центральної нервової системи (Т-клітинно-опосередкована цитотоксичність, надмірне виділення цитокінів у мікроглії, «глутаміновий шторм» із надлишковим виділенням глутамату. Усі ці процеси призводять до загибелі нейронів та клітин глії у багатьох видів тварин. Проте виявити антитіла до нього у людини вкрай важко (антитіла виявляються лише в 0,5% населення). Це може бути зумовлено низьким рівнем вірусемії у психічно хворих пацієнтів і здорових людей. Оскільки наявні дані свідчать про асоціацію з цією вірусною інфекцією таких захворювань як біполярні розлади та шизофренія, проведене скринінгове дослідження 76 зразків від людей: 51 пацієнт із біполярним розладом і 25 здорових добровольців (Barrantes et al., 2012). У дев'яти пацієнтів із розладами результати позитивні для різних білків вірусу хвороби Борна (p24 і p40), у здорових донорів – негативні. Виявлено високий вміст аналогічних білків серед обстежених домашніх тварин (коні), у зв'язку з чим автори роблять висновок про значну можливість зв'язку захворювань у людини та вірусом хвороби Борна.

Інше дослідження стосовно поширеності інфекції, спричиненої вірусом хвороби Борна в людини, проведене на Близькому Сході (Іран) і спрямоване на виявлення специфічних антитіл, циркулюючих імунних комплексів і антигенів вірусу в сироватці крові пацієнтів із гострими психіатричними розладами та здорових осіб із використанням імуноферментного аналізу (Mazaheri-Tehrani et al., 2014). Вивчено 314 зразків (від 114 психіатричних пацієнтів, 69 донорів крові та 131 здорової людини). Середньомолекулярні циркулюючі імунні комплекси

виявлено у третині (29,5%) інтактних зразків: 27,5% здорових людей і 33,3% донорів. У психічно хворих концентрація аналогічних циркулюючих імунних комплексів вища (40,4%), тісно корелювала з клінічними симптомами біполярних розладів. У жінок обох груп цей показник також вірогідно вищий. На думку дослідників, це може свідчити про високу поширеність субклінічних інфекцій хвороби Борна у людини в Ірані, а подальші дослідження повинні враховувати ризик розвитку хвороби у здорових носіїв, особливо жіночої статі.

Скринінгове дослідження наявності антигенів борнавірусів та циркулюючих імунних комплексів у пацієнтів психіатричних клінік і здорових донорів крові проведене в Литві з метою підтвердження чи спростування ролі ВХБ у розвитку психічних розладів (Zaliunaite et al., 2016). Кров узята у 106 пацієнтів із гострим психозом, які перебували на стаціонарному лікуванні, та 98 практично здорових донорів крові. Отримані результати показали, що циркулюючі імунні комплекси до ВХБ частіше виявляються у хворих (39,6%), ніж у здорових людей (22,4%), а вміст антигенних маркерів в обох групах практично не відрізнявся. Відповідно, робиться висновок про хронічну ВХБ-інфекцію у психічно хворих пацієнтів, що підтверджує, на думку авторів, попередні дослідження стосовно ролі борнавірусів у розвитку психічних розладів у людини.

Отже, практично більшість авторів пишуть про виявлення як антитіл до цього вірусу у сироватці крові, так і його РНК і антигенів у досліджуваних матеріалах від пацієнтів (кров, спинномозкова рідина, біоптати мозку), що мають певні психічні зрушення – шизофренію, депресію, синдром тривалої втоми, розсіяний склероз тощо. Хоча інфекційність вірусу хвороби Борна для людини ще чітко не з'ясована, описані випадки показують можливість його потрапляння в організм людини (можливо, від домашніх чи диких тварин) та вплив на її психічне здоров'я.

Одне з досить численних досліджень, спрямованих на з'ясування зв'язку між психічними захворюваннями (шизофренія, афективні розлади) та вірусом хвороби Борна проведено в Туреччині Karakose et al. (2011). Обстежено 207 пацієнтів різного віку та статі із залишковою шизофренією, 137 практично здорових пацієнтів групи порівняння на наявність РНК вірусу хвороби Борна у периферичній крові з використанням ПЛР і специфічних антитіл (IgG) до антигенів ВХБ (p24 і p40) за допомогою РЕМА. Встановлено суттєву різницю ($P < 0,001$) між обома групами обстежених по кількості антитіл у сироватці крові, проте не встановлено чітких відмінностей вмісту РНК вірусу. Також повідомляється про відсутність чіткого зв'язку між розвитком шизофренії та молекулярних методів дослідження з використанням регресійного аналізу, тому пропонується проведення подальших досліджень, як клінічних, так і експериментальних, для встановлення ролі борнавірусів у розвитку шизофренії.

Дослідницька група з Інституту Роберта Коха (Берлін) проводила дослідження можливого впливу вірусу Борна на організм людини серед мешканців, які утримують вдома домашніх тварин (котів), займаються фермерством або полюванням (Lutz et al., 2015). Серед багатьох видів домашніх та свійських тварин виявлено наявність як РНК вірусу, так і антитіл до нього у сироватці крові (коні, вівці, страуси, коти та собаки). Зокрема, у домашніх котів спостерігаються чіткі клінічні ознаки захворювання, яке викликає ВХБ – негнійний менингоенцефаліт, ураження нюхових нервів, хитка хода, атаксія, зміна поведінки. Проте у власників цих та інших тварин навіть після тривалого та тісного контакту не виявлено не лише жодних ознак захворювання, а і наявності вірусної РНК чи антитіл до ВХБ. Відповідно автори роблять висновок про відсутність суттєвого значення вірусу хвороби Борна в розвитку психічних захворювань людини.

Велике скринінгове дослідження проведене в США на предмет асоціації психічних захворювань з антитілами до вірусу хвороби Борна (Hornig et al., 2012; Horning, 2016): дослідили

396 зразків сироватки крові хворих на різні психічні розлади (шизофренія, біполярні розлади, депресія) віком 20–75 років і практично здорових людей. Всі досліджені зразки крові пацієнтів і здорових людей ретельно відібрано з урахуванням віку, статі, періоду захворювання та обстежено на РНК вірусу за допомогою ПЛР і специфічних антитіл за допомогою імуноферментного аналізу. Отримані результати, на думку авторів, переконливо доводять відсутність такої залежності між наявністю антитіл у сироватці крові до вірусу Борна та психічних розладів. Проте дослідники не відкидають можливість наявності вірусної РНК чи антитіл до вірусу у спинномозковій рідині деяких пацієнтів із психоневрологічними розладами, що потребує подальших досліджень.

Нещодавно отримані результати різних наукових досліджень, які показують ще одну важливу біологічну роль борнавірусів – інтеграція в геном хребетних тварин у ході еволюції (Belyi et al., 2010; Horie et al., 2010; Horie et al., 2013; Gilbert et al., 2014). Ці дослідження стосувалися вивчення послідовності ДНК різних видів хребетних тварин, у тому числі приматів, на предмет наявності в них ендемічних ретровірусів та інших елементів, які могли бути «вмонтованими» в геном у ході еволюції. Крім власне ретровірусів у геномі багатьох видів тварин присутні також геноми інших представників родин вірусів, зокрема, порядку Mononegavirales (Dürrwald et al., 2014; Temmam et al., 2014). Найчастіше це філовіруси (зокрема, вірус Ебола) та борнавіруси (вірус хвороби Борна). Одним із можливих механізмів реалізації цих ендемічних борнавірусів може бути їх роль у регуляції функцій клітини, її неконтрольованого розмноження (проліферації) та загибелі (апоптози) (He et al., 2016). Адже саме борнавіруси мають унікальну здатність інтегруватися у процесі своєї реплікації в геном господаря, тому автори припускають набагато ширше коло природних господарів цих вірусів, а їх біологічне значення потребує подальшого вивчення.

Висновки

Як показав аналіз літературних даних, можна стверджувати суттєву роль борнавірусів у розвитку різних психічних і поведінкових зрушень у тварин (як диких, так і домашніх). Проте велика кількість суперечливих даних ще не дає чіткої відповіді про значення цього вірусу в патології людини. З одного боку – це чіткі дані про наявність РНК вірусу хвороби Борна й антитіл до нього у хворих із психоневротичними порушеннями. З іншого – у науковій літературі немає однозначного уявлення про інфекційність цього вірусу для людини.

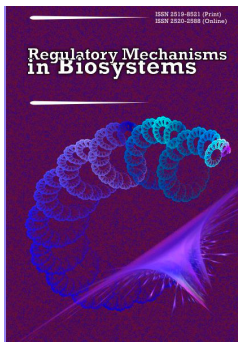
Відсутні дані про можливість передачі вірусу від тварин до людини, а також від людини до людини. Це питання потребує подальших досліджень, зокрема, на території України. Крім цього, подальших досліджень потребує питання значення представників порядку Mononegavirales у функціонуванні геному хребетних тварин і людини, їх можливе значення в еволюції.

References

- Afonso, C. L., Amarasinghe, G. K., Bányai, K., Bao, Y., Basler, C. F., Bavari, S., Bejerman, N., Blasdel, K. R., Briand, F. X., Briese, T., Bukreyev, A., Calisher, C. H., Chandran, K., Chéng, J., Clawson, A. N., Collins, P. L., Dietzgen, R. G., Dolnik, O., Domier, L. L., Dürrwald, R., Dye, J. M., Easton, A. J., Ebihara, H., Farkas, S. L., Freitas-Astúa, J., Formenty, P., Fouchier, R. A., Fù, Y., Ghedin, E., Goodin, M. M., Hewson, R., Horie, M., Hyndman, T. H., Jiang, D., Kitajima, E. W., Kobinger, G. P., Kondo, H., Kurath, G., Lamb, R. A., Lenardon, S., Leroy, E. M., Li, C. X., Lin, X. D., Liu, L., Longdon, B., Marton, S., Maisner, A., Mühlberger, E., Netesov, S. V., Nowotny, N., Patterson, J. L., Payne, S. L., Paweska, J. T., Randall, R. E., Rima, B. K., Rota, P., Rubbenstroth, D., Schwemmle, M., Shi, M., Smither, S. J., Stenglein, M. D., Stone, D. M., Takada, A., Terregino, C., Tesh, R. B., Tian, J. H., Tomonaga, K., Tordo, N., Towner, J. S., Vasilakis, N., Verbeek, M., Volchkov, V. E., Wahl-Jensen, V., Walsh, J. A., Walker, P. J., Wang, D., Wang, L. F., Wetzel, T., Whitfield, A. E., Xiè, J. T., Yuen, K. Y., Zhang,

- Y. Z., & Kuhn, J. H. (2016). Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016. *Archives of Virology*, 161(8), 2351–2360.
- Amsterdam, J. D., Winokur, A., Dyson, W., Herzog, S., Gonzalez, F., Rott, R., & Koprowski, H. (1985). Borna disease virus. A possible etiologic factor in human affective disorders? *Archives of General Psychiatry*, 42(11), 1093–1096.
- Barrantes-Rodriguez, X., Silva, S., Macaya, G., & Bonilla, J. A. (2012). Detection of borna disease virus by real-time RT-PCR in Costa Rican equines and humans. *Archives of Clinical Microbiology*, 3(1), 1–5.
- Belyi, V. A., Levine, A. J., & Skalka, A. M. (2010). Unexpected inheritance: Multiple integrations of ancient bornavirus and ebolavirus/marburgvirus sequences in vertebrate genomes. *PLoS Pathogens*, 6(7), e1001030.
- Berg, M., Johansson, M., Montell, H., & Berg, A.-L. (2001). Wild birds as a possible natural reservoir of Borna disease virus. *Epidemiology and Infection*, 127(1), 173–178.
- Bisyuk, I. Y. (2014). Suchasnyj stan i problemy kontrolju transkordonnih emerdzhentnyh infekcij tvaryn v Ukraini i sviti [Current status and problems of emergent control of transboundary animal infections in Ukraine and the world]. *Veterynarna Medycyna Ukrainy*, 220, 7–10 (in Ukrainian).
- Bode, L., Dürrwald, R., Rantam, F. A., Ferszt, R., & Ludwig, H. (1996). First isolates of infectious human Borna disease virus from patients with mood disorders. *Molecular Psychiatry*, 1(3), 200–212.
- Bode, L., & Ludwig, H. (2003). Borna disease virus infection, a human mental-health risk. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 534–545.
- Bonnaud, E. M., Szelechowski, M., Betourne, A., Foret, C., Thouard, A., Gonzalez-Dunia, D., & Malnou, C. E. (2015). Borna disease virus phosphoprotein modulates epigenetic signaling in neurons to control viral replication. *Journal of Virology*, 89(11), 5996–6008.
- Bourg, M., Nobach, D., Herzog, S., Lange-Herbst, H., Nessel, A., Hamann, H. P., Becker, S., Höper, D., Hoffmann, B., Eickmann, M., & Herden, C. (2016). Screening red foxes (*Vulpes vulpes*) for possible viral causes of encephalitis. *Virology Journal*, 13(1), 151.
- Brnic, D., Stevanovic, V., Cochet, M., Agier, C., Richardson, J., Montero-Menei, C. N., Milhavet, O., Eloit, M., & Couplier, M. (2011). Borna disease virus infects human neural progenitor cells and impairs neurogenesis. *Journal of Virology*, 86(5), 2512–2522.
- Caplazi, P., Waldvogel, A., Stitz, L., Braun, U., & Ehrensperger, F. (1994). Borna disease in naturally infected cattle. *Journal of Comparative Pathology*, 111(1), 65–72.
- Carbone, K. M. (2001). Borna disease virus and human disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3), 513–527.
- Christou, L. (2011). The global burden of bacterial and viral zoonotic infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(3), 326–330.
- Dacheux, L., Cervantes-Gonzalez, M., Guigon, G., Thiberge, J.-M., Vandenbergert, M., Maufrais, C., Caro, V., & Bourhy, H. (2014). A preliminary study of viral metagenomics of french bat species in contact with humans: identification of new mammalian viruses. *PLoS ONE*, 9(1), e87194.
- de la Torre, J. C. (1994). Molecular biology of borna disease virus: Prototype of a new group of animal viruses. *Journal of Virology*, 68(12), 7669–7675.
- de la Torre, J. C. (2002). Bornavirus and the Brain. *The Journal of Infectious Diseases*, 186(2), 241–247.
- de la Torre, J. C., Gonzalez-Dunia, D., Cubitt, B., Mallory, M., Mueller-Lantsch, N., Grässer, F. A., Hansen, L. A., & Masliah, E. (1996). Detection of borna disease virus antigen and ma in human autopsy brain samples from neuropsychiatric patients. *Virology*, 223(2), 272–282.
- Dittrich, W., Bode, L., Ludwig, H., Kao, M., & Schneider, K. (1989). Learning deficiencies in borna disease virus-infected but clinically healthy rats. *Biological Psychiatry*, 26(8), 818–828.
- Donfrancesco, R., Gregori, P., Vulcano, A., Candelori, E., Ronchetti, R., Miano, S., Pagani, J., Villa, M. P., & Patti, A. M. (2008). Borna disease virus infection in children with psychiatric disorders. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 116, 80–82.
- Dürrwald, R., Kolodziejek, J., Weissenböck, H., & Nowotny, N. (2014). The bicolored white-toothed shrew *Crocodyrus leucodon* (Hermann, 1780) is an indigenous host of mammalian Borna disease virus. *PLoS ONE*, 9(4), e93659.
- Feschotte, C. (2010). Virology: Bornavirus enters the genome. *Nature*, 463(7277), 39–40.
- Flower, R. L., Kamhieh, S., McLean, L., Bode, L., Ludwig, H., & Ward, C. M. (2008). Human Borna disease virus infection in Australia: Serological markers of infection in multi-transfused patients. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 116, 89–93.
- Fotin, A. I., Panasenko, O. S., Panasenko, O. A., Pedan, V. A., & Risovanij, V. I. (2010). Analiz potencijnih nebezpek zarazennja virusnimi infekcijami strausiv v Ukraini [Analysis of the potential risk of infection viral infection ostrich in Ukraine]. *Visnyk Sums'kogo Nacional'nogo Agramogo Universytetu. Serija Veterynarna Medycyna*, 26, 126–131 (in Ukrainian).
- Gilbert, C., Meik, J. M., Dashevsky, D., Card, D. C., Castoe, T. A., & Schaack, S. (2014). Endogenous hepadnaviruses, bornaviruses and circoviruses in snakes. *Proceedings of the Royal Society B. Biological Sciences*, 281(1791), 1122–1131.
- Gorohov, V. V., Uspenskij, A. V., Malysheva, N. S., Samofalova, N. A., Malysheva, E. V., Vlasov, E. A., & Gladkih, K. A. (2012). Parazitarnye zoonozy: Sostojanie problemy [Parasitic zoonoses: Status of the problem]. *Scientific Notes: The Online Academic Journal of Kursk State University*, 21, 56–61 (in Russian).
- Grynevych, O. I., Markovych, I. G., & Markovych, I. F. (2012). Epidemiologichnyj nagljad za infekcijamy spil'nymy dlja ljudej ta tvaryn v Ukraini [Epidemiological surveillance for infectious diseases common to humans and animals in Ukraine]. *Veterynarna Medycyna*, 96, 209–212 (in Ukrainian).
- Grynevych, O. I., Markovych, I. G., & Markovych, I. F. (2012). Rol' monitoringu za infekcijamy, spil'nymy dlja ljudej i tvaryn, u zabezpechenni biobezpeky naselelnja Ukrainy [The monitoring's role of infections common to humans and animals in the biosafety of the Ukrainian population]. *Ukrai'ns'kyj Medychnyj Chasopys*, 91, 111–114 (in Ukrainian).
- Hasnatinov, M. A., & Danchinova, G. A. (2011). Sovremennye sposoby monitoringa virusnyh patogenov i perspektivy sozdaniya sistemy jekologo-jepidemiologicheskogo monitoringa virusov v okruzhajushhej srede [Modern approaches to the surveillance of viral pathogens and prospects of development of the eco-epidemiological network for survey of the viruses in the environment]. *Bjulleten' Vostochno-Sibirskogo Nauchnogo Centra Sibirskogo Otdelenija Rossijskoj Akademii Medicinskih Nauk*, 5, 195–198 (in Russian).
- Hatalski, C. G., Lewis, A. J., & Lipkin, W. I. (1997). Borna Disease. *Emerging Infectious Diseases*, 3(2), 129–135.
- He, P., Sun, L., Zhu, D., Zhang, H., Zhang, L., Guo, Y., Liu, S., Zhou, J., Xu, X., & Xie, P. (2016). Knock-Down of endogenous bornavirus-like nucleoprotein 1 inhibits cell growth and induces apoptosis in human oligodendroglia cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(4), 435–448.
- Hoffmann, B., Tappe, D., Höper, D., Herden, C., Boldt, A., Mawrin, C., Niederstraßer, J., Müller, T., Jenckel, M., van der Grinten, E., Lutter, C., Abendroth, B., Teifke, J.P., Cadar, D., Schmidt-Chanasit, J., Ulrich, R.G., & Beer, M. (2015). A variegated squirrel bornavirus associated with fatal human encephalitis. *The New England Journal of Medicine*, 373, 154–162.
- Horie, M., Honda, T., Suzuki, Y., Kobayashi, Y., Daito, T., Oshida, T., Ikuta, K., Jern, P., Gojobori, T., Coffin, J. M., & Tomonaga, K. (2010). Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. *Nature*, 463(7277), 84–87.
- Horie, M., Kobayashi, Y., Suzuki, Y., & Tomonaga, K. (2013). Comprehensive analysis of endogenous bornavirus-like elements in eukaryote genomes. *Philosophical Transaction of the Royal Society B. Biological Sciences*, 368(1626), 499–499.
- Hornig, M. (2016). Borna disease virus. In: Reiss, C. S. (Ed.) *Neurotropic viral infections*. Springer International Publishing, p. 315–336.
- Hornig, M., Briese, T., Licinio, J., Khabbaz, R. F., Altschuler, L. L., Potkin, S. G., Schwemmler, M., Siemietzki, U., Mintz, J., Honkavuori, K., Kraemer, H. C., Egan, M. F., Whybrow, P. C., Bunney, W. E., & Lipkin, W. I. (2012). Absence of evidence for bornavirus infection in schizophrenia, bipolar disorder and major depressive disorder. *Molecular Psychiatry*, 17, 486–493.
- Hornig, M., Briese, T., & Lipkin, W. I. (2003). Borna disease virus. *Journal of NeuroVirology*, 9(2), 259–273.
- Ikuta, K., Ibrahim, M. S., Kobayashi, T., & Tomonaga, K. (2002). Borna disease virus and infection in humans. *Frontiers in Bioscience*, 7, 470–495.
- Iwahashi, K., Watanabe, M., Nakamura, K., Suwaki, H., Nakaya, T., Nakamura, Y., Takahashi, H., & Ikuta, K. (1997). Clinical investigation of the relationship between Borna disease virus (BDV) infection and schizophrenia in 67 patients in Japan. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 96(6), 412–415.
- Kalinina, O. S. (2014). Suchasna klasyfikacija i nomenklatura virusiv hrebetnyh [Modern classification and nomenclature of viruses in vertebrates]. *Naukovyj Visnyk L'vivs'kogo Nacional'nogo Universytetu Veterynarnoi' Medycyny ta Biotehnologij im. S. Z. G'zhyč'kogo*, 16(3), 125–130 (in Ukrainian).
- Karakose, A. R., Yuksel, P., Turan, N., Ziver, T., Saribas, S., Alpaly, N., & Kocazeybek, B. (2011). Does Borna disease virus (BDV) have a role in the etiopathogenesis of schizophrenia? *African Journal of Microbiology Research*, 5(9), 1062–1069.
- Kerski, A., De Kloet, A. H., & De Kloet, S. R. (2012). Vertical transmission of avian bornavirus in Psittaciformes: Avian bornavirus RNA and anti-avian bornavirus antibodies in eggs, embryos, and hatchlings obtained from infected sun conures (*Aratinga solstitialis*). *Avian Diseases*, 56(3), 471–478.

- Kinnunen, P. M., Palva, A., Vaheeri, A., & Vapalahti, O. (2013). Epidemiology and host spectrum of Borna disease virus infections. *Journal of General Virology*, 94, 247–262.
- Kuhn, J. H., Dürrwald, R., Bao, Y., Briese, T., Carbone, K., Clawson, A. N., deRisi, J. L., Garten, W., Jahrling, P. B., Kolodziejek, J., Rubbenstroth, D., Schwemmler, M., Stenglein, M., Tomonaga, K., Weissenböck, H., & Nowotny, N. (2015). Taxonomic reorganization of the family Bornaviridae. *Archives of Virology*, 160(2), 621–632.
- Lennartz, F., Bayer, K., Czerwonka, N., Lu, Y., Kehr, K., Hirz, M., Steinmetzer, T., Garten, W., & Herden, C. (2016). Surface glycoprotein of Borna disease virus mediates virus spread from cell to cell. *Cellular Microbiology*, 18(3), 340–354.
- Liu, S., Bode, L., Zhang, L., He, P., Huang, R., Sun, L., Chen, S., Zhang, H., Guo, Y., Zhou, J., Fu, Y., Zhu, D., & Xie, P. (2015). GC-MS-based metabonomic profiling displayed differing effects of borna disease virus natural strain Hu-H1 and laboratory strain V infection in rat cortical neurons. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), 19347–19368.
- Liu, X., Bode, L., Zhang, L., Wang, X., Liu, S., Zhang, L., Huang, R., Wang, M., Yang, L., Chen, S., Li, Q., Zhu, D., Ludwig, H., & Xiecor, P. (2015). Health care professionals at risk of infection with Borna disease virus – evidence from a large hospital in China (Chongqing). *Virology Journal*, 12, 39.
- Ludwig, H., & Bode, L. (2000). Borna disease virus: New aspects on infection, disease, diagnosis and epidemiology. *Revue Scientifique et Technique*, 19(1), 259–288.
- Lundgren, A.-L., Czech, G., Bode, L., & Ludwig, H. (1993). Natural Borna disease in domestic animals other than horses and sheep. *Zentralbl Veterinärmed B*, 40(1-10), 298–303.
- Lundgren, A.-L., Zimmermann, W., Bode, L., Czech, G., Gosztonyi, G., Lindberg, R., & Ludwig, H. (1995). Staggering disease in cats: Isolation and characterization of the feline Borna disease virus. *Journal of General Virology*, 76, 2215–2222.
- Lutz, H., Addie, D. D., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Horzinek, M. C., Hosie, M. J., Lloret, A., Marsilio, F., Pennisi, M. G., Radford, A. D., Thiry, E., Truyen, U., & Möstl, K. (2015). Borna disease virus infection in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 17, 614–616.
- Makarov, V. V., 2011. Sinantropizacija, veterinarnaja jepidemiologija i zoonozy [Synanthropization, veterinary epidemiology and zoonoses]. *Veterinarnaja Patologija*, 4, 7–19 (in Russian).
- Markovych, I. G., & Grynevych, O. Y. (2013). Analiz epidemichnoi situacii' shhodo zoonoprozoviv v Ukraï'ni za 2011–2012 roky [Analysis of epidemic situation on zoonoprozoses in Ukraine in 2011–2012]. *Ukraï'na. Zdorov'ja Nacii'*, 26, 125–129 (in Ukrainian).
- Matsumoto, Y., Hayashi, Y., Omori, H., Honda, T., Daito, T., Horie, M., Ikuta, K., Fujino, K., Nakamura, S., Schneider, U., Chase, G., Yoshimori, T., Schwemmler, M., & Tomonaga, K. (2012). Bornavirus closely associates and segregates with host chromosomes to ensure persistent intranuclear infection. *Cell Host and Microbe*, 11(5), 492–503.
- Matsunaga, H., Tanaka, S., Fukumori, A., Tomonaga, K., Ikuta, K., Amino, N., & Takeda, M. (2008). Isotype analysis of human anti-Borna disease virus antibodies in Japanese psychiatric and general population. *Journal of Clinical Virology*, 43(3), 317–322.
- Mazaheri-Tehrani, E., Maghsoudi, N., Shams, J., Soori, H., Atashi, H., Motamedi, F., Bode, L., & Ludwig, H., 2014. Borna disease virus (BDV) infection in psychiatric patients and healthy controls in Iran. *Virology Journal*, 11, 161.
- Nakamura, Y., Takahashi, H., Shoya, Y., Nakaya, T., Watanabe, M., Tomonaga, K., Iwahashi, K., Ameno, K., Momiyama, N., Taniyama, H., Sata, T., Kurata, T., de la Torre, J. C., & Ikuta, K. (2000). Isolation of Borna disease virus from human brain tissue. *Journal of Virology*, 74(10), 4601–4611.
- Okamoto, M., Hagiwara, K., Kamitani, W., Sako, T., Hirayama, K., Kirisawa, R., Tsuji, M., Ishihara, C., Iwai, H., Kobayashi, T., Tomonaga, K., Ikuta, K., & Taniyama, H. (2003). Experimental vertical transmission of Borna disease virus in the mouse. *Archives of Virology*, 148(8), 1557–1568.
- Patti, A. M., Vulcano, A., Candelori, E., Ludwig, H., & Bode, L. (2008). Borna disease virus infection in the population of Latium (Italy). *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 116(124), 74–76.
- Patti, A. M., Vulcano, A., Candelori, E., & Travali, S. (2008). Serological evidence for Borna disease virus infection in children, cats and horses in Sicily (Italy). *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 116(124), 77–79.
- Planz, O., Rentsch, C., Batra, A., Winkler, T., Büttner, M., Rziha, H.J., & Stitz, L. (1999). Pathogenesis of Borna disease virus: Granulocyte fractions of psychiatric patients harbor infectious virus in the absence of antiviral antibodies. *Journal of Virology*, 73(8), 6251–6256.
- Richt, J. A., Pfeuffer, I., Christ, M., Frese, K., Bechter, K., & Herzog, S. (1997). Borna disease virus infection in animals and humans. *Emerging Infectious Diseases*, 3(3), 343–352.
- Richt, J. A., & Rott, R. (2001). Borna disease virus: A mystery as an emerging zoonotic pathogen. *The Veterenary Journal*, 161(1), 24–40.
- Rosenberg, R. (2015). Detecting the emergence of novel, zoonotic viruses pathogenic to humans. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(6), 1115–1125.
- Rott, R., Herzog, S., Bechter, K., & Frese, K. (1991). Borna disease, a possible hazard for man? *Archives of Virology*, 118(3–4), 143–149.
- Rott, R., Herzog, S., Fleischer, B., Winokur, A., Amsterdam, J., Dyson, W., & Koprowski, H. (1985). Detection of serum antibodies to Borna disease virus in patients with psychiatric disorders. *Science*, 228(4700), 755–756.
- Scholbach, T., & Bode, L. (2008). Borna disease virus infection in young children. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 116(124), 83–88.
- Sidorchuk, A. A. (2012). Sovremennyye predstavlenija o zoonozah [Modern conceptions of zoonoses]. *Sel's'kohozjajstvennyye Zhivotnyye*, 4, 6–7 (in Russian).
- Staehele, P., Rinder, M., & Kaspers, B. (2010). Avian bornavirus associated with fatal disease in psittacine birds. *Journal of Virology*, 84(13), 6269–6275.
- Staehele, P., Sauder, C., Hausmann, J., Ehrensperger, F., & Schwemmler, M. (2000). Epidemiology of Borna disease virus. *Journal of General Virology*, 81, 2123–2135.
- Stegnij, B. T., Gerilovych, A. P., Bisjuk, I. J., Moroz, D. A., & Mandryga, M. S. (2014). Epizootichnyj monitoryng, prognozuvannja, reaguвання pry transmisivnyh hvorobah tvarny i naukovyj suprovid problemy v Ukraï'ni [International experience monitoring, forecasting, response in vector-borne diseases of animals and scientific support problems in Ukraine]. *Veterynarna Medycyna*, 98, 5–11 (in Ukrainian).
- Stütz, L., Krey, H., & Ludwig, H. (1980). Borna disease in rhesus monkeys as a model for uveo-cerebral symptoms. *Journal of Medical Virology*, 6(4), 333–340.
- Takahashi, H., Nakaya, T., Nakamura, Y., Asahi, S., Onishi, Y., Ikebuchi, K., Takahashi, T. A., Katoh, T., Sekiguchi, S., Takazawa, M., Tanaka, H., & Ikuta, K. (1997). Higher prevalence of Borna disease virus infection in blood donors living near thoroughbred horse farms. *Journal of Medical Virology*, 52(3), 330–335.
- Temmam, S., Davoust, B., Berenger, J.-M., Raoult, D., & Desnues, C. (2014). Viral metagenomics on animals as a tool for the detection of zoonoses prior to human infection? *International Journal of Molecular Sciences*, 15(6), 10377–10397.
- Tizard, I., Ball, J., Stoica, G., & Payne, S. (2016). The pathogenesis of bornaviral diseases in mammals. *Animal Health Research Reviews*, 17(2), 92–109.
- Waltrip, R. W., Buchanan, R. W., Summerfelt, A., Breier, A., Carpenter, W. T. Jr., Bryant, N. L., Rubin, S. A., & Carbone, K. M. (1995). Borna disease virus and schizophrenia. *Psychiatry Research*, 56(1), 33–44.
- Wang, L.-F., & Cramer, G. (2014). Emerging zoonotic viral diseases. *Revue Scientifique et Technique*, 33(2), 569–581.
- Wensman, J. J., Leuchowius, K. J., Yan, J., Berg, A. L., Bode, L., Ludwig, H., & Berg, M. (2016). Visualization of Borna disease virus protein interactions with host proteins using in situ proximity ligation assay. *British Journal of Virology*, 3(1), 11–23.
- Zaliunaite, V., Steibliene, V., Bode, L., Podlipskyte, A., Bunevicius, R., & Ludwig, H. (2016). Primary psychosis and Borna disease virus infection in Lithuania: A case control study. *BMC Psychiatry*, 16(1), 369–377.
- Zhang, L., Xu, M.-M., Zeng, L., Liu, S., Liu, X., Wang, X., Li, D., Huang, R.-Z., & Zhao, L.-B. (2014). Evidence for Borna disease virus infection in neuropsychiatric patients in three western China provinces. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 33(4), 621–627.



Biochemical composition of urine in rats with developed Guerin's carcinoma and administration of cisplatin

A. N. Naumenko, M. V. Gorelaya, S. O. Babiy

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipro, Ukraine

Article info

Received 20.12.2016

Received in revised form

15.01.2017

Accepted 22.01.2017

*Oles Honchar Dnipropetrovsk
National University,
Gagarin ave., 72,
Dnipro, 49010, Ukraine
Tel.: +38-067-28-34-569
E-mail: gorelaya@ukr.net*

Naumenko, A. N., Gorelaya, M. V., & Babiy, S. O. (2017). Biochemical composition of urine in rats with developed Guerin's carcinoma and administration of cisplatin. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8(1), 11–14. doi: 10.15421/021702

The kidneys are very sensitive to the action not only of exogenous chemicals but also the action of compounds of endogenous origin, produced by changes in the normal metabolic processes and the development of various pathologies. Thus, tumour development has a significant impact on overall homeostasis of the body. Research into the condition of the kidneys subject to growth of tumours when cisplatin is administered is a major issue in both medical and biochemical aspects. We investigated the renal function, electrolyte composition of the blood and urinary excretion of electrolytes and individual plasma osmolarity in models of tumour growth in rats subject to introduction of cisplatin. We found that development of Guerin's carcinoma T8 and the administration of cisplatin causes kidney damage in rats. This leads to an increase in the relative weight of the kidneys, proteinuria, and changes in activity of γ -glutamyl-transferase and lactate dehydrogenase in the kidney homogenate and urine, lower relative reabsorption and glomerular filtration. The development of Guerin's carcinoma and administration of cisplatin in the blood and urine of rats led to a decrease in diuresis per minute by 20–60%, creatinine clearance by 50–70% and reduction in the relative water reabsorption in the renal tubules to 26% compared with the control. The administration of cisplatin led to a threefold increase in the concentration of protein, twofold increase in the concentration of albumin and sevenfold increase in the concentration of glucose in the rats' urine. In the case of rats with lesions and renal diseases (including different types of tumours) a reduction in the output of urine per minute, creatinine clearance and water reabsorption in the renal tubules was observed, indicating significant damage to the concentration and filtration functions of the kidneys. Tumour growth led to the development of hypokalemia, hyponatremia and hypochloridemia, which are major and early signs of acute renal failure. The introduction of cisplatin led to damage to the kidneys and partly normalized these indicators, as evidenced by biochemical and morphological studies. Our study shows that there is a pressing need for use of drugs which protect the kidneys when cisplatin is administered.

Keywords: Guerin's carcinoma; electrolytes; biochemical markers; acute renal failure

Біохімічний склад сечі щурів в умовах розвитку карциноми Герена та введення цисплатину

A. N. Naumenko, M. V. Gorila, S. O. Babiy

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпро, Україна

Нирки чутливі до дії не лише екзогенних хімічних сполук, а і до дії речовин ендогенного походження, що утворюються за зміни перебігу нормальних метаболічних процесів і появи різних патологій. Розвиток пухлини має значний вплив на гомеостаз у цілому організмі. Дослідження стану нирок за пухлинного росту та введення цисплатину – важливе питання медицини та біохімії. Вивчено функціональний стан нирок, електролітичний склад крові та сечі, екскрецію окремих електролітів та осмолярність плазми крові в моделі пухлинного росту у щурів під час введення цисплатину. Розвиток карциноми Герена T8 та введення цисплатину зумовлювали пошкодження нирок щурів. Це спричинювало збільшення відносної ваги нирок, протеїнурію, зміни активності γ -глутамілтрансферази та лактатдегідрогенази в гомогенаті нирок і сечі, зниження відносної реабсорбції та клубочкової фільтрації. У результаті розвитку карциноми Герена та введення цисплатину в крові та сечі щурів відбувалося зниження хвилинного діурезу на 20–60%, кліренсу креатиніну – на 50–70%, зниження відносної реабсорбції води в ниркових канальцях – до 26% порівняно з контролем. Введення цисплатину викликало збільшення концентрації загального білка втрічі, альбуміну – удвічі та збільшення кількості глюкози в сечі щурів усередно. Під час уражень і захворювань нирок (у тому числі під час розвитку пухлин різних типів) у щурів спостерігали зниження хвилинного діурезу, кліренсу креатиніну, реабсорбції води в ниркових канальцях, що свідчило про значні порушення концентраційної та фільтраційної функцій нирок. Пухлинний ріст спричинював розвиток гіпокаліємії, гіпонатріємії та гіпохлоремії, як однієї з головних і раних ознак гострої ниркової недостатності. Введення цисплатину викликало

ураження нирок і нормалізувало ці показники, що підтверджувалося біохімічними та морфологічними дослідженнями. Виявлено нагальну необхідність застосування у подальшому нефропротекторних препаратів під час уведення цисплатину.

Ключові слова: карцинома Герена; електроліти; біохімічні маркери; гостра ниркова недостатність

Вступ

Низка факторів зумовлює особливу схильність ниркових каналців та інтерстицію до пошкодження токсинами. Хоча на нирки припадає менше 1% маси тіла, у середньому вони отримують приблизно 20% крові з хвилинного об'єму серця та 90% або більше з цього велими значного ниркового кровотоку припадає на коркову речовину нирок. Тому вплив токсинів, що циркулюють у крові, на каналці та інтерстицій коркової речовини нирок набагато сильніший у кількісному відношенні, ніж на більшість інших тканин (Нап, 2008; Vazaev, 2013; Moskva, 2013).

Одними з найчутливіших органів щодо впливу не лише екзогенних хімічних сполук, а також речовин ендogenous походження, що виникають під час зміни нормальних метаболічних процесів і розвитку різних патологій, безумовно виявляються нирки. У разі канцерогенезу поява пухлини має значний вплив на гомеостаз у цілому організмі. Під час застосування протипухлинних препаратів змінюється функціонування нирок. За введення цисплатину можливі порушення функції нирок, зовнішніми проявами яких будуть нудота, блювання, втрата апетиту, запаморочення, шум у вухах, зниження слуху, анафілактичні (алергічні) реакції, лейкопенія, тромбоцитопенія, анемія (Fink, 2000). Ураження нирок і сечовивідної системи під час застосування цисплатину спричинює порушення процесів сечоутворення: рідко спостерігаються такі ознаки як дизурія, гематурія, затримання сечовипускання, ниркова недостатність, олігурія, інтерстиціальний нефрит (Mandic, 2003; Martins, 2008; Loh, 2009; Nosov, 2012).

Діагностика захворювань нирок базується на аналізі сечі, тому що під час ураження нирок і за наявності запальних процесів вона змінює свої характеристики. Застосування цитостатиків викликає порушення процесів функціонування нирок (Кароог, 2001; Darmon, 2006; Kelland, 2007). Дослідження стану нирок за умов пухлинного росту та уведення цисплатину – важливе питання медицини та біохімії. Вивчення впливу протипухлинних ліків на біохімічні маркери функціонального стану нирок дозволить розробити ефективні схеми лікування, а також буде корисним під час дослідження біохімічних ефектів нових сполук із протипухлинною дією.

Це дослідження виконане для з'ясування змін біохімічного складу крові та сечі, функціонального стану нирок за умов пухлинного росту та введення розчину цисплатину ($\text{cis-PtCl}_2(\text{NH}_3)_2$, або цис-діамінодихлороплатини (II)).

Матеріал і методи досліджень

Експерименти проводили на щурах лінії Wistar вагою 100–150 г, яким перещеплювали підшкірно у ліву задню лапу карциною Герена (T_8) (20% суспензію клітин у фізіологічному розчині). Штам клітин отримано з Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України. Використано кров і сечу щурів із карциною Герена. Тварин поділили на дослідні групи по 7–8 щурів у кожній: група I – інтактні тварини, група II – тварини з карциною Герена T_8 , група III – тварини з карциною Герена T_8 , яким одноразово вводили розчин цисплатину. Як дослідні маркери використано концентрацію креатиніну в крові та сечі, а також загального білка, калію, натрію та хлору у крові. Сечу дослідних тварин збірвали вранці, натще, за умов індукованого діурезу з використанням 1% водного навантаження відповідно до методики, описаної Берхіним та Івановим у 1972 році (Berkhin, 1972).

Після декапітації тварин видаляли нирки. Органи промивали від залишків крові охолодженим фізіологічним розчином, висушували на паперовому фільтрі, зважували, одну нирку

подрібнювали ножицями. Стакан гомогенізатора з тканиною розміщували на баню з льодом. Готували 10% гомогенат на 0,3 М сахарозі з 0,001 М ЕДТА. Подрібнювали тканину шляхом багаторазового обертання пестика у ручному гомогенізаторі Даунса упродовж 1 хв. Отриманий гомогенат центрифугували 15 хв за 600 g (3 000 об./хв). Для аналізу використовували надосадову рідину.

Концентрацію загального білка визначали за допомогою діагностичних наборів реактивів виробництва «Філісіт-Діагностика» (Україна, Дніпро). Метод полягає у реакції білків із пірогалоловим червоним / молібдатом з утворенням забарвленого комплексу. Інтенсивність забарвлення реакційного розчину пропорційна концентрації білків в аналізованому розчині (Berkhin, 1972). Креатинін визначали за допомогою діагностичних наборів реактивів виробництва «Філісіт-Діагностика». Метод полягає у реакції пікрінової кислоти з креатиніном і утворенні в лужному середовищі продукту жовтого-червоного кольору (похідне 2,4,6-три-нітроциклогексадієну). Інтенсивність забарвлення дослідного розчину пропорційна концентрації креатиніну у пробі. У сироватці крові креатинін досліджено після депротеїнування розчином трихлороцтової кислоти, у сечі – після розведення (Berkhin, 1972).

Концентрацію глюкози визначали глюкозооксидазним методом за допомогою діагностичного набору реактивів виробництва «Філісіт-Діагностика» (Україна, Дніпро). Принцип методу полягав у здатності глюкози окиснюватись киснем повітря до глюконової кислоти та перекису водню, що за присутності пероксидази реагував із фенолом і 4-амінофеназном з утворенням хіноніміну червоно-фіолетового забарвлення, що визначалось фотометрично (Berkhin, 1972).

Швидкість клубочкової фільтрації за кліренсом ендogenous креатиніну (CCr) визначали за пробою Реберга – Тареева. Концентрацію неорганічного фосфору визначали за допомогою діагностичного набору реактивів виробництва «Філісіт-Діагностика». Метод полягає у реакції неорганічних фосфатів із молібденовою кислотою та утворенні в сильнокислому середовищі фосфомолібденової кислоти, що відновлювалася за присутності заліза (II) у молібденову синь. Інтенсивність забарвлення дослідного розчину пропорційна концентрації неорганічного фосфору у пробі (Berkhin, 1972).

Концентрацію хлоридів визначали фотометричним методом за допомогою діагностичного набору реактивів виробництва «Філісіт-Діагностика». Метод базується на здатності хлорид-іонів у сильнокислому середовищі вивільняти з родоніту ртуті (II) іон родоніту, що реагував з іонами заліза (III) з утворенням забарвленого продукту. Інтенсивність забарвлення утвореного роданіду заліза пропорційна концентрації іонів хлориду у пробі (Berkhin, 1972).

Концентрацію калію визначали турбідиметричним методом без депротеїнізації за допомогою діагностичного набору реактивів виробництва «Філісіт-Діагностика». Метод базується на взаємодії іонів тетрафенілбората у лужному середовищі з утворенням стабільної суспензії. Мутність суспензії, яку вимірювали за довжини хвилі 578 нм, пропорційна концентрації іонів калію у дослідному зразку (Berkhin, 1972).

Результати опрацьовували статистично, використовуючи однофазний дисперсійний аналіз (ANOVA). Вірогідними вважали відмінності між зразками за $P < 0,05$. У таблицях наведено $\bar{x} \pm SD$.

Результати та їх обговорення

За розвитку пухлини (група T_8) встановлене збільшення хвилинного діурезу в 1,6 раза, порівняно з контрольною групою (табл. 1). Уведення цисплатину знижувало хвилинний

діурез в 1,8 раза порівняно з контролем. Тобто у щурів-пухлиноносіїв за введення розчину цисплатину відмічено олігурію, що свідчило про ознаки токсичної дії цього протипухлинного препарату, показаної у літературному огляді (Kelland, 2007).

За розвитку пухлини та введення цисплатину відмічали збільшення концентрації креатиніну в крові в 2,6 та 1,4 раза відповідно, порівняно з контролем (табл. 1).

Такі зміни демонстрували накопичення в організмі азот-умісних метаболітів унаслідок їх посиленої продукції та порушення процесів фільтрації в нирках.

Відповідно до зростання вмісту креатиніну в крові пухлинний ріст і введення цисплатину викликали збільшення цього показника в сечі. Встановлене збільшення креатиніну в 1,3 раза в групі T₈+cPt порівняно з контролем.

Для визначення фільтраційної здатності нирок враховували співвідношення концентрації креатиніну в крові та сечі, розраховували кліренс креатиніну. Під час визначення концентрації креатиніну та кліренсу креатиніну в групі T₈ встановлено її зменшення на 10% порівняно з контролем. За введення цисплатину значення кліренсу креатиніну зменшилось в 1,6 раза порівняно з контролем. Таким чином, пухлинний ріст та введення цисплатину здатні порушувати фільтраційну функцію нирок. За умов розвитку пухлини рівень загального білка та альбуміну в сечі збільшувався в 1,3 та 1,7 раза відповідно, порівняно з контролем (табл. 2).

Таблиця 1

Біохімічні маркери функціонального стану нирок у щурів із пухлиною (n = 8)

Групи тварин	Креатинін, мкмоль/л		Кліренс креатиніну, мкл/хв на 100 г
	кров	сеча	
Контроль	237,3 ± 16,9	5,61 ± 1,04	0,816 ± 0,465
T ₈	623,5 ± 35,5*	4,62 ± 0,71	0,712 ± 0,341
T ₈ +cPt sln	165,9 ± 25,5	7,44 ± 1,14*	0,544 ± 0,311*

Примітка: # – P < 0,05 порівняно з контролем; * – P < 0,05 порівняно з T₈+cPt|sln.

Таблиця 2

Біохімічні маркери ниркового ушкодження у щурів із карциною, чутливою до дії цисплатину (n = 8)

Групи тварин	Білок, мкг/мл	Альбумін, ммоль/л	Глюкоза, ммоль/л
Контроль	0,232 ± 0,012	0,231 ± 0,012	0,741 ± 0,511
T ₈	0,392 ± 0,024	0,391 ± 0,051#	0,142 ± 0,031#
T ₈ +cPt sln	0,642 ± 0,121#	0,464 ± 0,091#	5,831 ± 0,514#

Примітка: * – P < 0,05 порівняно з T₈+cPt|sln; # – P < 0,05 порівняно з контролем.

За введення цисплатину щурам-пухлиноносіям встановлено, що концентрація загального білка в сечі збільшилась в 2,8 раза, а альбуміну – в 2,0 раза порівняно з контролем. Такі зміни можуть бути викликані як порушенням білкового обміну в організмі за дії патологічних факторів, так і внаслідок пошкодження нефронів, що викликає фільтрацію з кровотоку білків високої молекулярної маси та зумовлює порушення реабсорбції з первинної сечі.

Ці дані співвідносяться з результатами дослідження рівня глюкози в сечі. Під час визначення концентрації глюкози в сечі встановлено, що в групі T₈ її концентрація зменшилась у 5,3 раза порівняно з контролем. Це могло бути наслідком розвитку гіпоглікемічного стану у дослідних щурів, викликаного інтенсивним пухлинним ростом.

За введення цисплатину концентрація глюкози в сечі збільшилась в 7,8 раза порівняно з контролем. Глюкозурія виступає характерною ознакою цисплатинової нефропатії (Nurphreys, 2005). Такі зміни, вірогідно, викликані ушкодженням ниркових каналців токсичними метаболітами цисплатину, що порушує процеси реабсорбції низькомолекулярних сполук.

Отже, пухлинний ріст та цисплатин мають виражений нефротоксичний ефект, який проявляється у порушенні процесів каналцевої реабсорбції та клубочкової фільтрації.

За розвитку пухлини активність ЛДГ у сечі зменшилась удвічі порівняно з контролем (табл. 3).

Таблиця 3

Активність ЛДГ і ГТП у щурів із карциною, чутливою до дії цисплатину (n = 8)

Групи тварин	ЛДГ × 10 ⁻³ , МО/л	ГТП, МО/л
Контроль	20,4 ± 7,79	0,90 ± 0,612
T ₈	10,2 ± 4,22#	3,31 ± 0,521#
T ₈ +cPt sln	27,2 ± 3,68#	8,91 ± 0,231#

Примітка: * – P < 0,05 порівняно з T₈+cPt|sln; # – P < 0,05 порівняно з контролем.

За введення цисплатину активність ЛДГ збільшилась в 1,3 раза порівняно з контролем. Такий факт вказує на локалізоване ушкодження дистального відділу нефрону метаболітами цього цитостатика.

Маркер цілісності проксимального відділу нефрону – ГТП. У групі T₈ її активність у сечі збільшилась в 3,7 раза, а за введення цисплатину активність ГТП збільшилась в 9,9 раза порівняно з контролем, що вказує на деструкцію каналцевого епітелію в цьому відділі нефрону. За розвитку пухлини відбулось зростання вмісту позитивно заряджених електролітів (катіонів) у сироватці крові. Концентрація калію в групі T₈ збільшилась в 1,7 раза порівняно з контролем (табл. 4).

Таблиця 4

Вміст катіонів у крові щурів із пухлиною у щурів, чутливою до дії цисплатину (n = 8)

Групи тварин	Калій, ммоль/л	Натрій, ммоль/л	Хлориди, ммоль/л
Контроль	5,35 ± 0,211	196,8 ± 9,38	107,1 ± 71,40
T ₈	9,33 ± 1,460#	150,1 ± 39,30	155,9 ± 8,54
T ₈ +cPt sln	12,10 ± 0,731#	31,2 ± 6,25#	153,6 ± 4,02

Примітка: * – P < 0,05 порівняно з T₈+cPt|sln; # – P < 0,05 порівняно з контролем.

За умов введення цисплатину концентрація калію збільшилась у 2,2 раза порівняно з контролем, що може бути наслідком зменшення екскреції цього електроліту через порушення реабсорбції електролітів у каналцях. У групі T₈ спостерігали зниження на 30% вмісту натрію в сироватці, тоді як за введення цисплатину його концентрація знижувалась в 6,3 раза порівняно з контрольними значеннями. Зменшення концентрації натрію на фоні зниження швидкості сечоутворення у щурів, яким вводили цисплатин, може свідчити про затримання води в організмі, гіперволемію як характерну ознаку цисплатинової інтоксикації. За розвитку пухлини та введення цисплатину збільшувалися концентрації хлоридів у сироватці в 1,4 раза порівняно з контролем, що може бути наслідком метаболічного ацидозу, а також затримання іонів H⁺ і хлоридів в організмі дослідних тварин.

Під час визначення концентрації калію в сечі встановлено, що в групі T₈ його концентрація зменшилась в 1,9 раза порівняно з контролем (табл. 5).

Таблиця 5

Електролітичний склад сечі у щурів із карциною, чутливою до дії цисплатину (n = 8)

Групи тварин	Калій, ммоль/л	Натрій, ммоль/л	Хлориди, ммоль/л
Контроль	5,51 ± 0,501	0,412 ± 0,052	535,7 ± 41,8
T ₈	2,92 ± 0,724#	0,102 ± 0,011#	53,6 ± 1,5#
T ₈ +cPt sln	35,20 ± 9,230#	0,082 ± 0,012#	455,4 ± 5,1

Примітка: # – P < 0,05 порівняно з контролем; * – P < 0,05 порівняно з T₈+cPt|sln.

За введення цисплатину концентрація калію в сечі збільшилась у 6,4 раза порівняно з контролем, що вказує на виражену гіперкаліурію як наслідок деструктивних змін у нефроні.

Функціональні зміни нирок за розвитку пухлини супроводжувались порушенням електролітного складу крові та сечі. Пухлинний ріст спричинював розвиток гіпокаліємії, гіпонат-

ріємії та гіпохлоремії, що виступало однією з головних і ранніх ознак гострої ниркової недостатності. Особливу увагу слід звернути на втрату іонів натрію в крові, що зазвичай супроводжується зменшенням об'єму позаклітинної рідини та плазми, зменшенням артеріального тиску та клубочкової фільтрації, навіть за достатнього надходження рідини розвивається дегідратація. Ці результати співвідносяться з наведеними даними дослідження хвилинного діурезу та кліренсу креатиніну.

За дефіциту натрію знижується осмотичний тиск у клітинах, посилюється розпад клітинних білків, збільшується залишковий азот. За введення цисплатину зміни мали інший характер: відмічалась гіперкаліємія, гіпонатріємія та гіперхлоремія, що може свідчити про розвиток ацидозу та серйозні пошкодження клітин організму (нормальних і злоякісних).

Істотну загальну токсичність і нефротоксичність препаратів цисплатину підтверджено та доведено в модельних експериментах із застосуванням клітин карциноми Герена, чутливої до лікування цисплатиною (Mandic, 2003). Спостерегали генералізовані порушення функціонування як нирок, так і організму щурів у цілому, що могло становити суттєву загрозу життю тварин (Кароог, 2001).

Модельна система подібного роду виявилася помітно зручнішим інструментом для дослідження впливу різних агентів із потенційною протипухлинною активністю на гомеостаз живих організмів, зокрема щурів (Hartinger, 2009). Такі експериментальні підходи доцільно застосовувати під час вивчення біохімічних механізмів дії майбутніх антиканцерогенних лікарських засобів на стадії їх розроблення (Kelland, 2007; Dougan, 2008).

Нефротоксичність протипухлинних препаратів беззаперечно становить важливу проблему під час терапії таких захворювань (Benoit, 2005). Для подолання таких складностей в онкологічній практиці потрібно зважати на оцінку процесів функціонування нирок під час лікування цисплатиною та іншими подібними лікарськими засобами (Heffeter, 2011). Постійний моніторинг гомеостазу крові та нирок має бути протокоальним етапом в антиканцерогенній терапії. У відповідь на встановлені пошкодження роботи нирок слід обов'язково застосовувати нефропротекторні лікарські засоби. Дане дослідження допомагає зрозуміти біохімічні механізми метаболізму лікарських препаратів (Heffeter, 2011) і загалом ксенобіотичних сполук у процесах обміну речовин живих істот.

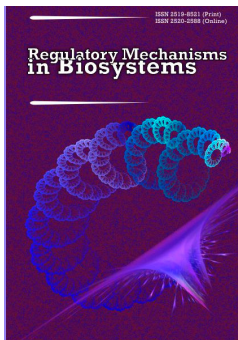
Висновки

За умов розвитку пухлини та ін'єкцій цисплатину щурам-пухлиноносійм спостерегали зниження хвилинного діурезу на 20–60%, кліренсу креатиніну – на 50–70% та відносної реабсорбції води в ниркових канальцях – на 26% порівняно з контролем. Такі зміни свідчили про порушення концентраційної та вивідної функцій нирок, що вказувало на початок розвитку гострої ниркової недостатності. Як наслідок, у цих щурів визначали гіперкаліємію, гіпонатріємію та гіпохлоремію, що свідчило про розвиток ацидозу та цитолізу. За таких умов відбувалося зменшення об'єму циркулюючої плазми та збільшення концентрації загального білка в крові з одночасним посиленням його виведенням із сечею.

Отримані результати підтвердили, що розвиток карциноми Герена T₈ та введення цисплатину зумовлювали пошкодження нирок щурів, а також викликали зміни біохімічних показників, електролітичного складу крові щурів. Такі дані безпосередньо вказують на нефротоксичність цисплатину, що обов'язково необхідно враховувати під час проведення терапевтичних заходів із залученням даного препарату.

References

- Bazaev, V. V., & Dutov, V. V. (2013). Insidental renal cell carcinoma: Clinical and morphological features. *Urology*, 2, 66–68.
- Benoit, D. D., Depuydt, P. O., Vandewoude, K. H., Offner, F. C., Boterberg, T., De Cock, C. A., Noens, L. A., Janssens, A. M., & Decruyenaere, J. M. (2005). Outcome in critically ill medical patients treated with renal replacement therapy for acute renal failure: Comparison between patients with and those without haematological malignancies. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 20, 552–558.
- Berkhin, E. B. (1972). *Methods of experimental study of the kidneys and water-salt metabolism*. Prince Publishing House, Ivanovo (in Russian).
- Darmon, M., Ciroidi, M., Thiery, G., Schlemmer, B., & Azoulay, E. (2006). Clinical review: Specific aspects of acute renal failure in cancer patients. *Critical Care*, 10, 211–218.
- Darmon, M., Thiery, G., Ciroidi, M., de Miranda, S., Galicier, L., Raffoux, E., Le Gall, J. R., Schlemmer, B., & Azoulay, E. (2005). Intensive care in patients with newly diagnosed malignancies and a need for cancer chemotherapy. *Critical Care Medicine*, 33, 2488–2493.
- Davidson, M. B., Thakkar, S., Hix, J. K., Bhandarkar, N. D., Wong, A., & Schreiber, M. J. (2004). Pathophysiology, clinical consequences, and treatment of tumor lysis syndrome. *American Journal of Medicine*, 116, 546–554.
- Dougan, S. J., Habtemariam, A., McHale, S. E., Parsons, S., & Sadler, P. J. (2008). Catalytic organometallic anticancer complexes. *Proceeding of National Academy of Sciences*, 105, 28–33.
- Fink, D., & Howell, S. B. (2000). How does cis-platin kill cells? In: *Platinum-based drugs in cancer therapy*. Humana Press., Totowa, New Jersey, 149–167.
- Han, W. K. (2008). Biomarkers for early detection of acute kidney injury. *Nephrology Rounds*, 4, 304–309.
- Hartinger, C. G., & Dyson, P. J. (2009). Bioorganometallic chemistry from teaching paradigms to medicinal applications. *Chemical Society Reviews*, 38, 391–401.
- Heffeter, P. (2011). Anticancer activity of metal complexes: Involvement of redox processes. *Antioxidants and Redox Signaling*, 15(4), 85–127.
- Huphreys, B. D., Soiffer, R. J., & Magee, C. C. (2005). Renal failure associated with cancer and its treatment: And update. *Journal of the American Society of Nephrology*, 4, 151–161.
- Johnson, R. J., Kivlighn, S. D., Kim, Y. G., Suga, S., & Fogo, A. B. (1999). Reappraisal of the pathogenesis and consequences of hyperuricemia in hypertension, cardiovascular disease, and renal disease. *American Journal of Kidney Diseases*, 33, 225–234.
- Kapoor, M., & Chan, G. Z. (2001). Malignancy and renal disease. *Critical Care Clinics*, 17, 571–598.
- Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 11, 573–584.
- Lee, M. S. (2012). Systematic prioritization of cancer combination therapies: Are we really on target. *Future Medicinal Chemistry*, 2, 387–389.
- Loh, A. H. L., & Cohen, A. H. (2009). Drug-induced kidney disease – pathology and current concepts. *Annals. Academy of Medicine, Singapore*, 38(3), 240–250.
- Mandic, A., Hansson, J., Linder, S., & Shoshan, M. C. (2003). Cis-platin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 9, 100–106.
- Martins, N. M., Santos, N. A., Curti, C., Bianchi, M. L., & Santos, A. C. (2008). Cis-platin induces mitochondrial oxidative stress with resultant energetic metabolism impairment, membrane rigidification and apoptosis in rat liver. *Journal of Applied Toxicology*, 7, 337–344.
- Moreli, J. E., Thomas, D. R., & Wilson, M. (2006). Cachexia: Pathophysiology and clinical relevance. *American Journal of Clinical Nutrition*, 83, 735–743.
- Moskvina, L. V., Andreeva, Y. Y., & Malkov, P. G. (2013). Clinically significant morphological parameters of renal cell carcinoma. *Oncology*, 4, 34–39.
- Nosov, D. A. (2012). Disseminated renal cell carcinoma: Current capabilities of drug treatment. *Practical Oncology*, 15(3), 185–195.
- Pal, S., Sadhu, A. S., Patra, S., & Mukherjee, K. (2008). Histological vis-avis biochemical assessment on the toxic level and antineoplastic efficacy of a synthetic drug Pt-ATP on experimental animal models. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 68, 98–112.



Reactions of eosinophilic granulocytes in the sputum and peripheral blood of children suffering from bronchial asthma with signs of eosinophilic and non-eosinophilic inflammation of the bronchi

O. K. Koloskova, T. M. Bilous, M. V. Dikal, U. V. Lomakina, T. G. Kopchuk, T. O. Lobanova

Bukovinian State Medical University, Chernivtsi, Ukraine

Article info

Received 19.12.2016

Received in revised form
03.02.2017

Accepted 07.02.2017

*Bukovinian State Medical
University, Teatralna Square, 2,
Chernivtsi, 58002, Ukraine
Tel.: +38-050-221-35-16*

E-mail:

*koloskov-elena@yandex.ru,
bilous.tetiana@bsmu.edu.ua,
vitmar888@mail.ru*

Koloskova, O. K., Bilous, T. M., Dikal, M. V., Lomakina, U. V., Kopchuk, T. G., & Lobanova, T. O. (2017). Reactions of eosinophilic granulocytes in the sputum and peripheral blood of children suffering from bronchial asthma with signs of eosinophilic and non-eosinophilic inflammation of the bronchi. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8(1), 15–18. doi: 10.15421/021703

The aim of research was to improve the management of bronchial asthma in children by examining the peculiarities and diagnostic value of reaction markers of eosinophil granulocytes in the sputum and peripheral blood of patients with signs of eosinophil and non-eosinophil phenotypes of this disease. A cohort of 118 school-age children suffering from BA was examined during a period free from attacks. Group I (the main group) included 61 schoolchildren with signs of eosinophil phenotype (EP) of asthma detected by the character of bronchial inflammation with eosinophil granulocytes present in the sputum at a level of >3%, group II (the comparison group) included 57 patients with a lower number of eosinophils in the sputum (non-eosinophil phenotype (NP) of BA). The average index of the relative content of eosinophils in the peripheral blood among the representatives of group I was $5.82 \pm 0.63\%$, and in children with the signs of NPBA – $6.02 \pm 0.74\%$ ($P > 0.05$), and average indices in the groups of absolute eosinophil number in the blood were 0.37 ± 0.04 and 0.41 ± 0.05 respectively ($P > 0.05$). The negative reserve of NBT eosinophils in the sputum as a test to verify EPBA showed the following diagnostic values: specificity – 83.3%, predicted value of a positive result – 95.6%. IL-5 content in the blood serum of children with EPBA was 5.99 ± 1.74 ng/ml, in patients of group II – only 1.99 ± 0.49 ng/ml ($P < 0.05$). Eosinophil cationic protein (ECP) in the sputum of patients of group I reached 2.72 ± 0.35 ng/ml, and in the comparison group – only 1.74 ± 0.34 ng/ml ($P < 0.05$), when the content of ECP in sputum was >1.0 ng/ml the risk of EPBA showed a statistically significant increase: OR = 4.13, RR = 2.02, and AR – 0.34. The efficacy of the standardized basic anti-inflammatory therapy in patients of clinical group I was higher as compared to the children with the signs of NPBA, which was illustrated by the reduced risk of inadequate control of the disease: the index of absolute risk decrease was 31.7%, relative risk – 57.1% with necessary minimal number of patients – 1.75.

Keywords: NBT-test; airway inflammation; eosinophil cationic protein; asthma

Introduction

Nowadays bronchial asthma in children is considered as a disease characterized by chronic inflammation of the bronchi, in the development of which various cells and cellular elements play a certain role (Global Strategy for Asthma Management and Prevention, 2016). In case of antigenic stimulation, primary effector cells (epithelial cells of the respiratory tract, mast cells, macrophages) bound with IgE are considered to release mediators of inflammation resulting in the development of an inflammatory reaction both of an immediate and late type. The main mediators evaluating acute phase of inflammation are interleukins, tumor- α necrosis factor, interferon- γ , activating a range of immunological reactions and promoting the release of histamine, leukotrienes, eosinophil chemotaxis factors, neutrophils and other mediators of inflammation into the peripheral circulation (Chatila et al., 2008). Acidophilic leukocytes described more than 120 years ago by Paul Ehrlich and named as “eosinophils” were and still remain a matter of high scientific interest in different branches of medicine. Since that time asthma and helminthiasis and acute anaphylaxis have been associated with them and eosinophilia of the peripheral blood

as a pathogenic syndrome of asthma was examined at the very beginning of the XX century. However, the role of these cells in occurrence of epithelial injury and other phenomena of late phase allergic inflammation was defined only during the last decade of the last century (Beasley et al., 1989). Eosinophils constitute from 1% to 4% of the total number of leukocytes ($120\text{--}350$ cells/mm³). They are of a specific granularity approximately 200 granules per cell. The granules contain alkaline proteins, the majority of them being large principal protein, eosinophil cationic protein, eosinophil peroxidase, and eosinophil neurotoxin (Motojima et al., 1989). Proinflammatory properties have been found in eosinophils due to those substances which are characterized by cytotoxicity and aid stimulation of mast cells and basophils degranulation, and therefore detection of the content of cationic proteins and peroxidase can be indicative of the degree of activation of the major proinflammatory cells of an allergic inflammation, and indirectly – of severity of this inflammatory process. At the same time, eosinophils are mainly tissue cells and this fact complicates the study of their functional peculiarities (Novitskiy et al., 2006).

In literary sources the bulk of attention has been paid to the detection of cytotoxic substances of eosinophil granulocytes in the

peripheral blood and their relation to the severity of disorders in the general condition of patients suffering from allergic processes (Litvinova et al., 2006). Considering the leading role of eosinophils in allergic inflammation which occurs with bronchial asthma (Pavord, 2013), the study of the diagnostic and prognostic value of various indices of eosinophil granulocyte activity remains a high priority task for allergology (Jacobsen et al., 2014). At the same time, the highest informational value undoubtedly attaches to the above mentioned markers of acidophilic leukocytes activity located directly in the “shock” organ of bronchial asthma – in the respiratory tract. Literary data concerning the use of changes of eosinophil metabolic activity to improve the control of bronchial asthma (BA) in children are sparse and contradictory. Some of these sources contain sufficient diagnostic value of the given inflammatory markers (Madison, 2000), while other researchers are convinced that the use of indices of eosinophil leukocyte activity in the blood alone is a test with insufficient information value to confirm the presence of BA in children (Kato et al., 2006). However, an increased number of eosinophils in the peripheral blood and respiratory tract, increased content of cationic proteins in the blood serum and shock-organs of patients with allergic pathology are considered by a number of authors as markers of unfavourable prognosis of bronchial-obstructive conditions in children (Jens et al., 2015).

This article aims at improving the management of bronchial asthma in children by examining the peculiarities and diagnostic value of reaction markers of eosinophil granulocytes in the sputum and peripheral blood of patients with signs of eosinophil and non-eosinophil phenotypes of the disease.

Materials and methods

A cohort of 118 school-age children suffering from BA was examined during a period free from attacks at the Pulmo-Allergological Department, Regional Children’s Municipal Hospital, Chernivtsi, adhering to the principles of bioethics by means of the simple random sample method. Two clinical groups were formed based on the results of cytomorphological examination of sputum. Group I (main) included 61 schoolchildren (77.1% among them were boys) with the signs of the eosinophil phenotype (EP) of asthma detected by the character of bronchial inflammation when eosinophil granulocytes were present in the sputum at a level of $\geq 3\%$. Group II (comparison) included 57 patients (52.6% boys, $P < 0.05$) with a lower number of eosinophils in the sputum, and due to this fact the non-eosinophil variant of bronchial inflammatory response was detected in those children, and thus – non-eosinophil phenotype (NP) of BA. The value of relative content of eosinophils in the sputum of group I of patients was $13.3 \pm 1.8\%$, and in group II – $1.94 \pm 0.48\%$ ($P < 0.001$), which was indicative of the correct formation of the comparison groups.

The average age of the representatives of groups I and II was 11.9 ± 0.42 and 11.04 ± 0.39 years respectively ($P > 0.05$). Differences between the groups in the age of first onset of BA were not found; thus in group I asthma made its first onset at the age of 2.2 ± 0.11 , and in the comparison group this index was 2.1 ± 0.12 ($P > 0.05$).

In group I an intermittent course of eosinophil phenotype of bronchial asthma (EPBA) was registered in 2 cases (3.3%), mild persistence – in 10 children (16.4%), and in group II (the comparison group) – in 5 patients (8.8%) and only in 6 patients (10.5%, $P > 0.05$) respectively. The atopic form prevailed among the representatives of group II (59.6% against 40.0%, $P < 0.05$), and the mixed form was found in patients with EPBA (60.0% against 40.4%, $P < 0.05$). The groups were compared by the main clinical signs, and certain evident differences between the groups did not affect the results obtained but only emphasized the phenotype heterogeneity of the disease and the presence of different phenotype variants in sick children.

The control of the disease was evaluated by means of a questionnaire containing clinical-spirometrical findings according

to which a value of 10 and lower reflected a controlled course of BA, 11–16 a partially controlled course of the disease, higher than 17 indicated an uncontrolled variant of BA (Boulet et al., 2002). Quantitative and qualitative cytological content of the sediment was detected in sputum of patients, the results were considered to be a group-forming sign: when $>3\%$ eosinophil granulocytes were found in the sputum the patients were included into group I, patients with a lower number were placed in clinical group II (the comparison group). At the same time, the fluid fraction above the sediment obtained after sputum was centrifuged and the content in this of human eosinophil cationic protein (ECP) was detected by means of ELISA-method according to the technique worked out by the producer and using reagents Aviscera Bioscience, Inc. (USA). ECP reflected cytotoxic activity of sputum eosinophils, and its average content in the cohort of all the patients was 2.28 ± 2.2 ng/ml (from 0 to maximum value – 9.2 ng/ml).

The markers of oxygen-dependent metabolism of eosinophil granulocytes in the blood and sputum were studied using the data of the spontaneous and stimulated NBT-test (B. H. Park’s method in modification of Klimov et al. (1988), nitroblue tetrazolium test). The reserve of microbicidal ability of these cells was calculated as the difference between the results of the spontaneous and the stimulated NBT-test. Phagocytic function of acidophilic leukocytes in the peripheral blood and sputum was detected by means of E. F. Chernushenko’s method.

Interleukin-5 (IL-5) content, which is directly connected with eosinophil functions, was examined in the blood serum by means of the solid-phase immune-enzymatic method using the reagents “IFA-Best” (RF) according to the recommendations of the producer.

The results obtained were analyzed by means of the computer package Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA) using parametric and non-parametric methods of calculation and by means of clinical-epidemiological analysis.

Results and discussion

The study demonstrated that in the cohort of the examined patients the eosinophil phenotype of bronchial asthma (EPBA) was found 1.5 times more frequently among the boys, while the non-eosinophil phenotype of bronchial asthma (NPBA) was detected more frequently among the girls. Therefore, the male gender was associated with an increased risk of EPBA: odds ratio (OR) index was 7.3 (95% CI: 1.69–8.23), relative risk (RR) – 1.63 (95% CI: 1.02–2.59), attributive risk (AR) – 0.3. Post-test probability (PP+) of presence of eosinophil variant of bronchitis among boys increased by 16.6%, and among girls (PP–) decreased by 15.1%.

Persistence of BA of moderate severity occurred in every second (50.9%) representative of clinical group II, and among the patients with EPBA it was in 1.5 times less ($P = 0.05$). By contrast, the severe course prevailed significantly among the patients of the clinical group I. The indices of asthma control during initial examination did not differ among the patients with alternative phenotypes of BA, and on completion of the 3rd month of the basic therapy they appeared to be significantly worse among patients with NPBA. Thus, the average score by clinical-instrumental scale to evaluate asthma before the course of treatment in group I was 18.16 ± 1.03 , and in group II – 18.17 ± 1.28 ($P > 0.05$). At the same time an uncontrolled course of the disease was registered in 55.4% of the patients in the survey with signs of EPBA, and in group II – in 52.8% cases ($P > 0.05$).

There was a tendency to the reduction of the absolute and relative number of eosinophils in the peripheral blood of patients in clinical group I. This may well indicate migration of those effector cells into the “target organ”. The average index of relative content of eosinophils in the peripheral blood among the representatives of group I was $5.82 \pm 0.63\%$, and in children with the signs of NPBA – $6.02 \pm 0.74\%$ ($P > 0.05$), and average indices in both groups of absolute eosinophil number (AEN) in the blood were 0.37 ± 0.04 and 0.41 ± 0.05 respectively ($P > 0.05$). Considering AEN index

≥ 0.5 as a paraclinical marker of blood eosinophilia, it was found that in group I it was registered in 27.9% of the patients, and in group II (the comparison) – in 35.1% ($P > 0.05$). Therefore, the index of AEN ≥ 0.5 was associated with an increased risk of NPBA: OR = 1.4 (95% CI: 0.69–3.05), RR = 1.2 (95% CI: 0.69–2.02), AR = 0.08. At the same time, post-test probability (PP+) of presence of the non-eosinophil variant of bronchitis increased only by 5.7%, and with lower values of AEN (PP–) it decreased only by 2.6%. Statistically valuable differences in the indices of oxygen-dependence microbicidal capacity of eosinophils in the peripheral blood and sputum of children with alternative phenotypes of BA were not found (Table 1). Table 1 presents the results of the NBT-test of eosinophil granulocytes (%) in the blood and sputum in groups I and II of patients. Thus, the lowest reserve of oxygen-dependent microbicidal capacity of eosinophils in sputum was

found in patients with EPBA signs, which was indicative of their leading role in allergic inflammation of the respiratory tract. Negative values of the reserve of NBT-test indices of eosinophils in sputum (as the difference between stimulated and spontaneous results) increased the risk (OR) of EPBA presence by 6.1 times (95% CI: 0.65–57.15), at the same time RR was 1.2 (95% CI: 0.20–7.47), and AR – 0.17. The negative reserve of NBT eosinophils in sputum as the test to verify EPBA showed the following diagnostic values: specificity – 83.3% (95% CI: 35.9–99.9), predicted value of a positive result – 95.6% (95% CI: 78.1–99.9), spread – 86.9% (95% CI: 73.7–95.1), accuracy – 58.7% (95% CI: 43.2–73.0).

The indices of phagocytic function of eosinophil granulocytes in the peripheral blood and sputum in patients with alternative phenotypes of BA also emphasized the role of these effector cells in allergic inflammation of the respiratory tract (Table 2).

Table 1

Markers of oxygen-dependent metabolism of eosinophils in the blood and sputum in children with eosinophil phenotype of bronchial asthma

Indices	NBT spontaneous, %		NBT stimulated, %	
	blood	sputum	blood	sputum
Eosinophil phenotype of bronchial asthma	17.6 ± 2.13	15.6 ± 4.58	18.8 ± 0.97	15.7 ± 3.86
Non-eosinophil phenotype of bronchial asthma	17.3 ± 1.26	20.2 ± 6.25	19.2 ± 1.34	22.0 ± 6.94
P	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

Table 2

Indices of phagocytic function of eosinophils in the blood and sputum in children from the clinical groups of comparison

Indices	Phagocytic activity, %		Phagocytic number, standard units	
	blood	sputum	blood	sputum
Eosinophil phenotype of bronchial asthma	68.7 ± 6.36	62.1 ± 2.34	3.24 ± 0.29	3.02 ± 0.53
Non-eosinophil phenotype of bronchial asthma	73.6 ± 6.03	26.7 ± 2.54	4.52 ± 0.53	0.40 ± 0.05
P	>0.05	<0.05	>0.05	<0.05

The presence of statistically important differences in the markers of phagocytic function of eosinophils in the sputum of children correlated with preliminary suggestions concerning active involvement of these cells into the inflammatory process of the bronchi, which was emphasized by an increased content of IL-5 in the blood serum in the representatives of clinical group I. Thus, IL-5 content in the blood serum of children with EPBA was 5.99 ± 1.74 ng/ml, in patients of group II it was only 1.99 ± 0.49 ng/ml ($P < 0.05$). When the index of IL-5 in the blood was more than 2.0 ng/ml the risk of EPBA increased: OR = 2.5 (95% CI: 0.49–12.64), RR = 1.4 (95% CI: 0.61–3.34), and AR – 0.2. The indices of diagnostic value of this paraclinical test in verification of EPBA appeared to be rather modest: sensitivity – 62.5% (95% CI: 35.4–84.8), specificity – 60.0% (95% CI: 26.2–87.8), predicted value of a positive result – 71.4% (95% CI: 41.9–91.6), spread – 61.5% (95% CI: 40.6–79.8), accuracy – 61.5% (95% CI: 40.6–79.8). When IL-5 in the blood serum was >2.0 ng/ml post-test probability of EPBA increased by 11.0%, and in case of a negative result of the test it was 11.5% lower.

Eosinophil cationic protein (ECP), detected in the sputum fluid above the sediment as a marker of intensified degranulation of cells in the bronchi proved the presence of mainly eosinophil-mediated inflammation of the respiratory tract of patients with EPBA. Thus, the average content of this cytotoxic mediator in sputum of patients of group I reached 2.72 ± 0.35 ng/ml, and in the comparison group – only 1.74 ± 0.34 ng/ml ($P < 0.05$). When the content of ECP in sputum was >1.0 ng/ml the risk of eosinophil inflammation of the respiratory tract increased significantly: OR = 4.1 (95% CI: 1.5–11.2), RR = 2.0 (95% CI: 1.4–3.0), and AR – 0.34. This paraclinical index as a marker of EPBA possessed the following diagnostic value: sensitivity – 78.6% (95% CI: 63.2–89.7), specificity – 52.9% (95% CI: 35.1–70.2), spread – 55.3% (95% CI: 43.4–66.7), accuracy – 67.1% (95% CI: 55.4–77.5). With the above mentioned ECP content in the sputum post-test probability of EPBA presence increased by 12.5%, and in case of a negative result of the test it decreased by 21.2%.

In our opinion, these results facilitate the verification of EPBA as they make it possible to differentiate the choice of medicines for

the basic treatment of BA. On completion of the course of anti-inflammatory therapy the average score in the questionnaire containing clinical-spirometrical findings in groups I and II was 12.22 ± 1.34 and 14.71 ± 1.38 ($P > 0.05$) respectively, although a controlled course was found in 55.6% of patients with the eosinophil variant and only in 23.8% of the children with NPBA ($P < 0.05$). Therefore, the efficacy of the standardized (Order of the Ministry of Public Health of Ukraine № 868, 2013) basic anti-inflammatory therapy in patients of clinical group I was higher in comparison to the children with the signs of NPBA, which was illustrated by the reduced risk of inadequate control of the disease: the index of absolute risk decrease (ARD) was 31.8%, relative risk (RR) – 57.1% with necessary minimal number of patients (NMNP) – 1.75.

We have shown that application of markers of inflammatory response of the body such as eosinophils in the blood and sputum, indices NBT-test blood granulocytes, intracellular and extracellular content of cationic proteins in patients with asthma is highly sensitive to the nature of inflammation in the airways, which coincides with the literature (Wilson et al., 2000; Shirai et al., 2006; Broide, 2008; Johansson et al., 2008). For instance, we found that a severe course had a high probability of prevailing in patients with the eosinophilic phenotype of asthma compared to patients with neutrophilic inflammation of the airways. However, the literature mentions the severe course of bronchial asthma as being due to the presence of neutrophil inflammation of the bronchi (Gibson et al., 1999; Mann et al., 2006), although data on the nature of the relationship inflammation of the bronchi to the severity of the disease remain controversial (Li et al., 2003; Kikuchi et al., 2005). In particular, according to the literature, an elevated relative content of eosinophilic granulocytes in sputum of patients with eosinophil-mediated type of disease is considered a marker of efficacy of anti-inflammatory therapy, which was confirmed in our study, given the increase in the number of patients with a controlled disease course after a course of basic anti-inflammatory therapy. The effectiveness of standardized basic anti-inflammatory therapy in patients with the eosinophilic phenotype of asthma was significantly higher compared with children who showed signs of the neutrophil phenotype, emphasizing the idea that the increase in the number of neutrophils

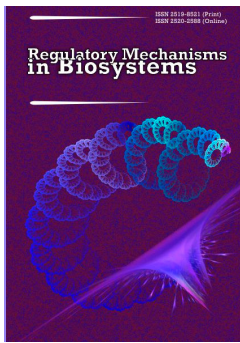
in the airways was registered in late phase allergic reactions in patients with so-called "fateful" and "nocturnal asthma", as well as severe forms of asthma (Wenzel, 2003; Kamath et al., 2005; Haldar et al., 2007).

Conclusions

The chances of developing eosinophil phenotype of asthma are greater in the following cases: with males (7.3 times), negative reserve of NBT-test of eosinophils in the sputum (6.1 times), IL-5 content in the blood serum over 2.0 ng/ml (by 2.5 times) and eosinophil cationic protein content in the sputum over 1.0 ng/ml (by 4.1 times). The highest specificity in verifying eosinophil inflammation of the bronchi occurred with the negative reserve of the NBT-test of eosinophils in the sputum (83.3%), and the highest sensitivity in its detection – the content of ECP over 1.0 ng/ml (78.6%). Consideration of the character of a local inflammatory process in the bronchi enhances the efficacy of the basic therapy of bronchial asthma by 57.1% with its eosinophil phenotype less than in every second patient.

References

- Beasley, R., Roche, W. R., Roberts, J. A., & Holgate, S. T. (1989). Cellular events in the bronchi in mild asthma and after bronchial provocation. *American Review of Respiratory Disease*, 139(3), 806–817.
- Boulet, L.-P., Boulet, V., & Milot, J. (2002). How should we quantify asthma control?: A proposal. *Chest*, 122(6), 2217–2223.
- Broide, D. H. (2008). Immunologic and inflammatory mechanisms that drive asthma progression to remodeling. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121, 560–570.
- Chatila, T. A., Li, N., Garcia-Lioret, M., Kim, H. J., & Nel, A. E. (2008). T-cell effector pathway in allergic diseases: Transcriptional mechanisms and therapeutic targets. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121, 812–823.
- Gibson, P. G., Norzila, M. Z., & Fakes, K. (1999). Pattern of airway inflammation and its determinants in children with acute severe asthma. *Pediatric Pulmonology*, 4, 261–270.
- Global Initiative for Asthma. *Global Strategy for asthma management and prevention*, 2016.
- Haldar, P., & Pavord, I. D. (2007). Noneosinophilic asthma: A distinct clinical and pathologic phenotype. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119(5), 1043–1052.
- Jacobsen, E. A., Lee, N. A., & Lee, J. J. (2014). Re-defining the unique roles for eosinophils in allergic respiratory inflammation. *Clinical and Experimental Allergy*, 44(9), 1119–1136.
- Johansson, M. W., Kell, E. A., Busse, W. W., Jarjour, N. N., & Mosher, D. F. (2008). Up-regulation and activation of eosinophil integrins in blood and airway after segmental lung antigen challenge. *The Journal of Immunology*, 180, 7622–7635.
- Kamath, A. V., Pavord, I. D., Ruparelia, P. R., & Chilvers, E. R. (2005). Is the neutrophil the key effector cell in severe asthma? *Thorax*, 60, 529–530.
- Kato, M., Suzuki, M., Hayashi, Y., & Kimura, H. (2006). Role of eosinophils and their clinical significance in allergic inflammation. *Expert Review of Clinical Immunology*, 2(1), 121–133.
- Kikuchi, S., Nagata, M., & Kikuchi, I. (2005). Association between neutrophilic and eosinophilic inflammation in patients with severe persistent asthma. *International Archives of Allergy and Immunology*, 137(Suppl. 1), 7–11.
- Li, A. M., Lex, C., Zacharasiewicz, A., & Wong, E. (2003). Cough frequency in children with asthma: Correlation with lung function, exhaled nitric oxide, and sputum eosinophil count. *Thorax*, 58, 974–978.
- Litvinova, L. S., Kolobovnikova, Y. V., Knutareva, E. N., Grigoryeva, E. S., Suvorova, E. V., Novitskiy, V. V., & Riazantseva, N. V. (2006). Cytotoxic potential of eosinophilic granulocytes in patients with eosinophilic syndrome. *Newsletter of Siberian Medicine*, 5(3), 26–30.
- Madison, J. M., & Schramm, C. M. (2000). Cationic proteins and bronchial hyperresponsiveness. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 22(5), 513–516.
- Mann, B. S., & Chung, K. F. (2006). Blood neutrophil activation markers in severe asthma: Lack of inhibition by prednisolone therapy. *Respiratory Research*, 7, 59.
- Motojima, S., Frigas, E., Loegering, D. A., & Gleich, G. J. (1989). Toxicity of eosinophil cationic proteins for guinea pig tracheal epithelium *in vitro*. *American Review of Respiratory Disease*, 139(3), 801–805.
- Novitskiy, V. V., Riazantseva, N. V., Litvinova, L. S., Kolobovnikova, Y. V., Grigoryeva, E. S., & Suvorova, E. V. (2006). The mechanisms of disorders of eosinophils and immunocytes in the formation of gross blood eosinophilia. *Newsletter of Siberian Medicine*, 2, 32–34.
- Pavord, I. D. (2013). Eosinophilic phenotypes of airway disease. *ATS Journal*, 10, 143–149.
- Ponikau, J. U., Winter, L. A., Kephart, G. M., Squillace, D. L., & Hershovitch, M. D. (2015). An immunologic test for chronic rhinosinusitis based on free intranasal eosinophilic major basic protein. *International Forum of Allergy & Rhinology*, 5(1), 28–35.
- Shirai, T., Inui, N., & Chida, K. (2006). Correlation between peripheral blood T-cell profiles and airway inflammation in atopic asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 118, 622–626.
- Wenzel, S. (2003). Mechanism of severe asthma. *Clinical and Experimental Allergy*, 33, 1622–1628.
- Wilson, N. M., Bridge, P., Spanevello, A., & Silverman, M. (2000). Induced sputum in children: Feasibility, repeatability, and relation of findings to asthma severity. *Thorax*, 55, 768–774.



Changes in the arteries in the course of hypertensive disease and extrasystoles

N. V. Didyc, O. V. Lysunets

Vinnitsa National Medical University named by N. I. Pirogov, Vinnitsa, Ukraine

Article info

Received 04.12.2016

Received in revised form
15.01.2017

Accepted 20.01.2017

*Vinnitsa National
Medical University
named by N.I. Pirogov,
Pirogov Str., 56,
Vinnitsa, 21018, Ukraine
Tel.: +38-063-629-66-45
E-mail: lysunets@mail.ru*

Didyc, N. V., & Lysunets, O. V. (2017). Changes in the arteries in the course of hypertensive disease and extrasystoles. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(1), 19–22. doi: 10.15421/021704

Our research is focused on study of changes in the intima-media vascular wall of patients suffering from hypertensive disease as well as patients suffering from hypertensive disease and coexistent extrasystole. We examined 120 patients (42 men and 78 women) between the ages 27 to 81 suffering from hypertensive disease of the II stage as defined by the Ukrainian Association of Cardiologists and extrasystoles (more than 30 episodes per hour of research) of different topography and 30 persons (13 men and 17 women) suffering from hypertensive disease of the II stage between the ages 30 to 76 without rhythm disturbance. The first clinical group was formed of 54 (45%) patients suffering from repeated supraventricular extrasystoles. The second clinical group was formed of 42 (35%) patients suffering from repeated ventricular arrhythmia. The third group was formed of 24 (20%) patients suffering from both repeated supraventricular extrasystoles and ventricular extrasystoles. The results of treatment demonstrate that the existence of repeated supraventricular extrasystoles and ventricular extrasystoles in patients suffering from hypertensive disease of the II stage in contrast to patients without arrhythmia and repeated supraventricular extrasystoles is associated with severer vascular dysfunction, which is defined by signs of rather high rigidity of the large arteries (significant reduction of original size of brachial artery diameter), severer defects of endothelium-dependant vasodilation (reduction of increment value of brachial artery diameter during the test with decompression, reduction of periodicity of registration of normal reaction and increase of paradoxical vasoconstriction of the brachial artery during the test with decompression) and significant reduction of general vasodilational potential, increase of frequency of cases with dissociation in the nature of endothelium-dependant and endothelium-independent reaction of the brachial artery. The latter changes were registered in 90 (60.0%) of examined patients, the most frequent of their variants were: 1) reduced reaction of the brachial artery for decompression + normal response in the test with nitroglycerine (29.7%) and 2) paradoxical vasoconstriction in response to decompression + reduced reaction on taking nitroglycerine (22.4%).

Keywords: arrhythmia; changes of intima-media vascular wall; hypertensive disease

Зміни артерій за гіпертонічної хвороби та екстрасистолії

Н. В. Дідик, О. В. Лисунець

Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова, Вінниця, Україна

Обстежено 120 пацієнтів із гіпертонічною хворобою II стадії та частою екстрасистолією (чинний наказ МОЗ від 03.07.2006 р. № 436) віком від 27 до 81 року. Групу контролю склали 30 хворих із гіпертонічною хворобою II стадії без будь-яких порушень серцевого ритму віком від 40 до 74 років. Згідно з топічним варіантом екстрасистолії, першу клінічну групу склали 54 (45,0%) пацієнти з частою суправентрикулярною екстрасистолією, другу – 40 (33,3%) хворих із частою шлуночковою екстрасистолією і третю – 26 (21,7%) хворих із суправентрикулярною та шлуночковою екстрасистолією. Всім хворим проводили загальноклінічне обстеження, електрокардіографічне дослідження у 12 загальноприйнятих відведеннях, добове моніторування артеріального тиску, холтеровське моніторування електрокардіографії, ехокардіографічне дослідження, соноехографію, оцінювання судинорухової функції плечової артерії. Шлуночкова та комбінована екстрасистолія у хворих із гіпертонічною хворобою II стадії, на відміну від хворих без аритмій із частою суправентрикулярною екстрасистолією, асоціюється з більш тяжкою судинною дисфункцією, тяжкими порушеннями ендотелійзалежної вазодилатації та зменшенням загального вазодилатувального потенціалу, зростанням частоти випадків із дисоціацією в характері ендотелійзалежної та ендотелійнезалежної реакції плечової артерії.

Ключові слова: серцево-судинна система; гіпертензія; аритмії; екстрасистолія

Вступ

Питання вивчення ланок патогенезу артеріальної гіпертензії та порушень серцевого ритму залишаються актуальними протягом останнього десятиріччя. Адже, відповідно до даних

Всесвітньої організації охорони здоров'я, артеріальна гіпертензія щорічно призводить до смерті понад 17 млн осіб. І, прогностично, до 2030 року цей показник сягне 24 млн осіб. Станом на 2016 рік в Україні 12 млн осіб мають артеріальну гіпертензію, що складає 46,8% серед хвороб серцево-судинної системи

дорослого населення. А 81% хворих на артеріальну гіпертензію мають неконтрольований перебіг гіпертонії (Lutaj, 2016). В Україні стандартизований показник поширеності артеріальної гіпертензії у міській популяції становить 29,6% як у чоловіків, так і у жінок. У сільській популяції поширеність артеріальної гіпертензії вища – 36,3% (серед чоловіків – 37,9%, серед жінок – 35,1%). Під час аналізу структури артеріальної гіпертензії за рівнем артеріального тиску у половини хворих виявлено артеріальну гіпертензію першого ступеня, у кожного третього хворого – артеріальну гіпертензію II ступеня, у кожного п'ятого – артеріальну гіпертензію III ступеня. Серед осіб із підвищеним артеріальним тиском знають про наявність артеріальної гіпертензії 67,8% сільських та 80,8% міських жителів. Систематично лікуються 38,3% жителів сіл і 48,8% міських мешканців. Ефективність лікування складає, відповідно, 8,1% та 18,7% (Klinichna nastanova arterialna hipertenzija onovlena ta adaptovana zasnovana na dokazach, 2012 [Clinical setting the arterial hypertension is renewed and the adapted is based on proofs]). Наявність артеріальної гіпертензії підвищує ризик загальної смертності в 4,5 раза в чоловіків та удвічі у жінок. Наявність артеріальної гіпертензії не лише збільшує ризик загальної смерті, а і скорочує середню тривалість життя у чоловіків на 9 років та у жінок на 7 років (Nakaz MOZ Ukrainy. Pro zatverdzhennja ta vprovadzhennja medyko-tehnologichnykh dokumentiv zi standartyzaciji medychnoji dopomogy pry arterialnij hipertenziji. 24.05.2012. № 384).

Патогенез артеріальної гіпертонії залучає механізми взаємодій нейроендокринної, гуморальної регуляції, об'ємів серцевого викиду та циркулюючої крові, периферичного опору судин (Hajkosseing et al., 2015; Pancholy et al., 2015; Budoff, 2016). Порушення серцевого ритму як предиктор ускладнень артеріальної гіпертонії та шемії міокарда актуальні для вивчення на сучасному етапі розвитку кардіології (Coronel et al., 2012; Ragueuzian, 2013; Gula et al., 2014). Консервативна терапія артеріальної гіпертензії, поєднаної з порушеннями серцевого ритму, проводиться поряд з оперативним лікуванням (Crotti, 2011; Piccini et al., 2012). Науковці виокремлюють роль інтими-медіа судин в патогенезі серцево-судинних захворювань (Rasputina, 2012). Зміни інтими-медіа каротидних артерій розглядаються як маркер кардіоваскулярного ризику серцево-судинних ускладнень (Michiel et al., 2014). Доведено асоціацію між товщиною інтими-медіа сонних артерій і підвищенням артеріального тиску у людей похилого віку та дітей, відповідно (Staboulis, 2012; Oishi et al., 2013). Із цієї позиції, наше дослідження поглиблює вивчення морфофункціональних змін серцево-судинної системи за гіпертонічною хворобою та екстрасистоїї (Didyk, 2009; Didyk, 2010) та має зв'язок із вивченням даної проблеми у світі (Chen et al., 2015). Мета нашого дослідження – виявити відмінності змін інтими-медіа судинної стінки у хворих як із гіпертонічною хворобою, так і з гіпертонічною хворобою, поєднаною з екстрасистоїєю.

Матеріал і методи досліджень

У дослідження включили 120 пацієнтів із гіпертонічною хворобою II стадії та частою екстрасистоїєю віком від 27 до 81 року. Серед них – 42 (35,0%) чоловіки і 78 (65,0%) жінки, співвідношення чоловіків до жінок – 1 : 1,9. Контрольну групу склали 30 осіб із гіпертонічною хворобою II стадії без будь-яких порушень серцевого ритму віком 40–74 років. Серед них 13 (43,3%) чоловіків і 17 (56,7%) жінок, співвідношення чоловіків до жінок – 1 : 1,3. Усі пацієнти проходили стаціонарне лікування у відділенні денного стаціонару кардіологічного профілю міської клінічної лікарні № 1 Вінниці. Показаннями до включення хворих у дослідження були гіпертонічна хвороба II стадії за рекомендаціями Української асоціації кардіологів (2008) та чинного наказу МОЗ України від 03.07.2006 № 436, верифікована за даними холтеровського моніторування електрокардіографії часта екстрасистоїя з симптомним пере-

бігом, яка, згідно із сучасними рекомендаціями Європейського товариства кардіологів, потребує постійної антиаритмічної терапії, відсутність протипоказань до прийому бетаадреноблокаторів і соталолу та інформаційна згода хворого взяти участь у дослідженні.

Протипоказаннями до включення в дослідження були гіпертонічна хвороба I або III стадії, серцева недостатність Па–Іб стадії за М. Д. Стражеска – В. Х. Василенко і III–IV функціональний клас за НУНА та наявність ЕхоКГ-ознак систолічної дисфункції міокарда ЛПШ (ФВ < 45%), безсимптомна екстрасистоїя та екстрасистоїя, яка, згідно із сучасними рекомендаціями Європейського товариства кардіологів, не потребує постійної антиаритмічної терапії, наявність пароксизмальної та постійної форми фібриляції передсердь, пароксизмальних тахікардій та синдрому предекзитації шлуночків, тяжкі захворювання дихальної системи та шлунково-кишкового тракту, захворювання щитоподібної залози, цукровий діабет і злоякісні утворення, зловживання алкоголем і нейропсихічні розлади, небажання хворого брати участь у дослідженні.

Усім хворим основного клінічного масиву (n = 120) як стартовий антиаритмічний препарат призначено бетаадреноблокатор біспролол у дозі 10 мг на добу. У разі недостатнього антигіпертензивного ефекту біспрололу, який оцінювали на цільовій дозі протягом 10–12 діб, додатково призначали інгібітор ангіотензину перетворювального ферменту еналаприл у дозі 20–40 мг на добу. За недостатньої антигіпертензивної та антиаритмічної ефективності терапії з двох препаратів додатково призначали S(-) амлодипін у дозі 2,5–5,0 мг на добу. Антиаритмічний ефект вважали позитивним у разі повного зникнення або зменшення добової кількості екстрасистол через 1 місяць більше ніж на 50%. У разі негативного антиаритмічного ефекту біспрололу призначали соталол у дозі 160–320 мг на добу. За позитивного антиаритмічного ефекту призначене лікування продовжували протягом 6 місяців.

Усім хворим проводили комплексне клініко-інструментальне обстеження, яке включало загальноклінічне обстеження хворого, електрокардіографічне дослідження у 12 загальноприйнятих відведеннях, добуве моніторування артеріального тиску, холтеровське моніторування електрокардіографії, ехокардіографічне дослідження у М-, В- і Д-режимах, соноехографію, оцінку судинорухової функції плечової артерії. Ендотеліальну дисфункцію судинного тонуусу вивчали, проводячи пробу з компресією плечової артерії за D. Celemajer, де післяоклюзійне зростання діаметра судини має збільшуватись на 10% порівняно з вихідним. Статистичну обробку результатів дослідження проводили за допомогою методів варіаційної статистики з використанням програм Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA).

Результати

Середня товщина інтими-медіа як у групах дослідження, так і в контрольній групі коливалась від 0,90 до 1,10 см і суттєво не перевищувала визначений для популяції норматив (<0,9 см). Аналізуючи показники судинорухової функції плечової артерії, виявляється, що у пацієнтів із гіпертонічною хворобою та частою суправентрикулярною екстрасистоїєю порівняно із хворими з гіпертонічною хворобою без аритмій реєстрували зменшення величини діаметра плечової артерії (показник dPA, P = 0,040).

У хворих із гіпертонічною хворобою та частою шлуночковою екстрасистоїєю та хворих із гіпертонічною хворобою та комбінованою екстрасистоїєю, порівняно з хворими на гіпертонічну хворобу без аритмій, ці зміни були більш вираженими. В цих групах реєстрували достовірне зменшення діаметра плечової артерії (показник dPA, P < 0,002), приросту діаметра плечової артерії на пробі з декомпресією (P < 0,024) та амплітуди дилатації плечової артерії на пробах із декомпресією та нітрогліцерином (P < 0,040). Подібні зміни зареєстровані під

час порівняння показників у групі пацієнтів із гіпертонічною хворобою та комбінованою екстрасистолією та хворих із суправентрикулярною екстрасистолією – визначали суттєве зменшення діаметра плечової артерії (показник dPA, $P = 0,037$), приросту діаметра плечової артерії на пробі з декомпресією ($P = 0,009$) та амплітуди дилатації плечової артерії на провокаційних пробах ($P = 0,046$). У пацієнтів із гіпертонічною хворобою та шлуночковою екстрасистолією порівняно з пацієнтами із суправентрикулярною екстрасистолією, спостерігали суттєве зменшення приросту діаметра плечової артерії на пробі з декомпресією ($P = 0,046$). У групі хворих із гіпертонічною хворобою та комбінованою екстрасистолією порівняно з усіма іншими групами, реєстрували суттєве збільшення індексу резистентності (показник RI, $P < 0,05$) та індексу пульсації (показник PI, $P < 0,034$). Це свідчить про суттєве зростання ригідності та погіршення еластичних властивостей великих судин у пацієнтів із гіпертонічною хворобою та комбінованою екстрасистолією.

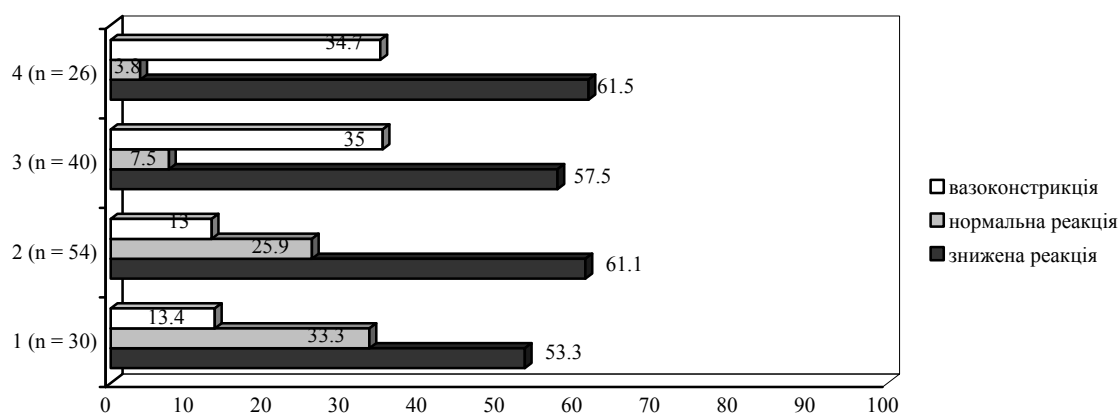


Рис. Характер реакції плечової артерії на пробі з декомпресією в різних групах хворих

Аналізуючи отримані результати реакції плечової артерії на пробі з нітрогліцериним, бачимо практично однаковий розподіл різних типів реакцій ($P > 0,05$) обстежених груп хворих. У більшості випадків (60,0–73,1% хворих) визначено зниження приросту діаметра плечової артерії на пробі з нітрогліцериним $< 20\%$ вихідної величини, в 33,3–19,2% реєстрували нормальну реакцію приросту діаметра плечової артерії на пробі з нітрогліцериним $\geq 20\%$ вихідної величини та в 5,0–7,7% – парадоксальна вазоконстрикція у відповідь на прийом нітрогліцерину.

Результати нашого дослідження продемонстрували відсутність зв'язку між порушеннями ендотелінезалежної вазодилатації плечової артерії та варіантом екстрасистолії хворих на гіпертонічну хворобу II стадії. Дисоціацію характеру ендотелінезалежної та ендотелінезалежної реакції плечової артерії спостерігали практично в половині пацієнтів із гіпертонічною хворобою без аритмій і хворих із частою суправентрикулярною екстрасистолією (40,0% і 50,0% відповідно). У пацієнтів із частою шлуночковою та комбінованою екстрасистолією подібні зміни визначені у більшості випадків (72,5% і 84,6% відповідно), що суттєво перевищило частоту реєстрації у попередніх групах ($P < 0,029$). Часта шлуночкова та комбінована екстрасистолія у хворих на гіпертонічну хворобу асоціюється із суттєвим зростанням частоти випадків із дисоціацією в характері ендотелінезалежної та ендотелінезалежної реакції плечової артерії.

Обговорення

Протягом останніх років медична спільнота неодноразово порушувала питання ролі ендотелію в розвитку серцево-судинної патології, оскільки ендотелій в організмі людини підтримує гомеостаз через регуляцію тону судин (процеси вазоконстрикції та вазодилатації), будови стінки судин (процеси

Під час проведення провокаційних проб спостерігали, що у групах пацієнтів із гіпертонічною хворобою без аритмій і з частою суправентрикулярною екстрасистолією визначали однаковий розподіл різних реакцій плечової артерії на пробу з декомпресією. У 33,3% і 25,9% випадків реєстрували нормальну, у 53,3% і 61,1% випадків – знижену реакцію, у 13,4 і 13,0% – парадоксальну вазоконстрикцію. Характер реакції плечової артерії на пробі з декомпресією в різних групах хворих принципово відрізнявся від такого у групах хворих на гіпертонічну хворобу та гіпертонічну хворобу з частою шлуночковою екстрасистолією та комбінованою екстрасистолією. У цих пацієнтів визначали суттєве зменшення частоти реєстрації нормальної реакції (7,5% і 3,8% проти 33,3% і 25,9%, відповідно, $P < 0,041$) та зростання парадоксальної вазоконстрикції (35,0% і 34,7% проти 13,4% і 13,0%, відповідно, $P < 0,041$) за практично однакової частоти реєстрації зниженої вазодилатації (57,5% і 61,5% проти 53,5% і 61,1%, відповідно) (рис.).

інгібіції та синтезу факторів фібринолізу та агрегації тромбоцитів), місцевого запалення (вироблення про- та протизапальних факторів). Дисфункція ендотелію – це дисбаланс між продукцією вазодилатаційних, ангіопротекторних, антипроліферативних факторів (простацикліну, тканинного активатора плазміногену, С-типу натрійуретичного пептиду, ендотеліального гіперполяризувального фактора) та вазоконстриктивних, тромботичних, проліферативних факторів (ендотеліну, супероксид-аніона, тромбоксану-2, інгібітора тканинного активатора плазміногену). Результати аналізу структурного ремоделювання сонних артерій і судинорухової функції плечової артерії відображали характер змін діаметра правої плечової артерії на пробі з реактивною гіперемією та нітрогліцериним свідчили про відсутність принципових відмінностей показником товщини інтими-медіа сонних артерій в обстежених групах хворих.

Виміряна товщина інтими-медіа у пацієнтів від 0,90 до 1,10 см не перевищувала визначений для популяції норматив ($< 0,9$ см). Це пояснюється включенням у дослідження хворих із неускладненим перебігом гіпертонічної хвороби. Хоча відомий нині факт – наявність тісного кореляційного зв'язку між товщиною інтими-медіа та частотою різних серцево-судинних ускладнень (Dhananjay et al., 2014). Цим пояснюється зростання товщини інтими-медіа в пацієнтів з ускладненим перебігом гіпертонічної хвороби – пацієнтів із III стадією хвороби, яких за запланованим дизайном дослідження ми не включили в розробку.

Результати нашого аналізу свідчать про відсутність суттєвих змін характеру ремоделювання сонних артерій і принципові порушення судинорухової функції плечової артерії у хворих на гіпертонічну хворобу без порушень серцевого ритму (контрольна група) і частою суправентрикулярною екстрасистолією (I клінічна група) та пацієнтів із частою шлуночковою екстрасистолією (II клінічна група) та комбінованою екстрасистолією (III клінічна група), що характеризувалось ознаками підвищеної

ригідності плечової артерії (суттєве зменшення діаметра плечової артерії за відсутності змін її відносної товщини), тяжкими порушеннями ендотеліязалежної вазодилатації (зменшення приросту діаметра плечової артерії на пробі з декомпресією) та загального вазодилатувального потенціалу (зменшення амплітуди дилатації плечової артерії на провокаційних пробах).

Отримані дані свідчать, що часта шлуночкова екстрасистоля та комбінована екстрасистоля за гіпертонічної хвороби II стадії асоціюється з тяжкими порушеннями судинорухової функції артерій (Diduc, 2016). Наявність частішої шлуночкової та комбінованої екстрасистоли у хворих на гіпертонічну хворобу II стадії асоціюється з тяжкими порушеннями ендотеліязалежної вазодилатації, що характеризується зменшенням частоти реєстрації нормальної реакції та збільшенням парадоксальної вазоконстрикції плечової артерії на пробі з декомпресією. Наші результати співставляються з літературними даними щодо ролі інтими-медіа ендотеліальної дисоціації в патогенезі серцево-судинних захворювань (Michiel et al., 2014). Залишається відкритим питання відмінності в ендотеліальній дисфункції у пацієнтів із гіпертонічною хворобою II стадії, гіпертонічною хворобою II стадії та суправентрикулярною екстрасистолією та наявністю прогностично несприятливої поєднаної надшлуночкової та шлуночкової екстрасистоли у пацієнтів із гіпертонічною хворобою II стадії.

Висновки

У хворих із гіпертонічною хворобою II стадії часта шлуночкова та поєднана (надшлуночкова та шлуночкова) екстрасистоля корелює з важкою судинною дисфункцією, що полягає, по-перше, у зростанні ригідності артерій (зменшенні показника вихідного діаметра плечової артерії), по-друге – важкому прояві порушень ендотеліязалежної вазодилатації. Воно характеризується зменшенням показника величини приросту діаметра плечової артерії на пробі з декомпресією, зменшенням частоти реєстрації нормальної реакції та збільшенням частоти парадоксальної вазоконстрикції плечової артерії на пробі з декомпресією, зменшенням загального вазодилатувального потенціалу, зростанням частоти випадків із дисоціацією характеру ендотеліязалежної та ендотеліязалежної реакції плечової артерії. Вищезгадані зміни реєстрували в 60,0% обстежених пацієнтів, при цьому найчастішими їх варіантами були, по-перше, знижена реакція плечової артерії на декомпресію та нормальна відповідь на пробу з нітроглицерином, яку реєстрували у 29,7% випадків та, по-друге, парадоксальна вазоконстрикція у відповідь на декомпресію та знижена реакція на прийом нітроглицерину, яку реєстрували у 22,4% випадків.

Результати нашого дослідження продемонстрували відсутність предикторів для виключення спільних патогенетичних механізмів розвитку судинної дисфункції та патогенетичного аритмогенезу у хворих із гіпертонічною хворобою. Цей факт потребує подальшого дослідження як із погляду патогенезу гіпертонічної хвороби, так і з погляду патогенезу екстрасистоли у розвитку аритмології.

References

Bots, M. L., Groenewegen, K. A., Anolers, T. J., Britton, A. R., Dekker, J. M., Engstrom, C., Evans, G. W., de Graaf, J., Grobbee, D. E., Hedblad, B., Hofman, A., Holeywijn, S., Ikeda, A., Kavousi, M., Kitagawa, K., Kitamura, A., Ikram, M. A., Lonn, E. M., Lorenz, M. W., Mathiesen, E. B., Nijpels, G., Okazaki, S., O'Leary, D. H., Polak, J. F., Price, S. F., Robertson, C., Rembold, C. M., Rosvall, M., Rundek, T., Salonen, J. T., Sitzer, M., Stehouwer, C. D. A., Franco, O. H., Peters S. A. E., & den Ruijter, H. M. (2014). Common carotid intima-media thickness measurements do not improve cardiovascular risk prediction in individuals with elevated blood pressure. *Hypertension*, 63, 1173–1181.

Budoff, M. (2016). Triglycerides and triglyceride-rich lipoproteins in the causal pathway of cardiovascular disease. *The American Journal of Cardiology*, 118(1), 138–145.

Chen, Y., Huang, W., Xiong, H., Zhang, R., Lu, M., Wu, D., Pirbhulal, S., & Wu, W. (2015). Relationship of short-term blood pressure variability with carotid intima-media thickness in hypertensive patients. *Biomedical Engineering Online*, 14(1), 71.

Coponel, R., Janse, M.J., Opthof, T., Wilde, A.A., & Taggart, P. (2012). Postrepolarization refractoriness in acute ischemia and after antiarrhythmic drug administration: Action potential duration is not always an index of the refractory period. *Heart Rhythm*, 9(6), 977–982.

Crotti, L. (2011). Pleiotropic mutations in ion channels: What lies behind them. *Heart Rhythm*, 8(1), 56–57.

Didyk, N. V. (2009). Osoblyvosti porushennia lipidtransportnoji funktsiji krovi i variabelnosti sertssevoogo rytmu u hvorukh na gipertonichnu khvorobu, uskladneni riznymi variantamy ekstrasystoliji [The peculiarities of disorder of the lipid transport function of blood and the variations of cardiac rhythm for the patients with hypertension disease, which is complicated by different kind of extrasystole]. *Visnyk Vinnyckoho Nacionalnoho Medychnoho Universytetu imeni M. I. Pirogova*, 13(2), 527–530 (in Ukrainian).

Didyk, N. V. (2015). Osoblyvosti struktumoho remodeliuvannia arteriji pry hipertoničnij khvoroby II stadiji ta ekstrasystoliji [Peculiarities of structural remodeling of artery in the course of hypertensive disease of the II stage and extrasystole]. *Report of Morphology*, 21, 158–161 (in Ukrainian).

Didyk, N. V. (2016). Dyslipidemija u pasienitiv iz arterialnoju hipertenzijeju i ekstrasystolijeju [Dyslipidemia in patients with arterial hypertension and extrasystoles]. *Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Medicine*, 7(2), 73–77 (in Ukrainian).

Didyk, N. V., & Ivanov, V. P. (2010). Osoblyvosti cyrkadnoji regulaciji arterialnogo tysku i rytmu sercia, chastota reestracii epizodiv ichemiji miokardu u hvorukh na gipertonichnu khvorobu z riznymi variantamy ekstrasystoliji [Features of circadian regulation and heart rhythm, registration frequency of episodes of myocardial ischemia in patients with essential hypertension and different forms of extrasystoles]. *Arterialna Gipertenzia*, 11, 29–37 (in Ukrainian).

Gula, L. J., Leong-Sit, P., & Skanes, A. C. (2014). Primary prevention pvi for atrial fibrillation weighing the risks and benefits. *Heart Rhythm*, 11(9), 1573–1574.

Karagueuzian, H. S. (2013). The nervous kidney and ventricular fibrillation: A possible gemu changer? *Heart Rhythm*, 10(10), 1531–1532.

Lutaj, M. I. (2016). Efektyvnist kombinovanoji terapiji arterialnoji gipertenziji v Ukraini: Rezultaty bagatocentrovogo doslidzhennja TRIUMF [Efficiency of the combined treatment of arterial hypertension in Ukraine: Results of the TRIUMF multicenter study group]. *Ukrainskyj Kardiologichnyj Zhurnal*, 4, 17–28 (in Ukrainian).

Oishi, E., Kgiyama, S., Ohmori, S., Seki, T., Maebuchi, D., Kohno, O., Tomimaga, M., & Iida, M. (2013). Association of systolic blood pressure with carotid intima thickness in elderly Japanese patients. *Clinical and Experimental Hypertension*, 35(4), 273–278.

Pancholy, S. B., Shantha, G. P. S., Patel, T. M., Sobotka, P. A., & Kandzari, D. E. (2015). Meta-analysis of the effect of renal denervation on blood pressure and pulse pressure in patients with resistant systemic hypertension. *The American Journal of Cardiology*, 114(6), 856–861.

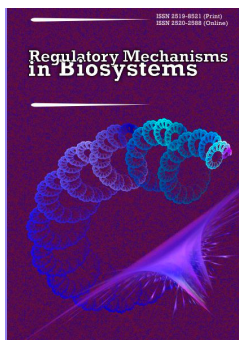
Piccini, J. P., Mi, X., Hernandez, A. F., Curtis, L. H., Dewald, T. A., Go, A. S. (2012). Pharmacotherapy in medicare beneficiaries with atrial fibrillation. *Heart Rhythm*, 9(9), 1403–1408.

Rasputina, L. V. (2012). Osoblyvosti endotelijazaleznoji vazodylatatsiji ta struktumo-funktsionalnoho remodeliuvannia sertsia u khvorykh z poiednanym perebihom khronichnoho obstruktyvnoho zakhvoriuvannia lehen ta hipertoničnoji khvoroby [Peculiarities of endothelial-dependent vasodilation and structural and functional remodeling of the heart in patients with chronic obstructive pulmonary disease and concomitant systemic hypertension]. *Ukrainian Pulmonology Journal*, 2, 55–58 (in Ukrainian).

Stabouli, S., Kotsis, V., Karagianni, C., Zakapoulos, N., Konstantopoulos, A. (2012). Blood pressure and carotid artery in intima-media thickness in children and adoles rentis: the role of obesity. *Hellenic Journal of Cardiology*, 53(1), 41–47.

Vaidya, D., Bennett, W. L., Sibley, C. T., Polak, J. F., Herrington, D. M., & Ouyang, P. (2014). Association of parity with carotid diameter and distensibility multi-ethnic study of atherosclerosis. *Hypertension*, 64, 253–258.

Werdan, R., Ebel, H., Nuding, S., Hopfner, F., Muller-Werdan, U., Stockl, G. (2015). Ivabradine in combination with beta-blockers in patients with chronic stable angina after percutaneous coronary intervention. *Advances in Therapy*, 32(2), 120–137.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(1), 23–29
doi: 10.15421/021705

Obesity: The role of desynchronization and genetic factors in mechanisms of its development

M. O. Ryznychuk*, V. P. Pishak**

**Bukovinian State Medical University, Chernivtsi, Ukraine*

***National Academy of Pedagogical Sciences, Kyiv, Ukraine*

Article info

Received 16.12.2016

Received in revised form
29.01.2017

Accepted 02.02.2017

*Bucovinian State Medical
University, Teatralnaya Sq., 2,
Chernivtsi, 58001, Ukraine
Tel.: +38-050-192-09-53
E-mail: ryznychuk@mail.ru*

*National Academy
of Pedagogical Sciences
of Ukraine, Sichovyykh Streltsiv
Str., 52-A, Kyiv, 04053, Ukraine
Tel.: +38-095-884-76-58
E-mail: pishakv@mail.ru*

Ryznychuk, M. O., & Pishak, V. P. (2017). Obesity: The role of desynchronization and genetic factors in mechanisms of its development. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8(1), 23–29. doi: 10.15421/021705

The article highlights the role of desynchronization and certain genetic factors in the development of obesity. Some pathogenetic links of obesity and the influence of melatonin on them are analyzed. Desynchronization is one of the causes of obesity as a result of dysregulatory changes in the chronoperiodic system – between suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus and secretory activity of the pineal gland. In obesity there are some changes in circadian patterns of important physiological parameters. These include acrophases of blood pressure; rhythm of hormone secretion, including insulin; electrolytes; sleep-wake cycle displaced for a period of a day, which is a deviation from the normal course. Phase discrepancies of established circadian oscillations of physiological processes arise. Preconditions of fat metabolism imbalance, particularly visfatin, apelin and vaspin – components of atherosclerotic lesions, gradually emerge. There is abundant evidence for close relationships between metabolism and circadian mechanisms. It is proved, that there is a strong direct impact of endogenous circadian rhythms on the metabolic pathways that do not depend on food intake or sleep. A potential low molecular weight of biomarkers of human circadian phases has been identified. A number of key metabolic enzymes in tissues such as the liver, adipose tissue or the pancreas are chronodependent. Desynchronization phenomena caused by genetic or environmental factors can lead to serious metabolic disorders, including obesity, insulin resistance and metabolic syndrome. Genesis of pineal removal-induced insulin resistance and reduced glucose tolerance in cells is related to the consequences of melatonin absence, which leads to abnormalities in insulin signaling pathways and reduced GLUT4 gene expression and protein content. Insulin-sensitive tissues (white and brown adipose tissue, skeletal and heart muscles) after pineal removal are characterized by a significant reduction of GLUT4 mRNA and the content of microsomal and membrane proteins, which are compensated during treatment by melatonin. Functional synergy exists between melatonin and insulin. Melatonin is able through the membrane receptors MT1 to cause rapid tyrosine phosphorylation, activate tyrosine kinase of beta subunits of insulin receptors and mobilize several intracellular stages of insulin-signaling pathway transduction. Thus, the protective effect of melatonin in cases of disturbance to the carbohydrate metabolism is manifested in the formation of circadian periodicity by modulating the expression of time genes.

Keywords: melatonin circadian mechanisms; gene; epiphysis

Ожиріння: роль десинхронізації та генетичних чинників у механізмах його розвитку

М. О. Ризничук*, В. П. Пішак**

**Буковинський державний медичний університет, Чернівці, Україна*

***Національна академія педагогічних наук, Київ, Україна*

Висвітлено роль десинхронізації та генетичних чинників у розвитку ожиріння. Проаналізовано окремі патогенетичні ланки розвитку ожиріння та вплив на них мелатоніну. Десинхронізація – одна з причин ожиріння, як наслідок дизрегуляторних зрушень у хроноперіодичній системі – між супрахіазматичними ядрами гіпоталамуса та секреторною активністю шишкоподібної залози. Існує багато доказів того, що між метаболізмом і циркадним механізмом існують тісні взаємозв'язки. Доведено сильний прямий вплив ендогенних циркадних ритмів на метаболічні шляхи, які не залежать ні від прийому їжі, ні від сну. Ідентифіковано потенційні низькомолекулярні біомаркери циркадних фаз людини. Низка ключових ферментів метаболізму в таких тканинах як печінка, жирова або тканина підшлункової залози – хронозалежні. Явища десинхронізації, спричинені генетичними чи зовнішніми чинниками, можуть спричинити серйозні метаболічні порушення: ожиріння, резистентність до інсуліну та метаболічний синдром. Генезис пінеалектоміє-індукованої резистентності до інсуліну та зниження толерантності до глюкози в клітинах пов'язаний із наслідками відсутності мелатоніну, що викликає розвиток порушень інсулінового сигнального шляху та

зниження експресії генів GLUT4 та вмісту білка. Інсулін-чутливі тканини (біла та бура жирові тканини, скелетні та серцеві м'язи) при пінеалектомії характеризуються суттєвим зниженням мРНК GLUT4, вмістом мікросомальних і мембранних білків, які компенсуються під час проведення терапії мелатоніном. Існує функціональний синергізм між мелатоніном та інсуліном. Мелатонін здатний через мембранні рецептори МТ1 викликати швидке тирозин-фосфорилування та активувати тирозинкіназу бета-субодиниці рецептора інсуліну та мобілізацію декількох внутрішньоклітинних етапів трансдукції інсулін-сигнального шляху. Захисна дія мелатоніну у разі порушення вуглеводного обміну виявляється у формуванні циркадіанного періодизму шляхом модуляції експресії часових генів.

Ключові слова: мелатонін; циркадіанний ритм; гени; епіфіз

Вплив порушень циркадіанного ритму на розвиток ожиріння

Поширеність порушень сну нині у людській популяції сягає 80–95%. Щорічно нестачу сну відчують від 1/3 до 1/2 населення, а в 10–15% людей безсоння – клінічно значуща проблема, яка різко знижує якість життя. Ожиріння межує з пандемією XXI століття, становить серйозну медико-соціальну проблему. Це основна причина інвалідизації та смертності серед осіб середнього та літнього віку в усьому світі (Hotamisligil et al., 1993; Knutson and Van Cauter, 2008). Серед причин можна виділити чинники як загального характеру (екологічні), так і індивідуальні (генетичні) особливості. Ожирінню сприяє порушення режиму харчування, надмірне вживання їжі, що порушує енергетичну рівновагу, неконтрольоване збагачення їжі жирами та вуглеводами, збіднення білками, вітамінами, макро- та мікроелементами спричиняє дисбаланс харчового раціону, а також нездоровий спосіб життя людини, недостатня фізична активність, стреси тощо (Hasler et al., 2004).

Це неповний перелік чинників, які зумовлюють низку біохімічних та фізіологічних процесів в організмі, зокрема, заміщення вуглеводного обміну жировим, зростання маси тіла внаслідок підвищення рівня ліпопротеїдів низької густини, гіперстимуляція β -клітин підшлункової залози, підвищення секреції інсуліну, розростання жирової тканини зі збільшенням об'єму вісцерального жиру на животі та у верхній половині тулуба (Van Cauter and Knutson, 2008).

Відносно недавно з'ясовано, що одна з причин ожиріння – десинхроноз, як наслідок дизрегуляторних зрушень у хроноперіодичній системі – між супрахіазматичними ядрами гіпоталамуса та секреторною активністю шишкоподібної залози (Raroport et al., 2013).

Упродовж останнього десятиліття проведено велику кількість досліджень щодо залежності ожиріння від циркадіанного ритму, які виявили чітку закономірність: навіть невеликі за тривалістю періоди депривації сну спричиняють підвищення вісцерального ожиріння, внаслідок зниження «пластичності» метаболічних процесів і розвитку резистентності до інсуліну (Knutson et al., 2007; Syromjatnikova et al., 2010).

Проведення кореляційного аналізу (Lundina et al., 2014) виявило пряму залежність тяжкості порушення циркадіанного ритму від індексу маси тіла в дітей з ожирінням ($r = 0,63$, $P = 0,003$): тобто, чим більший індекс маси тіла у дитини, тим більш виражене порушення циркадіанного ритму. Патологічні типи циркадіанного ритму достовірно частіше траплялися в дітей з ожирінням (66% проти 14%, $P < 0,05$).

Центральний водій ритму циркадіанної системи – первинне джерело інформації про ритмічність для фізіологічних процесів, розташований у супрахіазматичних ядрах (СХЯ) гіпоталамуса. Світловий сигнал синхронізує водія ритму із зовнішнім циклом «світло – темрява» через прямий ретиногіпоталамічний тракт від сітківки до СХЯ. Останні також отримують опосередковано несвітлову інформацію, наприклад, із ядер шва. Складні нейрональні шляхи з'єднують СХЯ з шишкоподібною залозою, в якій здійснюється синтез мелатоніну відповідно до циркадіанних коливань освітленості довкілля. Центральні мелатонінові рецептори (МТ1 та МТ2) розташовані переважно в СХЯ, в яких мелатонін діє за принципом зворотного негативного зв'язку.

Дослідженнями (Nishida, 2005; Peschke, 2008; Antunes et al., 2010) показано, що уведення витяжки з шишкоподібною залози

викликало розвиток гіпоглікемії, підвищення толерантності до глюкози, а також до стимуляції глікогенезу у печінці та м'язах у відповідь на ін'єкцію глюкози. Навпаки, пінеалектомія спричиняє зменшення толерантності до глюкози та гальмує глікогенез у печінці та м'язах. Метаболічні порушення, викликані відсутністю мелатоніну у пінеалектомованих тварин, охарактеризовані як діабетогенний синдром, який включає порушення толерантності до глюкози та резистентність периферичної (печінка, жирова тканина та скелетні м'язи) та центральної ланки (гіпоталамус) до інсуліну (Reiter et al., 1980; Balagopal et al., 2007; Laposky et al., 2008). Така клініка може нівелюватися уведенням мелатоніну або обмеженням годування (Hairston et al., 2010), але не заняття фізичною культурою (Brondel et al., 2010). Резистентність до інсуліну, порушення толерантності до глюкози, а також деякі зміни інших метаболічних параметрів можна виявити за фізіологічних або патофізіологічних станів, пов'язаних зі зниженням рівня мелатоніну у крові, наприклад, старіння, діабет, позмінна робота та високий рівень освітленості вночі (Everson, 2004; Picchi et al., 2006; Broussard et al., 2010). Адекватна терапія мелатоніном полегшує більшість зазначених патологічних метаболічних змін. Аналогічний метаболічний синдром спостерігається у тварин із блокадою МТ1-рецепторів (Mulder et al., 2009).

Існує багато доказів того, що між метаболізмом і циркадіанним механізмом існують тісні взаємозв'язки. Сильний прямий вплив ендогенних циркадіанних ритмів на метаболічні шляхи, які не залежать ні від прийому їжі, ні від сну (Dallmann et al., 2012). Ідентифіковано потенційні низькомолекулярні біомаркери циркадіанних фаз людини. Низка ключових ферментів метаболізму у таких тканинах як печінка, жирова або тканина підшлункової залози – хронозалежні (Knutson et al., 2008). Явища десинхронозу, спричинені генетичними або зовнішніми чинниками, можуть спричинити серйозні метаболічні порушення: ожиріння, резистентність до інсуліну та метаболічний синдром (Laposky et al., 2008; Kovac et al., 2009; Bass and Takahashi, 2010).

Провідна роль у патогенезі сімейних та більшості спорадичних випадків ожиріння належить спадковим чинникам, які визначають генетичну схильність до захворювання. Генетична схильність до метаболічних відхилень, що спричиняють ожиріння, розглядається як модифікований чинник ризику. Складність генетичного аналізу такого гетерогенного, багатфакторного захворювання як ожиріння полягає у великій кількості потенційних генів-кандидатів, здатних брати участь у формуванні генної мережі спадкової схильності до ожиріння. Участь поліморфізмів генів, схильних до формування ризику захворювання та його клінічних проявів, перебуває на початкових стадіях вивчення. Залишається нерозв'язаним питання кореляції між порушенням ліпідного обміну та наявністю поліморфних пошкоджувальних алелів у генах, продукти яких залучаються до метаболізму ліпідів і ліпопротеїдів (Klimov and Nikulcheva, 1999; Baranov et al., 2000).

Із кінця XX століття в усьому світі число осіб з ожирінням більше ніж подвоїлося (International Obesity Task Force, 2010). Це може бути зумовлено як зовнішніми чинниками (неправильним способом життя, у тому числі незбалансованим харчуванням), так і генетичними порушеннями. Чинники ризику середовища, пов'язані зі зміною характеру харчування та фізичною активністю, можуть реалізуватися тільки на тлі генетичних чинників (McCarthy, 2010).

Генетична складова в розвитку ожиріння

Підтверджено роль генетичної схильності розвитку ожиріння. Імовірність надлишкової маси тіла за наявності ожиріння у батьків становить 70–80%, хоча в загальній популяції цей показник – близько 30%. Відкрито багато генів кандидатів: гени, що кодують утворення β 3- і β 2-адренорецепторів, ген ліпопротеїнази, гени рецептора 3,4 типу меланоцитостимулювального гормону (MC3-R, MC4-R), agouti, PRAR γ , FTO, UCP2, fat-ген тощо. Нині визначено близько 1 000 генів, асоційованих з ожирінням. Усі вони вказані в міжнародній базі даних Human Genome Epidemiology Network (HuGeNet). Є форми ожиріння, зумовлені дефектом єдиного гена. Однак необхідно зазначити, що на їх частку припадає не більше 5% від усіх випадків ожиріння. У більшості гени лише зумовлюють схильність до надмірного накопичення жирової тканини за дії різних зовнішніх чинників навколишнього середовища. Причини надлишкової маси тіла полягають перш за все в особливостях стилю життя та харчової поведінки, а також у недостатній щоденній фізичній активності (Borodina, 2016).

Під час обстеження дітей і дорослих у різних популяціях виявлено понад 100 генетичних поліморфізмів, пов'язаних з ожирінням (Carlos et al., 2013). Виявлено асоціацію поліморфізму rs9939609 гена FTO зі збільшенням індексу маси тіла (ІМТ), відсутністю відчуття насичення їжею та підвищенням ризику розвитку ожиріння (Mitchell et al., 2010). Найбільш вивчений у цілому ряді етнічних груп на даний час поліморфний маркер гена KCNJ11 rs5219, в якому відбувається заміна цитозину на тимін у позиції 67, яка веде до заміни глутамінової кислоти у позиції 23 амінокислотної послідовності білка на лизин (Qiu et al., 2014). Показана асоціація цього поліморфізму з ризиком розвитку цукрового діабету (ЦД) II типу в європейців, в індоєвропейській етнічній групі, в американців європейського походження, японців та китайців (Sejkova et al., 2007). Установлено зв'язок поліморфізму rs5219 KCNJ11 гена з ризиком розвитку ЦД II типу у жителів арабських держав, а у жителів Японії та Південної Кореї – також зв'язок із ризиком розвитку артеріальної гіпертензії (Koo et al., 2007; Sakamoto et al., 2007). У турецькій популяції виявлено статистично значущий зв'язок алеля T зі зниженням рівня секреції інсуліну (Gonen et al., 2012).

Важливу роль у регуляції величини маси жирової тканини відіграє також поліморфізм гена β 3-адренорецепторів (ADRB3). Мутація в кодоні 64 гена ADRB3 зумовлює заміну триптофану на аргінін (Trp64Arg) у білку рецептора й асоціюється з надлишковою вагою. Результати досліджень із включенням 11 тис. людей свідчать про те, що мутація Trp64Arg гена ADRB3 поширена в декількох етнічних групах, пов'язана з вісцеральним ожирінням, резистентністю до інсуліну та раннім розвитком ЦД II типу (De Luis et al., 2007).

Значна кількість досліджень присвячена генам, пов'язаним з енерговитратами, а саме тим, що кодують мітохондріальні роз'єднувальні білки (UCP) та являють собою родину мембранних білків, носіїв аніонів, розташованих на внутрішній мембрані мітохондрій (Dalggaard, 2011). Найбільше вивчено поліморфізм rs659366 гена, який роз'єднує білок 2 (UCP2) – ключового регулятора енергетичного балансу. Він наявний на внутрішній мембрані мітохондрій, опосередковує вихід протонів через внутрішню мембрану шляхом роз'єднання окиснення АТФ, таким чином, зменшується синтез АТФ у мітохондріальному дихальному ланцюгу. Ефектом UCP2 може бути пригнічення стимульованої глюкозою секреції інсуліну.

Метааналіз поліморфізму rs659366 гена UCP2, із загальною кількістю обстежених 7390 (контрольна група) і 9890 (пацієнти з ожирінням), показав статистично значущу асоціацію з ожирінням у вихідців з Європи, на відміну від вихідців з Азії, де зв'язку з ожирінням не виявлено (Qian et al., 2013).

Патогенез ожиріння пов'язаний із порушеннями обмінних процесів, які можуть викликати інсулінорезистентність, пору-

шеної толерантності до глюкози та розвитку ЦД II типу. Секрецію інсуліну β -клітинами підшлункової залози регулює АТФ-залежний калієвий канал за допомогою впливу на метаболізм глюкози на рівні мембран клітин.

Роль мелатоніну у вуглеводному та жировому обміні

При ожирінні виникають певні зміни циркадианної структури важливих фізіологічних показників. Акрофази артеріального тиску, ритмів секреції гормонів, зокрема інсуліну, електротлів, циклу «сон – бадьорість» зміщуються на період доби, не властивий нормальному перебігу (Hayes et al., 2011). Виникають фазові неузгодження усталених циркадианних коливань фізіологічних процесів. Поступово формуються передумови дисбалансу обміну жирів, зокрема, вісфатину, апеліну, васпіну – компонентів атеросклеротичних пошкоджень (Hairston et al., 2010; Kessler et al., 2010; Rosa et al., 2010).

Первина ланка дезадаптаційних зрушень торкається печінки та підшлункової залози. У тканині печінки внаслідок активного адипоцитарного ліполізу збільшується рівень холестерину та тригліцеридів, а вміст вільних жирних кислот підвищується у 20–30 разів понад норму. Під час блокади інсулінових рецепторів виникає інсулінорезистентність, поглиблюється порушення транспорту глюкози в гепатоцитах, зростає надмірне засвоєння моноуглеводу гладеньком'язовими клітинами та адипоцитами (Biggi et al., 2008; Rios-Lugo et al., 2010; Rosa et al., 2010).

Стрептозототиновий діабет супроводжується гіперглікемією, зниженням толерантності до вуглеводного навантаження, гальмуванням активності глюкокінази та глюкозо-6-фосфатдегідрогенази у тканині печінки та інтенсивності антиоксидантного статусу. Попереднє уведення мелатоніну (5 мг/кг, упродовж 15 діб) запобігає зазначеним змінам (Akmali et al., 2010). На антидіабетичному ефекті мелатоніну наголошують S. Nishida (2005), E. Pesche (2008), I. Bahr et al. (2011).

У щурів лінії Goto-Kakizaki зі стрептозототиновим діабетом спостерігалася гіперінсулінемія та гіперліпідемія, зниження концентрації глюкагону й активності тирозинкінази рецептора інсуліну. У цій ситуації також установлено чіткий антидіабетичний ефект мелатоніну (Nishida, 2005; Janke et al., 2006; Bahr et al., 2011). В епіфізектомованих щурів спостерігається зниження щільності острівців Лангерганса та руйнування їх клітинних елементів (Picinato et al., 2008; Kasradze et al., 2010). Додавання мелатоніну в інкубаційне середовище гепатоцитів, отриманих від мишей із діабетом, збільшувало в них синтез лікогену, причому цей ефект усувався антагоністом мелатоніну лузіндолом (Shieh et al., 2009). Цікаво, що мелатонін полегшував приживлення трансплантата острівців Лангерганса в мишей із діабетом (Lin et al., 2009). Результати поки нечисленних досліджень на людях у принципі збігаються з експериментальними даними та підтверджують захисні антидіабетичні властивості мелатоніну.

Низькою праць Э. Б. Арушаняна и соавт. (2011, 2012) чітко обґрунтовано можливість участі шишкоподібної залози, її гормону мелатоніну в регуляції енергетичного метаболізму. Мелатонін помітно пригнічував секрецію інсуліну β -клітинами підшлункової залози *in vitro*, посилював експресію та секрецію глюкагону α -клітинами (Guzik et al., 2006; Donga et al., 2010). У щурів, яким згодовували їжу, збагачену жирами, підвищувалася концентрація в крові інсуліну, глюкози, тригліцеридів і адипонектину. Одночасне додавання до питної води мелатоніну (25 мкг/мл упродовж 11 тижнів) нормалізувало зазначені зрушення (Peschke et al., 2008; Scheer et al., 2009).

Виявлено два типи рецепторів для зв'язування мелатоніну в клітині – MT1 (ген MTNR1A) і MT2 рецептори (ген MTNR1B) на плазматичній мембрані, та рецептори на ядерній мембрані (NR1F1 і NR1F2 або ROR / RZR). Ці ж рецептори виявлені також на β -клітинах підшлункової залози (Mulder et al., 2009). Рецептори (MT1 і MT2) також розпізнають інсулін.

Зв'язування мелатоніну з МТ1-рецепторами ініціює два сигнальні шляхи. Стимуляція першого шляху викликає підвищення активності фосфатидилінозитол-3-кінази (PI3K), фосфоліпази A2 і C, АКТ/ПКВ- і ERK1/2-кінази, білка STAT3 (Piscinato et al., 2008), стимулювання другого шляху спричинює пригнічення аденілат- і гуанілатциклази (Ha et al., 2006; Molchanov, 2012). Через це кількість цАМФ і цГМФ у клітині починає зменшуватися (Ha et al., 2006). Обидва шляхи запускаються одночасно, проте за короткої стимуляції, особливо в ранковій годині, активніший перший шлях, а за тривалої стимуляції, особливо у вечірній годині або за великої дози екзогенного мелатоніну, активується другий шлях (Bespjatyh et al., 2009). Через МТ2-рецептори здійснюється циркадіанна корекція секреції інсуліну β -клітинами та глюкагону α -клітинами (Peschke, 2008). За тривалої дії мелатоніну на клітини інсуліноми в β -клітинах активуються синтез і екстерналізація МТ2-рецепторів, внаслідок чого зменшується кількість інсуліну, що секретується, оскільки ці рецептори пов'язані винятково з аденілатциклазним шляхом (Piscinato et al., 2008; Mulder et al., 2009; Molchanov, 2012).

Мелатонін здатний протистояти виснаженню β -клітин на ранніх етапах розвитку метаболічного синдрому, протидіє гіперсекреції інсуліну, знижує його до базального рівня. Це означає, що використання мелатоніну може зберегти повноцінну активність β -клітин у пацієнта після масового пошкодження токсичними агентами. На відміну від усіх інших гормонів для мелатоніну не виявлено негативного зворотного зв'язку, він позитивно діє як на клітини епіфіза, так і на інші клітини організму. Основний регулятор його секреції – характер освітленості. Таким чином, захисна дія мелатоніну за порушення вуглеводного обміну виявляється у формуванні циркадіанного періодизму шляхом модуляції експресії часових генів (Szosland, 2010).

У нормі інсулінозалежна активація фосфоінозитольного шляху супроводжується стимуляцією росту судин, збільшенням числа функціонуючих капілярів, інтенсифікацією кровотоку та транслокацією транспортного білка ГЛЮТ-4, що зумовлює швидке захоплення глюкози (Borodina et al., 2016). При МС або інсулінорезистентності цей сигнальний шлях блокується. Інший шлях інсулінозалежної активації пов'язаний із запуском позаклітинних кіназ ERK1/МАРК і ERK2/МАРК, які активують прозапальний процес, що викликає зростання та проліферацію гладеньком'язових клітин. МАР-кіназний шлях внаслідок секреції ендотеліну-1 спричинює звуження судин. Сам ендотелін-1 чутливий до поглинання глюкози тканиною скелетної мускулатури та індукує резистентність до глюкози периферичних тканин. За гіперінсулінемії розвиваються атеросклеротичні ускладнення внаслідок гіперстимуляції фосфоінозитольного шляху.

Перебіг як клінічного, так і експериментального діабету супроводжується залученням у патологічний процес генетичної компоненти. На β -клітинах підшлункової залози мишей із нокаутом гена МР1 порушується метаболізм глюкози та підвищується резистентність до інсуліну, що рівноцінно ЦД II типу в людини (Jia et al., 2007). При цьому зростає синтез мелатоніну в шишкоподібній залозі та індукуються часові гени Per1 і Bmal1 (Hotamisligil et al., 1993).

Генезис пінеалектоміє-індукованої резистентності до інсуліну та зниження толерантності до глюкози в клітинах пов'язані з наслідками відсутності мелатоніну, що викликає розвиток порушень в інсуліновому сигнальному шляху та зниження експресії генів GLUT4 і вмісту білка. Інсулін-чутливі тканини (біла та бура жирові тканини, скелетні та серцевий м'язи) за пінеалектомії характеризуються суттєвішим зниженням мРНК GLUT4, вмістом мікосомальних і мембранних білків, які компенсуються під час проведення терапії мелатоніном (Hotamisligil et al., 1993; Erikstrup et al., 2006; McCarthy, 2010). Існує функціональний синергізм між мелатоніном та інсуліном. Мелатонін здатний через мембранні рецептори МТ1 викликати швидке тирозин-фосфорилування й активувати тирозинкіназу

бета-субодиниці рецептора інсуліну та мобілізацію декількох внутрішньоклітинних етапів трансдукції інсулін-сигнального шляху (фосфорилування тирозину IRS-1, IRS-1/PI(3)-kinase і IRS-1/SHP-2 асоціації, а також серин, МАР-кінази та STAT3 фосфорилування) (Yang et al., 2005; Graham et al., 2006).

SRBP-4 – білок із родини ліпокаліну, який зв'язує та транспортує ретинол у сироватці крові, безпосередньо пов'язаний із вісцеральним ожирінням і резистентністю до інсуліну. SRBP-4 секретується, в основному, у печінці та адипоцитах (Aeberli et al., 2007; Wolf, 2007). У печінці цей білок, зв'язаний із транстиретином, концентрація якого зменшується за гострої інфекції та стресу. У досліджах на мишах показано, що SRBP-4, який вивільнився з адипоцитів, викликає резистентність до інсуліну в печінці та скелетних м'язах (Wolf, 2007).

Доведено (Graham et al., 2006) асоціацію між SRBP-4 і ожирінням, зокрема, вісцерального типу (Yang et al., 2005), а також резистентність до інсуліну та розвиток діабету типу II (Janke et al., 2006; Takashima et al., 2006). У дорослих японців із порушенням толерантності до глюкози, концентрація SRBP-4 не корелювала з індексом маси тіла, але корелювала з підвищеними концентраціями тригліцеридів (Knutson et al., 2007; Srivastava and Krishna, 2010). Отже, концентрація SRBP-4 тісніше пов'язана з аномальними рівнями ліпідів при ожирінні, а не тільки ожирінням як нозологічним захворюванням (Erikstrup et al., 2006). Іншими дослідниками доведено зв'язок між концентрацією SRBP-4 та поширеністю ожиріння та метаболічного синдрому, незалежно від концентрації сироваткового ретинолу (Zheng et al., 1999; Yang et al., 2005).

Депривація сну та ожиріння

Жирова тканина синтезує речовини, що впливають на вуглеводний обмін, зокрема адипокіни, адипонектин, лептин, адипсин, вісфатин, апелін, васпін. Вони володіють чутливістю до інсуліну, мають антиатеросклеротичний і протизапальний ефекти (Arita et al., 1999; Ouchi et al., 1999). Ці речовини несуть інформацію від жирової тканини до інсуліночутливих тканин про запас поживних речовин в організмі.

Більшість гормонів, що регулюють апетит, також мають циркадіанний ритм секреції, пов'язаний із циклом «сон – неспання». Лептин «інформує» клітини організму про стан жирового обміну та масу тіла. Впливаючи на гіпоталамус, він пригнічує апетит. У фізіологічних концентраціях лептин гальмує секрецію інсуліну, а у великих концентраціях – тромбоз та інсулінорезистентність. Використання лептину зменшує масу тіла (Palou-Oliver et al., 2006), постійно підвищений рівень лептину та резистину в крові може призвести до розвитку кардіоміопатії (Bobbert et al., 2012).

Адипонектин зменшує окиснювальний стрес, запалення, тромбоутворення, але ініціює інсулінорезистентність і пошкодження судин (Lee et al., 2011). Зниження рівня адипонектину в крові виявлено в людей з ожирінням й у пацієнтів із симптомами ЦД II типу (Hotta et al., 2000). Вважають, що адипонектин протидіє розвитку метаболічного синдрому (МС) (Cui et al., 2011). Очевидно, що вісфатин, апелін, васпін жирової тканини відіграють провідну роль в атеросклеротичних пошкодженнях при ожирінні (Palios et al., 2012).

Лептин і грелін мають протилежний вплив на центри голоду та насичення в гіпоталамусі, через взаємодію з нейропептидами, що контролюють споживання їжі (нейропептид Y, агутиподібний білок, меланокортин тощо). Відповідаючи, таким чином, за регуляцію маси тіла, лептин впливає на запаси жиру в організмі через центральні механізми, його рівні збільшуються після їжі та в нічний час, що зумовлює зниження апетиту. Грелін продукується, в основному, P/D1-клітинами слизової оболонки фундального відділу шлунка, стимулює апетит і циркулює в неактивній формі, стає біологічно активним у відповідь на голодування. Під час сну відбувається підвищення загального греліну зі зменшенням співвідношення

загальний / активний грелін порівняно з неспанням. За вимушеного зміщення добового ритму в дорослих спостерігається зниження концентрації лептину, підвищення постпрандіальної глікемії, інсуліну, середнього артеріального тиску та зміна ритму секреції кортизолу з вищими піками перед сном і після пробудження (Scheer et al., 2009).

Люди, які працюють за змінним графіком, мають вищу захворюваність на цукровий діабет, ожиріння та серцево-судинну патологію (Bass and Takahashi, 2010). Також доказаний зв'язок між зміною експресії clock-генів і цукровим діабетом (Woon et al., 2007), ожирінням і метаболічним синдромом (Scott et al., 2008), хоча патогенетичні механізми, що лежать в основі цих асоціацій, до кінця не вивчені.

У багатьох країнах світу дедалі гострішою стає проблема порушень сну, яка часто супроводжується ростом захворюваності на ожиріння. Прогрес у соціально-економічному розвитку, поява штучного освітлення на початку минулого століття, загальна комп'ютеризація, телебачення та інші електронні засоби масової інформації викликали зміни способу життя людей і скорочення тривалості сну.

У промислово розвинених країнах упродовж останніх десятиліть середній час сну зменшився. Якщо в 1960 році його добова тривалість у середньому була вісім–дев'ять годин, то в 1995 році вона скоротилася до семи годин. Нині майже третина дорослого населення планети спить менше шести годин на добу. Епідеміологічними дослідженнями показано, що зниження тривалості сну спричиняє підвищення індексу маси тіла, і в кінцевому результаті викликає ожиріння (Hasler et al., 2004). Робота в нічні зміни часто супроводжується порушенням нормального добового режиму сну та зниженням його якості (Boivin et al., 2007), і є одним із чинників розвитку ожиріння, ЦД II типу та метаболічного синдрому (Karlsson et al., 2001; Szosland, 2010).

Причинний зв'язок між порушенням сну та метаболічними зрушеннями доведено низкою лабораторних досліджень (Knutson et al., 2008; Van Cauter and Knutson, 2008). У разі зменшення тривалості сну спостерігається підвищений апетит, зростають рівні лептину та греліну в крові та знижується толерантність до глюкози, що теж сприяє розвитку ожиріння (Knutson and Knutson, 2008). Цікаво зазначити, що рівні у крові адипокінових гормонів корелюють із тривалістю сну (Mühlbauer et al., 2009) та спричиняють накопичення білого жиру (Barclay et al., 2012). Отже, втрата сну або погана його якість можуть викликати дисліпідемію та підвищене накопичення жиру в черевній порожнині людей (Karlsson et al., 2001; Salgado-Delgado et al., 2010; Dallman et al., 2012).

У період з 1960 по 2000 рік середня тривалість нічного сну скоротилася на 1,5–2,0 години (Hjertstand et al., 2006). За даними зарубіжних джерел, 35% дорослого населення сплять менше семи годин на добу, а одна четверта частина дорослого та велика частина дітей і підлітків має проблеми зі сном. На сучасному етапі не існує жодного об'єктивного методу для визначення тривалості сну, достатнього для дорослих. Проте тривалість сну, в середньому, 7,5 години на добу вважається оптимальною для дорослого, за відсутності сонливості в денний час (Grandner et al., 2010; Centers for Disease Control and Prevention, 2011). За даними метааналізу вивчення тривалості сну, можна дійти висновку про підвищений ризик розвитку ожиріння в осіб із недостатньою тривалістю сну як серед дорослих, так і серед дітей. Скорочення тривалості сну на одну годину асоційоване зі збільшенням індексу маси тіла (ІМТ) на 0,35 кг/м² (Carrusio et al., 2008).

За даними дослідження the Whitehall II Study, існують достовірні асоціації між короткою тривалістю сну (5 год), індексом маси тіла, окружністю талії, а також підвищеним ризиком розвитку ожиріння (St-Onge et al., 2011). Підтверджено гіпотезу про те, що скорочення сну спричинює збільшення маси тіла з плином часу (Hasler et al., 2004; Gunderson et al., 2008).

Оскільки більшість епідеміологічних досліджень підтвердили наявність асоціацій між скороченням тривалості сну та

надмірною масою тіла, наразі триває інтенсивне вивчення кореляційних зв'язків між сном і ожирінням. Усе більше накопичується даних, які підтверджують те, що скорочення та погіршення якості сну можуть викликати порушення метаболізму, в тому числі жирового обміну.

Яскраві приклади поєднання ендокринно-обмінних, мотиваційних порушень і порушень сну – синдром нічного відчуття голоду, а також сезонні афективні розлади. Харчова поведінка в пацієнтів із синдромом нічного відчуття голоду представлена переїданням із порушенням добового ритму прийому їжі, що в клініці проявляється триадою симптомів: ранкова анорексія, вечірня або нічна булімія та гіперсомнія (підвищена денна сонливість, збільшення тривалості нічного сну за відсутності «освіжаючого» ефекту сну). Відчуття насичення при цьому синдромі виникає дуже повільно, при цьому хворі не можуть заснути, не з'ївши великої кількості їжі, а фізична активність у цих пацієнтів мінімальна упродовж усього дня. Порушення сну та харчової поведінки можуть спостерігатися в межах сезонних афективних розладів (САР), головний клінічний симптом яких – депресія, яка виникає винятково в «темну» пору року, що поєднується з булімією та гіперсомнією. У світлий період року в пацієнтів із САР не виявляється ніяких порушень, крім ожиріння (Voznesenskaja, 2009).

Депривація сну – порушення або повна відсутність задоволення потреби уві сні. Це може виникнути як результат розладів сну, усвідомленого вибору або примусово, наприклад в експерименті. Показано зниження нічної та підвищення денної концентрації греліну в дослідженнях з обмеженням часу сну у здорових добровольців, що сприяє підвищенню апетиту, гіперфагії, збільшуючи ризик розвитку ожиріння в майбутньому (Spiegel et al., 2004). Ці дані узгоджуються з дослідженнями Taheri et al. (2004), які виявили зниження концентрації лептину, підвищення греліну в пацієнтів із недостатнім сном.

Значущу роль у підтриманні енергетичного балансу відіграють тиреоїдні гормони, які підвищують температуру тіла та рівень основного обміну, посилюють ліполіз і гальмують ліпогенез. Також повідомляється, що втрата сну впливає на функцію гіпоталамо-гіпофізарно-тиреоїдної осі. Гостра депривація сну пов'язана з підвищенням ТТГ, а також рівнем зв'язаного Т₃ і зв'язаного Т₄ у вечірні години (Gary et al., 1996). Kessler et al. (2010) показали, що часткове обмеження часу сну (до 5,5 годин упродовж 14 днів) у здорових пацієнтів середнього віку супроводжувалося помірним, але статистично значущим зниженням рівня ТТГ і вільного Т₄ у жінок у ранкові години. Ці результати дозволяють припустити наявність зв'язків між метаболічними та психічними змінами в пацієнтів із порушеннями сну з тиреоїдною функцією, що вимагають подальшого вивчення.

Низка праць продемонструвала зв'язок між гострою втратою сну та порушенням імпульсної та нічної секреції соматотропного гормону, що вважається важливим ліполітичним чинником (Weibel et al., 1997).

Експерименти, в яких вивчено вплив тривалості сну на енергетичний обмін, нечисленні. Jonge et al. (2012) оцінюючи основний обмін, установили, що скорочення часу сну та низька його ефективність асоційовані з підвищенням витрати енергії, вільного кортизолу та дофаміну в сечі, а низька ефективність сну – з підвищенням дихального коефіцієнта. Таким чином, високий дихальний коефіцієнт – чинник, який спричинює накопичення жирової маси.

Зміни режиму харчування у поєднанні з дизритмією добового прийому їжі переважають у пацієнтів з ожирінням. За умов десинхронозу виникають розлади, які спричиняють розвиток метаболічного синдрому (Rapoport et al., 2013).

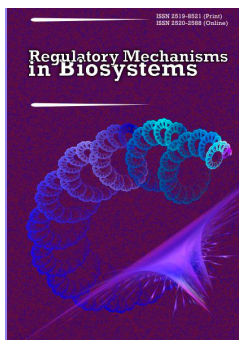
Висновок

Десинхроноз – одна з причин ожиріння, наслідок дизрегуляторних зрушень у хронопериодичній системі – між супрагізматичними ядрами гіпоталамуса та секреторною активністю шишкоподібної залози.

References

- Aeberli, I., Biebinger, R., Lehmann, R., L'allemand, D., Spinass, G. A., & Zimmermann, M. B. (2007). Serum retinol-binding protein 4 concentration and its ratio to serum retinol are associated with obesity and metabolic syndrome components in children. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 92(11), 4359–4365.
- Akmali, M., Ahmadi, R., & Vessal, M. (2010). Pre- and post-treatment of streptozotocin administered rats with melatonin: Effects on some hepatic enzymes of carbohydrate metabolism. *Archives of Iranian Medicine*, 13(2), 105–110.
- Antunes, L. C., Levandovski, R., Dantas, G., Caumo, W., & Hidalgo, M. P. (2010). Obesity and shift work: Chronobiological aspects. *Nutrition Research Reviews*, 23(1), 155–168.
- Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Takahashi, M., Maeda, K., & Miyagawa, J. (1999). Paradoxical decrease of an adipose specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 257(1), 79–83.
- Bahr, I., Muhlbauer, E., Schulte, H., & Peschke, E. (2011). Melatonin stimulates glucagon secretion *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Pineal Research*, 50, 336–344.
- Balagopal, P., Graham, T. E., Kahn, B. B., Altomare, A., Funanage, V., & George, D. (2007). Reduction of elevated serum retinol binding protein in obese children by lifestyle intervention: Association with subclinical inflammation. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 92(5), 1971–1974.
- Baranov, V. S., Baranova, E. V., Ivashchenko, T. E., & Aseev, M. V. (2000). Genom cheloveka i geny predispozitsionnosti: Vvedenie v prediktivnyuyu meditsinu [The human genome and susceptibility genes: An introduction to predictive medicine]. Inter-Medika, Saint Petersburg (in Russian).
- Barclay, J. L., Husse, J., Bode, B., Naujokat, N., Meyer-Kovac, J., Schmid, S. M., Lehnert, H., & Oster, H. (2012). Circadian desynchrony promotes metabolic disruption in a mouse model of shiftwork. *PLoS ONE*, 7(5), e37150.
- Bass, J., & Takahashi, J. S. (2010). Circadian integration of metabolism and energetics. *Science*, 330(6009), 1349–1354.
- Bespiatyh, A. J., Brodskij, V. J., Burlakova, O. V., Golichenkov, V. A., Voznesenskaja, L. A., Kolesnikov, D. B., Molchanov, A. J., & Rapoport, S. I. (2009). Melatonin: Teorija i praktika [Melatonin: Theory and Practice]. Medpraktika-M, Moscow (in Russian).
- Biggi, N., Consonni, D., Galluzzo, V., Sogliani, M., & Costa, G. (2008). Metabolic syndrome in permanent night workers. *Chronobiology International*, 25(2), 443–454.
- Bobbert, P., Jenke, A., Bobbert, T., Kuhl, U., Lassner, D., & Scheibenbogen, C. (2012). High leptin and resistin expression in chronic heart failure: Adverse outcome in patients with dilated and inflammatory cardiomyopathy. *European Journal of Heart Failure*, 14(11), 1265–1275.
- Boivin, D. B., Tremblay, G. M., & James, F. O. (2007). Working on atypical schedules. *Sleep Medicine*, 8(6), 578–589.
- Borodina, C. B., Gapparova, K. M., Zajnudinov, Z. M., & Grigor'jan, O. N. (2016). Geneticheskie prediktory razvitiya ozhirenija [Genetic predictors of obesity]. *Ozhirenie i Metabolizm*, 13(2), 7–13 (in Russian).
- Brondel, L., Romer, M. A., Nougues, P. M., Touyarou, P., & Davenne, D. (2010). Acute partial sleep deprivation increases food intake in healthy men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91(6), 1550–1559.
- Broussard, J., & Brady, M. J. (2010). The impact of sleep disturbances on adipocyte function and lipid metabolism. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 24(5), 763–773.
- Cappuccio, F. P., Taggart, F. M., Kandala, N. B., Currie, A., Peile, E., Stranges, S., & Miller, M. A. (2008). Meta-analysis of short sleep duration and obesity in children and adults. *Sleep*, 31(5), 619–626.
- Carlos, F., Silva-Nunes, C. J., Flores, O., Brito, M., Doria, G., Veiga, L., & Baptista, P. V. (2013). Association of FTO and PPARG polymorphisms with obesity in Portuguese women. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*, 6, 241–245.
- Cejkova, P., Novota, P., Cerna, M., Kolostova, K., Novakova, D., Kucera, P., Novak, J., Andel, M., Weber, P., & Zdárský, E. (2007). KCNJ11 E23K polymorphism and diabetes mellitus with adult onset in Czech patients. *Folia Biologica (Praha)*, 53(5), 173–175.
- Cui, J., Panse, S., & Falkner, B. (2011). The role of adiponectin in metabolic and vascular disease: A review. *Clinical Nephrology*, 75(1), 26–33.
- Dalgaard, L. T. (2011). Genetic variance in uncoupling protein 2 in relation to obesity, type 2 diabetes, and related metabolic traits: Focus on the functional –866G>A promoter variant (rs659366). *Journal of Obesity*, 2011, 340241.
- Dallmann, R., Viola, A. U., Tarokh, L., Cajochen, C., & Brown, S. A. (2012). The human circadian metabolome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(7), 2625–2629.
- De Luis, D., Gonzalez Sagrado, M., Aller, R., Izaola, O., & Conde, R. (2007). Influence of the Trp64Arg polymorphism in the beta 3 adrenoceptor gene on insulin resistance, adipocytokine response, and weight loss secondary to lifestyle modification in obese patients. *European Journal of Internal Medicine*, 18(8), 587–592.
- Donga, E., van Dijk, M., van Dijk, J. G., Biermasz, N. R., Lammers, G. J., van Kralingen, K. W., Corssmit, E. P., & Romijn, J. A. (2010). A single night of partial sleep deprivation induces insulin resistance in multiple metabolic pathways in healthy subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 95(6), 2963–2968.
- Erikstrup, C., Mortensen, O. H., & Pedersen, B. K. (2006). Retinol-binding protein 4 and insulin resistance. *The New England Journal of Medicine*, 355(13), 1393–1394.
- Everson, C. A., Crowley, W. R. (2004). Reductions in circulating anabolic hormones induced by sustained sleep deprivation in rats. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, 286(6), 1060–1070.
- Gary, K. A., Winokur, A., Douglas, S. D., Kapoor, S., Zaugg, L., & Dinges, D. F. (1996). Total sleep deprivation and the thyroid axis: Effects of sleep and waking activity. *Aviation Space and Environmental Medicine*, 67(6), 513–519.
- Gonen, M. S., Arikoglu, H., Erkoc Kaya, D., Ozdemir, H., Ipekci, S. H., Arslan, A., Kayis, S. A., & Gogebakan, B. (2012). Effects of single nucleotide polymorphisms in K(ATP) channel genes on type 2 diabetes in a Turkish population. *Archives of Medical Research*, 43(4), 317–323.
- Graham, T. E., Yang, Q., Blüher, M., Hammarstedt, A., Ciaraldi, T. P., Henry, R. R., Wason, C. J., Oberbach, A., Jansson, P. A., Smith, U., & Kahn, B. B. (2006). Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *New England Journal of Medicine*, 354(24), 2552–2563.
- Grandner, M. A., Hale, L., Moore, M., & Patel, N. P. (2010). Mortality associated with short sleep duration: the evidence, the possible mechanisms, and the future. *Sleep Medicine Reviews*, 14(3), 191–203.
- Gundersen, E. P., Rifas-Shiman, S. L., Oken, E., Rich-Edwards, J. W., Kleinman, K. P., Taveras, E. M., & Gillman, M. W. (2008). Association of fewer hours of sleep at 6 months postpartum with substantial weight retention at 1 year postpartum. *American Journal of Epidemiology*, 167(2), 178–187.
- Guzik, T. J., Mangalat, D., & Korbut, R. (2006). Adipocytokines – novel link between inflammation and vascular function? *Journal of Physiology and Pharmacology*, 57(4), 505–528.
- Ha, E., Yim, S. V., Chung, J. H., Yoon, K. S., Kang, I., Cho, Y. H., & Baik, H. H. (2006). Melatonin stimulates glucose transport via insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase pathway in C₂C₁₂ murine skeletal muscle cells. *Journal of Pineal Research*, 41(1), 67–72.
- Hairston, K. G., Bryer-Ash, M., Norris, J. M., Haffner, S., Bowden, D. W., & Wagenknecht, L. E. (2010). Sleep duration and five-year abdominal fat accumulation in a minority cohort: The IRAS family study. *Sleep*, 33(3), 289–295.
- Hasler, G., Buysse, D. J., Klaghofer, R., Gamma, A., Ajdacic, V., Eich, D., Rössler, W., & Angst, J. (2004). The association between short sleep duration and obesity in young adults: A 13-year prospective study. *Sleep*, 27(4), 661–666.
- Hayes, A. L., Xu, F., Babineau, D., & Patel, S. R. (2011). Sleep duration and circulating adipokine levels. *Sleep*, 34(2), 147–152.
- Hiestand, D., Britz, P., Goldman, M., & Phillips B. (2006). Prevalence of symptoms and risk of sleep apnea in the US population. Results from the National Sleep Foundation Sleep in America 2005 poll. *Chest*, 130, 780–786.
- Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S., & Spiegelman, B. M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor- α : Direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 259(5091), 87–91.
- Hotta, K., Funahashi, T., Arita, Y., Takahashi, M., Matsuda, M., & Okamoto, Y. (2000). Plasma concentrations of a novel adipose-specific protein adiponectin in type 2 diabetic patients. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 20(6), 1595–1599.
- Janke, J., Engeli, S., Boschmann, M., Adams, F., Böhnke, J., Luft, F. C., Sharma, A. M., & Jordan, J. (2006). Retinol-binding protein 4 in human obesity. *Diabetes*, 55(10), 2805–2810.
- Jia, W., Wu, H., Bao, Y., Wang, C., Lu, J., Zhu, J., & Xiang, K. (2007). Association of serum retinol-binding protein 4 and visceral adiposity in Chinese subjects with and without type 2 diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 92(8), 3224–3229.
- Jonge, L., Zhao, X., Mattingly, M. S., Zuber, S. M., Piaggi, P., Csako, G., & Cizza, G. (2012). Poor sleep quality and sleep apnea are associated with higher resting energy expenditure in obese individuals with short sleep duration. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 97(8), 2881–2889.
- Karlsson, B., Knutsson, A., & Lindahl, B. (2001). Is there an association between shift work and having a metabolic syndrome? Results from a population based study of 27,485 people. *Occupational and Environmental Medicine*, 58(11), 747–752.
- Kasradze, D., Tavartkiladze, A., Kasradze, M., & Nozadze, P. (2010). The study of melatonin protective activity on pancreatic beta-cells under the condition of alloxan-induced diabetes during aging. *Georgian Medical News*, 189, 56–63.
- Kessler, L., Nedelcheva, A., Imperial, J., & Penev, P. D. (2010). Changes in Serum TSH and Free T4 during Human Sleep Restriction. *Sleep*, 33(8), 1115–1118.

- Klimov, A. N., & Nikulcheva, N. G. (1999). Obmen lipidov i lipoproteidov i ego narusheniya [Exchange of lipids and lipoproteins and its disorders]. Piter Kom, Saint Petersburg (in Russian).
- Knutson, K. L., & Van Cauter, E. (2008). Associations between sleep loss and increased risk of obesity and diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1129, 287–304.
- Knutson, K. L., Spiegel, K., Penev, P., & Van Cauter, E. (2007). The metabolic consequences of sleep deprivation. *Sleep Medicine Reviews*, 11(3), 163–178.
- Koo, B. K., Cho, Y. M., Park, B. L., Cheong, H. S., Shin, H. D., Jang, H. C., Kim, S. Y., Lee, H. K., & Park, K. S. (2007). Polymorphisms of KCNJ11 (Kir6.2 gene) are associated with Type 2 diabetes and hypertension in the Korean population. *Diabetic Medicine*, 24, 178–186.
- Kovac, J., Husse, J., & Oster, H. (2009). A time to fast, a time to feast: The crosstalk between metabolism and the circadian clock. *Molecules and Cells*, 28(2), 75–80.
- Laposky, A. D., Bass, J., Kohsaka, A., & Turek, F. W. (2008). Sleep and circadian rhythms: Key components in the regulation of energy metabolism. *FEBS Letters*, 582(1), 142–151.
- Lee, E. B., Warmann, G., Dhir, R., & Ahima, R. S. (2011). Metabolic dysfunction associated with adiponectin deficiency enhances kainic-acid-induced seizure severity. *Journal of Neuroscience*, 31(40), 14361–14366.
- Lin, G. J., Huang, S. H., Huang, D. J., Chen, Y. W., Chien, M. W., Chia, W. T., Chang, D. M., & Sytwa, H. K. (2009). Melatonin prolongs islet graft survival in diabetic NOD mice. *Journal of Pineal Research*, 47, 284–292.
- Lundina, G. V., Mehrjakov, S. A., & Tot'mjanina, E. V. (2014). Narusheniya cirkadiannykh ritmov u detej s ozhireniem [Disturbances of circadian rhythms in children with obesity]. *Uchenye Zapiski Orlovskogo Gosudarstvennogo Universiteta*, 63, 46–47 (in Russian).
- McCarthy, M. I. (2010). Genomics, type 2 diabetes, and obesity. *The New England Journal of Medicine*, 363(24), 2339–2350.
- Mitchell, J. A., Church, T. S., Rankinen, T., Earnest, C. P., Sui, X., & Blair, S. N. (2010). FTO genotype and the weight loss benefits of moderate intensity exercise. *Obesity*, 18(3), 641–643.
- Molchanov, A. J. (2012). Molekuljarnaja genetika i biohimija melatonina [Molecular genetics and biochemistry of melatonin]. In: Melatonin: perspektivy primeneniya v klinike. IMA-PreSS, Moscow (in Russian).
- Mühlbauer, E., Gross, E., Labucay, K., Wolgast, S., & Peschke, E. (2009). Loss of melatonin signalling and its impact on circadian rhythms in mouse organs regulating blood glucose. *European Journal of Pharmacology*, 606, 61–71.
- Mulder, H., Nagorny, C. L., Lyssenko, V., & Groop, L. (2009). Melatonin receptors in pancreatic islets: Good morning to a novel type 2 diabetes gene. *Diabetologia*, 52(7), 1240–1249.
- Nishida, S. (2005). Metabolic effects of melatonin on oxidative stress and diabetes mellitus. *Endocrine*, 27(2), 131–136.
- Ouchi, N., Kihara, S., Arita, Y., Maeda, K., Kuriyama, H., Okamoto, Y., Hotta, K., Nishida, M., Takahashi, M., Nakamura, T., Yamashita, S., Funahashi, T., & Matsuzawa, Y. (1999). Novel modulator for endothelial adhesion molecules: Adipocyt-derived plasma adiponectin. *Circulation*, 100(25), 2473–2476.
- Palios, J., Kadoglou, N. P. E., & Lampropoulos, S. (2012). The pathophysiology of HIV/HAART-related metabolic syndrome leading to cardiovascular disorders: The emerging role of adipokines. *Experimental Diabetes Research*, 2012, 103063.
- Palou-Oliver, A., Piko-Pou, K., Oliver-Vara, P., Sanches Roig, H., & Miral'es-Borrachina, O. (2006). Primeneniya leptina dlja predotvrashheniya izbytochnoj massy tela i kompozicii, soderzhashhie leptin [Use of leptin for the prevention of overweight and compositions containing leptin]. Patent RF N2450825 (in Russian).
- Peschke, E. (2008). Melatonin, endocrine pancreas and diabetes. *Journal of Pineal Research*, 44(1), 26–40.
- Peschke, E., Wolgast, S., Bazwinsky, I., Pönicke, K., & Mühlbauer, E. (2008). Increased melatonin synthesis in pineal glands of rats in streptozotocin induced type 1 diabetes. *Journal of Pineal Research*, 45(4), 439–448.
- Picchi, A., Gao, X., Belmadani, S., Potter, B. J., Focardi, M., Chilian, W. M., & Zhang, C. (2006). Tumor necrosis factor- α induces endothelial dysfunction in the prediabetic metabolic syndrome. *Circulation Research*, 99(1), 69–77.
- Picinato, M. C., Hirata, A. E., Cipolla-Neto, J., Curi, R., Carvalho, C. R., Anhe, G. F., & Carpinelli, A. R. (2008). Activation of insulin and IGF-1 signaling pathways by melatonin through MT1 receptor in isolated rat pancreatic islets. *Journal of Pineal Research*, 44(1), 88–94.
- Qian, L., Xu, K., Xu, J., Gu, R., Liu, X., Shan, S., & Yang, T. (2013). UCP2-866G/A, Ala55Val and UCP3-55C/T polymorphisms in association with obesity susceptibility – a meta-analysis study. *PLoS One*, 8(4), e58939.
- Qiu, L., Na, R., Xu, R., Wang, S., Sheng, H., Wu, W., & Qu, Y. (2014). Quantitative assessment of the effect of KCNJ11 gene polymorphism on the risk of type 2 diabetes. *PLoS One*, 9(4), e93961.
- Rapoport, S. I., Molchanov, A. Y., Golichenkov, V. A., Burlakova, O. V., Suprunenko, E. A., & Savchenko, E. S. (2013). Metabolicheskiy sindrom i melatonin [Metabolic syndrome and melatonin]. *Klinicheskaya Meditsina*, 11, 8–14 (in Russian).
- Reiter, R. J. (1980). The pineal gland and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocrine Reviews*, 1(2), 109–131.
- Ríos-Lugo, M. J., Cano, P., Jiménez-Ortega, V., Fernández-Mateos, M. P., Scacchi, P. A., Cardinali, D. P., & Esquifino, A. I. (2010). Melatonin effect on plasma adiponectin, leptin, insulin, glucose, triglycerides and cholesterol in normal and high fat-fed rats. *Journal of Pineal Research*, 49(4), 342–348.
- Rosa, J. C., Lira, F. S., Venancio, D. P., Cunha, C. A., Oyama, L. M., Pimentel, G. D., Tufik, S., Oller do Nascimento, C. M., Santos, R. V., & de Mello, M. T. (2010). Sleep deprivation affects inflammatory marker expression in adipose tissue. *Lipids in Health Disease*, 9, 125.
- Sakamoto, Y., Inoue, H., Keshavarz, P., Miyawaki, K., Yamaguchi, Y., Moritani, M., Kunika, K., Nakamura, N., Yoshikawa, T., Yasui, N., Shiota, H., Tanahashi, T., & Itakura, M. (2007). SNPs in the KCNJ11-ABCC8 gene locus are associated with type 2 diabetes and blood pressure levels in the Japanese population. *Journal of Human Genetics*, 52(10), 781–793.
- Salgado-Delgado, R., Angeles-Castellanos, M., Saderi, N., Buijs, R. M., & Escobar, C. (2010). Food intake during the normal activity phase prevents obesity and circadian desynchrony in a rat model of night work. *Endocrinology*, 151(3), 1019–1029.
- Scheer, F. A., Hilton, M. F., Mantzoros, C. S., & Shea, S. A. (2009). Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(11), 4453–4458.
- Scott, E. M., Carter, A. M., & Grant, P. J. (2008). Association between polymorphisms in the Clock gene, obesity and the metabolic syndrome in man. *International Journal of Obesity*, 32(4), 658–662.
- Shieh, J. M., Wu, H. T., Cheng, K. C., & Cheng, J. T. (2009). Melatonin ameliorates high fat diet-induced diabetes and stimulates glycogen synthesis via a PKCzeta-Akt-Gsk3-beta pathway in hepatic cells. *Journal of Pineal Research*, 47(4), 339–344.
- Spiegel, K., Tasali, E., Penev, P., & Cauter, E. V. (2004). Brief communication: Sleep curtailment in healthy young men is associated with decreased leptin levels, elevated ghrelin levels, and increased hunger and appetite. *Annals of Internal Medicine*, 141(11), 846–850.
- Srinivasan, V., Ohta, Y., Espino, J., Pariente, J., Rodríguez, A., Mohamed, M., & Zakaria, R. (2013). Metabolic syndrome, its pathophysiology and the role of melatonin metabolic. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic and Immune Drug Discovery*, 7(1), 11–25.
- Srivastava, R. K., & Krishna, A. (2010). Melatonin modulates glucose homeostasis during winter dormancy in a vesperilionid bat, *Scotophilus heathi*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 155(3), 392–400.
- St-Onge, M. P., Roberts, A. L., Chen, J., Kelleman, M., O'Keefe, M., RoyChoudhury, A., & Jones, P. J. (2011). Short sleep duration increases energy intakes but does not change energy expenditure in normal-weight individuals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 94(2), 410–416.
- Syromjatnikova, L. I., Spigina, T. A., & Shestakov, V. V. (2010). Cirkadiannyj ritm i depressiya u kardiologicheskikh pacientov. Psihicheskie Rasstrojstva v Obshej Meditsine, 1, 19–23 (in Russian).
- Szosland, D. (2010). Shift work and metabolic syndrome, diabetes mellitus and ischaemic heart disease. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 23(3), 287–291.
- Taheri, S., Lin, L., Austin, D., Young, T., & Mignot, E. (2004). Short sleep duration is associated with reduced leptin, elevated ghrelin, and increased body mass index. *PLoS Medicine*, 1(3), e62.
- Takashima, N., Tomoike, H., & Iwai, N. (2006). Retinol-binding protein 4 and insulin resistance. *The New England Journal of Medicine*, 355(13), 1392.
- Van Cauter, E., & Knutson, K. L. (2008). Sleep and the epidemic of obesity in children and adults. *European Journal of Endocrinology*, 159(Suppl 1), 59–66.
- Voznesenskaja, T. G. (2009). Rasstrojstva pishhevogo povedeniya pri ozhirenii i ih korrekciya [Eating disorders in obesity and their correction]. *Farmateka*, 12, 91–94 (in Russian).
- Weibel, L., Follenius, M., Spiegel, K., Gronfier, C., & Brandenberger, G. (1997). Growth hormone secretion in night workers. *Chronobiology International*, 14(1), 49–60.
- Wolf, G. (2007). Serum retinol-binding protein: A link between obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes. *Nutrition Reviews*, 65(5), 251–256.
- Woon, P. Y., Kaisaki, P. J., Bragança, J., Bihoreau, M. T., Levy, J. C., Farrell, M., & Gauguier, D. (2007). Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (BMAL1) is associated with susceptibility to hypertension and type 2 diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(36), 14412–14417.
- Yang, Q., Graham, T. E., Mody, N., Preitner, F., Peroni, O. D., Zabolotny, J. M., Kotani, K., Quadro, L., & Kahn, B. B. (2005). Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature*, 436(7049), 356–362.
- Zheng, B., Larkin, D. W., Albrecht, U., Sun, Z. S., Sage, M., Eichele, G., Lee, C. C., & Bradley, A. (1999). The mPer2 gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock. *Nature*, 400(6740), 169–173.



Effect of 3-arylamino-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-ones on the bradykinin-induced smooth muscle contraction

P. A. Virych*, O. V. Shelyuk*, T. A. Kabanova**, O. I. Khalimova**,
V. S. Martynyuk*, V. I. Pavlovsky**, S. A. Andronati**

*Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

**O. V. Bogatsky Physico-Chemical Institute, National Academy of Sciences of Ukraine, Odesa, Ukraine

Article info

Received 28.12.2016

Received in revised form

26.01.2017

Accepted 28.01.2017

Taras Shevchenko

National University of Kyiv,

Glushkova Str., 2,

Kyiv, 03022, Ukraine

Tel: +38-096-702-80-44

E-mail: sphaenodon@ukr.net

O. V. Bogatsky

Physico-Chemical Institute,

National Academy of Sciences

of Ukraine, Lustdorfska Doroga,

86, Odesa, 65080, Ukraine

Tel: +38-097-905-92-97

E-mail:

victor_pavlovsky@ukr.net

Virych, P. A., Shelyuk, O. V., Kabanova, T. A., Khalimova, O. I., Martynyuk, V. S., Pavlovsky, V. I., & Andronati, S. A. (2017). Effect of 3-arylamino-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-ones on the bradykinin-induced smooth muscle contraction. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(1), 30–35. doi: 10.15421/021706

Damage to tissue, inflammation and disruption of normal functioning of organs are often accompanied by pain. In pain perceptions, the kinin-kallikrein system with bradykinin as mediator is very important. Regulatory activity of the kinin-kallikrein system permits the control of inflammation, pain, vascular tone and other functions. A new group of substances that may be used for this purpose are 3-substituted 1,4-benzodiazepinones. We analyzed the effect of 3-arylamino-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-ones derivatives on the normalized maximal rate of bradykinin-induced smooth muscle contraction of the stomach in the presence of calcium channel blockers verapamil (1 μ M) and gadolinium (300 μ M). The levels of bradykinin and 3-arylamino-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-ones in the incubation solution were 10^{-6} M. Data processing on the dynamics of contraction was performed according to the method of T. Burdyha and S. Kosterin. Statistically significant changes were found for MX-1828. This compound reduced the maximal normalized rate of bradykinin-induced smooth muscle contraction in the presence of Gd^{3+} and verapamil by 19.3% and 32.0%, respectively. Also, MX-1828 demonstrated effects similar to those of the competitive inhibitor bradykinin B_2 -receptor – des-Arg⁹-bradykinin-acetate, which is possible evidence of its interaction with the receptor or signal transduction pathways. MX-1828 additionally reduced the maximum normalized rate of relaxation by 6.2% in the presence of Gd^{3+} . This effect was demonstrated for MX-1906 in the presence of verapamil with additional reduction of the maximal normalized rate of relaxation, which was 26.4%. The results suggest the presence of inhibitory interaction between MX-1828 and kinin-kallikrein system receptors or signal transduction pathways. The effects which were found for MX-1906 require further studies to clarify the mechanisms of influence on bradykinin-induced smooth muscle contraction.

Keywords: 3-substituted 1,4-benzodiazepines; bradykinin; kinin-kallikrein system; maximal normalized rate

Вплив 3-ариламіно-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-онів на брадикінін-індуковане скорочення гладеньких м'язів

П. А. Вірич*, О. В. Шелюк*, Т. А. Кабанова**, О. І. Халімова**,
В. С. Мартинюк*, В. І. Павловський**, С. А. Андронаті**

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

**Фізико-хімічний інститут імені О. В. Богатського НАН України, Одеса, Україна

Особливості біологічної дії похідних бенздіазепінонів визначаються їх хімічною структурою та взаємодією з біохімічними мішенями. Проаналізовано вплив 3-ариламіно-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-онів на зміни максимальної нормованої швидкості брадикінін-індукованого скорочення гладеньких м'язів за присутності іонів гадолінію та верапамілу. Статистично достовірні зміни виявлено для MX-1828, яка здатна додатково інгібувати брадикінін-індуковане скорочення за присутності Gd^{3+} на 19,3% та на 32,0% за присутності верапамілу, а також демонструє ефекти, подібні до тих, що виявляє конкурентний інгібітор B_2 -рецепторів брадикініну – des-Arg⁹-bradykinin-acetate, що свідчить про її взаємодію з рецептором або шляхами трансдукції сигналу. Максимально нормована швидкість розслаблення додатково знижується на 6,2% при додаванні MX-1828 за присутності Gd^{3+} . Також за присутності верапамілу такий ефект характерний для MX-1906 і складає 26,4%. Отримані дані дозволяють висунути припущення про взаємодію MX-1828 з B_2 -рецепторами кінін-калікрейнової системи за механізмом інгібування. Додаткових досліджень потребує сполука MX-1906, що виявляє такий ефект за присутності в інкубаційному розчині верапамілу.

Ключові слова: 3-заміщені 1,4-бенздіазепін-2-они; брадикінін; кінін-калікрейнова система; максимальна нормована швидкість

Вступ

Біль – складне багатовимірне сенсорно-прецептивне явище. Відчуття болю виникає в результаті порушення цілісності організму або його нормального функціонування за дії зовнішніх чи внутрішніх факторів. Особливої уваги заслуговує хронічний біль, що створює особливу нішу фінансових витрат. Наразі розрізняють два типи хронічного болю: ноцицептивний і нейропатичний. Під першим поняттям розуміють біль, який виникає у відповідь на пошкодження нервової тканини, що пов'язано з активацією ноцицепторів нормально функціонуючої соматосенсорної системи (Baron et al., 2010). Нині існує декілька механізмів нейропатичного болю, що описуються моделями Бенета – Ксі (Bennett – Xie), Шіна та Чанга (Sheen and Chung), Кіма та Чанга (Kim and Chung) і Зельцера (Seltzer) (Kerstman et al., 2013). За пошкодження нервових волокон виникає спонтанна електронна збудливість і надчутливість, що проявляється зміною експресії медіаторів, нейромоделюючих факторів росту, рецепторів і нейроактивних молекул первинних аферентних нейронів. Така периферична сенсibiliзація посилює ноцицепцію, що викликає больову гіперчутливість, у тому числі до виникнення спонтанного болю та гіперальгезивного підвищення температури. Крім того, продукція та вивільнення запальних медіаторів і прозапальних цитокінів може викликати больову гіперчутливість (Watkins and Maier, 2002; Ludwig and Baron, 2004; Gierthmuhlen et al., 2014).

Залежно від типу больового відчуття застосовують анестетики загальної або місцевої дії. Найімовірніші кандидати на роль мішеней для анестетиків загальної дії – ліганд-керовані іонні канали. В цілому відбувається блокування або порушення рецептор-лігандних взаємодій таких каналів як ГАВАА. Також для деяких речовин, наприклад кетаміну, характерне блокування NMDA рецепторів (N-метил-D-аспартат, тип глутаматних рецепторів) (Plevny, 2008; Garcia et al., 2010).

Місцеві анестетики почали використовувати понад 100 років тому. Їх взаємодія з натрієвими каналами викликає бажаний ефект. Проте вони здатні модифікувати активність калієвих і кальцієвих каналів, а також перебіг внутрішньоклітинних процесів (Scholz, 2002). Застосування високих доз місцевих анестетиків може спричинити судоми. Крім того більшість таких речовин впливає на тонус судин, що сприяє розвитку гіпотонії (Becker and Reed, 2006).

Кінін-калікрейнова система може виступати однією з ланок больової чутливості, а також виконувати в організмі низку інших функцій: регуляція тиску крові, участь у запальних процесах, серцево-судинному гомеостазі, знеболювальних відповідях, больовій передачі, клітинній проліферації, вивільненні цитокінів, простагліцину, оксиду азоту (NO), регуляції функцій гладеньких м'язів судин, шлунково-кишкового тракту тощо (Pesquero and Bader, 1998).

Дія кінінів у тканинах і кровоносних судинах жорстко контролюється завдяки процесам їх утворення та деградації. У плазмі фактор згортання крові XII (фактор Хагеманна) активується негативно зарядженими поверхнями з утворенням форми XIIa, яка, у свою чергу, здатна розщеплювати прекалікрейнові похідні в активні калікреїни. Останні, завдяки гідролітичній активності, вивільняють із високомолекулярних кініногенів брадикінін (БК), що надходить у кров'яне русло. Клітинна відповідь на дію цього пептиду опосередковується активацією брадикінінових рецепторів двох підтипів — V_1 та V_2 , що належать до родини рецепторів, спряжених із G-білками, та опосередковують свою дію через Gq білки. Після видалення C-кінцевого залишку аргініну кініназами БК перетворюється на des-Arg⁹-BK – інший високоактивний пептид. БК високоспоріднений до конститутивних кінінових рецепторів V_2 (V_2R), у той час як des-Arg⁹-BK – до індуктивних кінінових рецепторів V_1 (V_1R) (Albert-Weibenberger et al., 2013). Це, у свою чергу, супроводжується синтезом вторинних посередників – інозитол-1,4,5-трифосфату та діацилгліцеролу. V_2 -рецептори – конститутивні, а їх експресія тканинносPECIFIC посилюється запальними цито-

кінами, зокрема, інтерлейкіном-1 і факторами некрозу пухлин α та β . V_1 -рецептори експресуються в умовах розвитку травми та запалення. У гладеньких м'язях дихальних шляхів, шлунково-кишкового тракту та міометрію активація рецепторів БК спричиняє скорочення. На протидію цьому, переважною реакцією гладеньких м'язів судин на аплікування БК є розслаблення, внаслідок чого підвищується проникність судинної стінки та розвивається набряк навколишніх тканин; як наслідок, спостерігається фосфоліпаза A_2 -опосередковане вивільнення простагландинів і лейкотрієнів (Higashida et al., 1986). Як правило, такі клітинні відповіді на дію БК опосередковані Ca^{2+} -залежними механізмами внутрішньоклітинного сигналіну.

За останнє десятиліття розроблено низку високоафінних V_2 -антагоністів з функціональною активністю *in vivo*. Серед них варто відмітити FR 173675 (Fujisawa Pharmaceutical) – один із перших перорально доступних, нанолярних високо-селективних інгібіторів V_2 -рецепторів людини. Активний і селективний V_2 антагоніст LF 16-0687 (Fournier), який можна використовувати як водорозчинну димезилатну соль для парентерального введення та володіє високою афінністю до брадикінінових V_2 -рецепторів людини, шурів та морської свинки. Варто відмітити нещодавно створений антагоніст MEN 16132 (Menarini Recherche), який має конформаційно обмежену структуру 4-аміно-4-карбокситетрагідропірану та заряджену N- δ -триметил-орнітинову частину, який тривало та повністю інгібував ініційований брадикініном бронхоспазм і назальне запалення за місцевого застосування. За останні роки підвищився інтерес до інгібіторів V_1 -рецепторів, серед яких найвідоміші SSR 240612 (Sanofi-Synthelabo Recherche), LF 22-0542 (Fournier), NVP SAA 164 (Novartis). Часто для синтезу пептидоміметиків використовують 1,4-бензидіазепінове ядро, здатне імітувати β -вигін, що має важливе значення для біологічно активних форм пептидів. Цей клас речовин володіє високою біодоступністю та добре переноситься пацієнтами. Структурний елемент β -вигіну, встановлений для біоактивної конформації HOE 140, став основою для дизайну непептидних V_2 -антагоністів, що мають бензидіазепіновий каркас (Dziadulewicz et al., 1999). На основі цих досліджень синтезовано антагоніст V_1 -рецепторів людини (Andronati et al., 2009).

Науковий колектив Фізико-хімічного інституту НАН України ім. О. В. Богатського запропонував новий клас перспективних сполук на основі 3-заміщених 1,4-бензидіазепінів, які демонструють анальгетичний ефект і, ймовірно, інгібують БК рецептори. Експериментальні дані демонструють здатність деяких похідних бензидіазепінів проявляти чітку антигіперальгезивну активність відносно запального та невропатичного болю в моделях на тваринах. Деякі похідні бензидіазепінів можуть викликати глибоку анальгезію у тварин (Andronati et al., 2009). Подальша селекція перспективних сполук потребує всебічного оцінювання їх біологічної активності та ретельного дослідження молекулярних та системних механізмів дії.

Виходячи з вищенаведеного, слід зазначити, що модель брадикінін-індукованого скорочення гладеньких м'язів шлунку проста та інформативна для з'ясування механізмів впливу 3-заміщених 1,4-бензидіазепінів на рецепторний апарат кінін-калікрейнової системи. Присутність інгібіторів різних ланок трансдукції сигналу від конститутивно присутніх V_2 -рецепторів дозволить краще зрозуміти особливості взаємодії обраних сполук із мішенями їх дії. Тому мета цього дослідження – з'ясувати механізми впливу 3-ариламіно-1,2-дигідро-3Н-1,4-бензидіазепін-2-онів на брадикінін-індуковане скорочення гладеньких м'язів за присутності інгібіторів кальцієвих каналів – верапамілу та Gd^{3+} .

Матеріал та методи досліджень

Скоротливу активність гладеньких м'язів досліджено в ізометричному режимі. Для цього самців шурів масою 240–260 г декапітували, вилучали шлунок і поміщали в розчин Кребса.

Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з Міжнародною конвенцією роботи з тваринами та Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження». Смужки розміром 1,5–2,0 x 10 мм вирізали з антральної частини шлунка, видаляли серозну та слизову оболонки, розміщували в робочій камері з проточним розчином Кребса (1,5 мл/хв), термостатованій за 37 °С. Препарат перебував під пасивним натягом силою 10 мН та інкубували 1 год до появи спонтанної активності або сталих механокінетичних параметрів скорочення у відповідь на стимуляцію гіперкалієвим розчином. Реєстрацію сигналів проводили за допомогою модуля збору даних m-DAQ12 (Holt Data Systems Ltd., Україна) та програмного забезпечення Power Graph Professional 3.3. У дослідженнях використовували розчин Кребса (мМ): 120,4 NaCl, 5,9 KCl, 15,5 NaHCO₃, 1,2 NaH₂PO₄, 1,2 MgCl₂, 2,5 CaCl₂, 11,5 глюкоза, рН розчину становив 7,4. Гіперкалієвий розчин (концентрація K⁺ 80 мМ) готували шляхом ізотонічної заміни у вихідному розчині Кребса необхідної частини Na⁺ на еквімолярну кількість іонів калію. Робочу концентрацію брадикініну в інкубаційному розчині (10⁻⁶ М) одержували шляхом внесення аликвоти маточного розчину в інкубаційну камеру. Для додаткового оцінювання біологічних ефектів 3-ариламіно-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-онів використовували спектр концентрацій брадикініну 10⁻¹⁰–10⁻⁶ М та конкурентний інгібітор B₂R des-Arg⁹-bradykinin-acetate в концентрації 10⁻⁶ М.

Бенздіазепіни попередньо розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО) та вносили в розчин Кребса (остаточно вміст органічного розчинника складав 1% загального об'єму розчину). Дію досліджуваних речовин вивчали за однаковим протоколом експерименту, сполуки вносили в розчин Кребса за 30 хв до реєстрації механічної активності препаратів. Кінцева концентрація похідних 3-заміщених 1,4-бенздіазепінонів в інкубаційному середовищі складала 10⁻⁶ М. Перелік використаних речовин та їх хімічну структуру наведено в таблиці 1.

Відповідний блокатор присутній в омивальному розчині Кребса. Концентрація Gd³⁺ становила 300 мкМ, верапамілу – 1 мкМ. Як контрольні зразки використовували смужки гладеньких м'язів шлунка шурів, до інкубаційного середовища яких додавали аликвоту диметилсульфоксиду (ДМСО), яка не перевищувала 1% загального об'єму. Це пов'язано з тим, що похідні 3-заміщених 1,4-бенздіазепінонів гідрофобні, але добре розчиняються у ДМСО. Тому для адекватного порівняння ефектів похідних 3-заміщених 1,4-бенздіазепінонів до контрольних зразків також додавали еквівалентну кількість ДМСО. Повторність дослідження десятиразова.

Вивчення механокінетики процесу скорочення м'язових препаратів здійснювали відповідно до методу Burduga and Kosterin (1991). Перевага даного аналізу – незалежність від амплітуди скоротливих відповідей. Це дає можливість коректно порівнювати дані, одержані на м'язових препаратах різного розміру. Ефект 3-заміщених 1,4-бенздіазепін-2-онів оцінювали шляхом вирахування різниці між контрольними брадикінін-індукованими скороченнями та за присутності відповідних речовин.

Статистичну обробку результатів здійснювали загальноприйнятими методами варіаційної статистики за допомогою пакетів програм Statistica 8.0 та Origin Lab 8.0. Отримані результати перевіряли на нормальність розподілу тестом Шапіро – Вілка. Якщо дані не відповідали закону нормального розподілу, порівняння незалежних вибірок здійснювали за критерієм Краскела – Уолліса. За нормального розподілу, порівняння різниці між контрольними та дослідними вимірами проводили за допомогою ANOVA (Шеффе-тест) для незалежних вибірок. Рівень значущості становив P < 0,05.

Результати

У цьому дослідженні проаналізовано вплив 3-ариламіно-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-онів на брадикінін-індуковане скорочення гладеньких м'язів у діапазоні концентрацій

агоніста 10⁻¹⁰–10⁻⁶ М. Як зразок порівняння використали конкурентний інгібітор B₂R des-Arg⁹-bradykinin-acetate. Головною кінетичною характеристикою скорочення, згідно із застосуванням методом обрахунку стала максимальна нормована швидкість (Vn). За концентрації БК 10⁻⁶ М відбувається статистично достовірне зростання даного показника на 20,5%. Подібний ефект характерний для сполуки MX-1828. За низьких концентрацій брадикініну 10⁻¹⁰, 10⁻⁹ М відбувається інгібування Vn на 20,7% та 8,6% відносно контрольних скорочень. За 10⁻⁶ М БК зареєстровано зворотний ефект – зростання на 10,7%. Ці зміни подібні до дії des-Arg⁹-bradykinin-acetate, що свідчать про можливість взаємодії речовини з рецепторним апаратом кінін-калікреїнової системи або шляхами трансдукції (рис. 1).

Таблиця 1

Хімічна структура
3-ариламіно-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-онів

№	Шифр	структура
1	MX-1785	
2	MX-1828	
3	MX-1906	
4	MX-1664	
5	MX-1626	

Інші сполуки демонструють ефекти інгібування, які практично не залежать від концентрації брадикініну. Так, MX-1785 здатна знижувати Vn брадикінін-індукованого скорочення на 10–13% для діапазону концентрацій агоніста 10⁻¹⁰–10⁻⁷ М. Лише за 10⁻⁶ М БК статистично достовірної різниці не виявлено (рис. 1). Для MX-1906 та MX-1626 спостерігається характерне зниження Vn скорочення на 28–22% у діапазоні концентрацій брадикініну 10⁻⁹–10⁻⁶ М. За 10⁻¹⁰ М БК статистично достовірну різницю не виявлено для MX-1906. MX-1664 знижує Vn на 25% за індукції скорочення 10⁻⁸–10⁻⁶ М БК. Дещо менший ефект 12–14% характерний для концентрацій 10⁻¹⁰–10⁻⁹ М БК (рис. 2). Отже, серед спектра 3-ариламіно-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-онів варто виділити сполуку MX-1828, яка

демонструє ефекти, подібні до конкурентного інгібітора V_2 -рецепторів брадикініну, що є можливим свідченням її дії на рецептор або на його шляхи трансдукції сигналу.

Механокінетичні параметри скоротливої активності гладеньких м'язів за присутності Gd^{3+} . Процеси скорочення гладеньких м'язів запускаються зростаючим рівнем цитозольного кальцію, який, зв'язуючись зі специфічними протеїнами, індукує процеси взаємодії актину з міозином. Зростання забезпечується ліганд- і потенціал-керованими кальцієвими каналами мембрани та саркоплазматичного ретикулу. Цей струм можна регулювати, використовуючи селективні та неселектив-

ні інгібітори. Для цього використовують інші, схожі за властивостями іони, які можуть взаємодіяти із селективним фільтром каналу або його алостеричним центром, змінюючи тим самим його пропускну здатність. Такими можуть бути рідкісноземельні метали, до яких належить гадоліній. Присутність іонів цього металу в розчині забезпечує зменшення кальцієвого струму через мембрану та зміну механокінетичних характеристик брадикінін-індукованого гладеньком'язового скорочення. Таким чином, максимальна нормована швидкість (V_n) брадикінін-індукованого скорочення за присутності Gd^{3+} знижується на 23,1%, що обрано як контрольне значення (рис. 3).

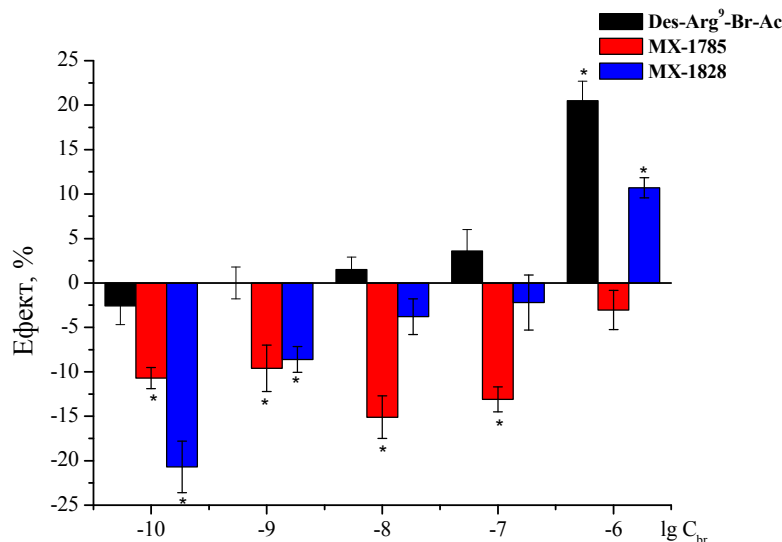


Рис. 1. Вплив 3-заміщених 1,4-бенздіазепін-2-онів на максимальну нормовану швидкість скорочення (V_n) гладеньких м'язів шлунка шурів ($M \pm m$, $n = 10$): * – $P < 0,05$

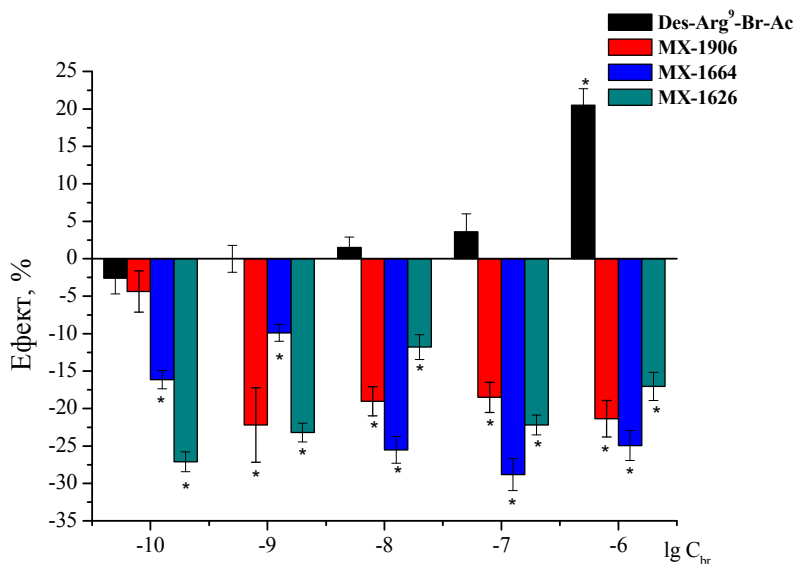


Рис. 2. Вплив 3-заміщених 1,4-бенздіазепін-2-онів на максимальну нормовану швидкість скорочення (V_n) гладеньких м'язів шлунка шурів ($M \pm m$, $n = 10$): * – $P < 0,05$

Присутність у розчині сполук MX-1785, MX-1906, MX-1664 та MX-1626 не змінювала цей показник за даних умов. Для MX-1828 характерне достовірне зниження V_n порівняно з контрольними значеннями на 19,3% (рис. 3).

V_n розслаблення за присутності Gd^{3+} зростає на 7,1%, що вибрано як контрольне значення. Додавання до розчину MX-1664 сприяє зростанню V_n на 35,8%, MX-1626 – 8,9%. Додавання MX-1906 забезпечує зниження цього показника відносно контролю на 37%, а за відсутності Gd^{3+} – на 29,9% (рис. 3).

Результатом такого ефекту можуть служити наявні додаткові мішені впливу сполуки. Для речовини MX-1828 також характерне незначне зниження показника максимальної нормованої швидкості розслаблення на 6,2%. Статистично достовірні зміни відсутні для MX-1785 (рис. 4).

Механокінетичні параметри скоротливої активності гладеньких м'язів за присутності верапамілу. Верапаміл – класичний блокатор T- та L-типів кальцієвих каналів, які залучені в сигнальних шляхах ініціації скорочення гладеньких м'язів

зів, у тому числі брадикінін-індукованого. Його присутність в інкубаційному розчині в концентрації 1 мкМ знижує максимальну нормовану швидкість скорочення на 49,3%, тобто майже вдвічі. За присутності 3-заміщених 1,4-бенздіазепін-2-онів MX-1785, MX-1664, MX-1626 Vn не піддається статистично достовірним змінам (рис. 5).

Статистично достовірні відмінності Vn скорочення виявлено для MX-1828, що становлять 32% від брадикінін-індукованих скорочень за присутності верапамілу, а також MX-1906 з показником додаткового інгібування 26,4% (рис. 5).

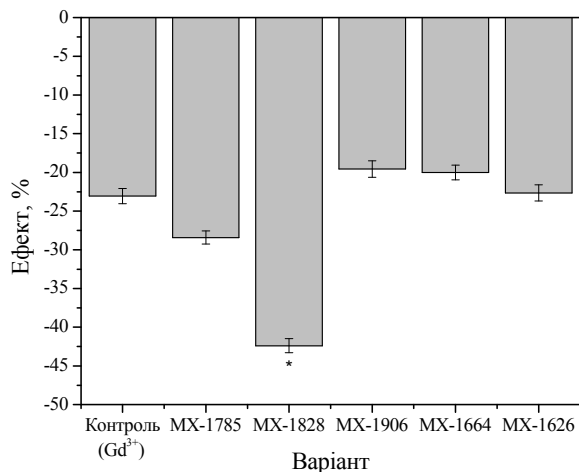


Рис. 3. Вплив 3-заміщених 1,4-бенздіазепін-2-онів на максимальну нормовану швидкість скорочення за присутності Gd³⁺ (300 мкМ): «0» – Vn брадикінін-індукованого скорочення, контроль – за присутності Gd³⁺; M ± m, n = 10, * – P < 0,05

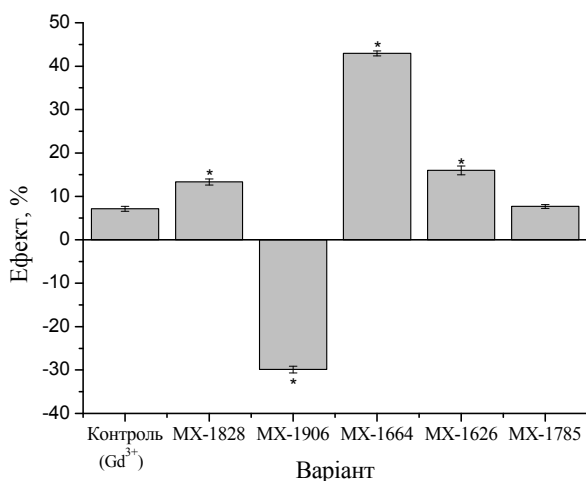


Рис. 4. Вплив 3-заміщених 1,4-бенздіазепін-2-онів на максимальну нормовану швидкість розслаблення за присутності Gd³⁺ (300 мкМ): позначення див. рис. 3

Максимальна нормована швидкість розслаблення за присутності верапамілу зростає на 19,5% (рис. 6). Присутність в інкубаційному розчині 3-заміщених 1,4-бенздіазепін-2-онів забезпечує нівелювання такої різниці та відповідність параметра значенням брадикінін-індукованого скорочення за відсутності інгібіторів. Причому повна відсутність ефекту характерна для MX-1828, MX-1906, MX-1664 та MX-1626. Зниження швидкості на 11,6% порівняно з контрольними значеннями характерне для MX-1785 (рис. 6).

Обговорення

Природні речовини деяких рослин після незначної хімічної модифікації структури стають перспективними модифікатора-

ми активності кінін-калікрейнової системи, що доведено експериментально на скоротливій здатності шлунка мишей (Alves et al., 2015). Розвиток сучасної органічної хімії дозволяє синтезувати антагоністи непептидної природи, які потенційно можуть використовувати як блокатори активності кінін-калікрейнової системи кишечника (Kam et al., 2005). Використання блокаторів B₂-рецепторів дозволяє зменшити перистальтику кишечника, у той час як інгібування B₁-рецепторів сприяє зниженню запалення. Активация обох рецепторів спричиняє розвиток діареї (Stadnicki, 2011). Подібні дослідження проведено для вивчення ролі B₁ та B₂ кінінових рецепторів у розвитку колітів (Marcon et al., 2013).

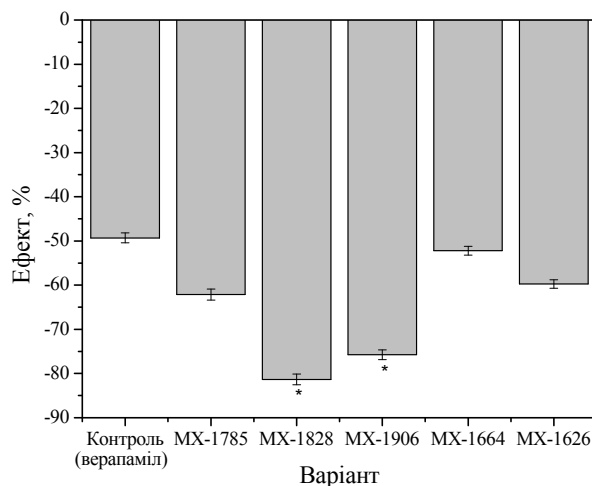


Рис. 5. Вплив 3-заміщених 1,4-бенздіазепін-2-онів на максимальну нормовану швидкість скорочення за присутності верапамілу (1 мкМ): позначення див. рис. 3

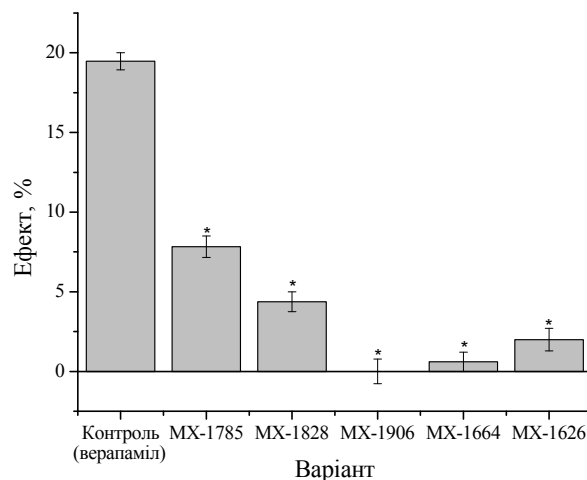


Рис. 6. Вплив 3-заміщених 1,4-бенздіазепін-2-онів на максимальну нормовану швидкість розслаблення за присутності верапамілу (1 мкМ): позначення див. рис. 3

Похідні бенздіазепінів використовують як блокатори GABA_A рецепторів. Зв'язування відбувається в алостеричному центрі рецептора, тому взаємодія може бути як інгібувальною, так і активувальною. Речовини даного класу використовують як знеболювальні агенти за нейропатичного болю, підвищеної больової чутливості, болю у м'язах тощо (Bartusch et al., 1996; Hugel et al., 2003; Chou and Huffman, 2007; Howard et al., 2014). Пошук мішеней дії похідних даного класу – важливе завдання, що дозволяє розуміти механізми, які лежать в основі отриманих ефектів. Попередньо, взаємодія досліджуваних речовин із кінін-калікрейновою системою продемонстровано дослідженнями Andronati et al. (2009) під час вивчення їх анальгетичних властивостей. Відповідно до попередніх досліджень без використання інгібіторів виявлено, що сполука MX-1828 здатна викликати ефекти, схожі до des-Arg⁹-bradykinin-acetate. Ми вису-

нули припущення про можливі її взаємодії з рецепторним апаратом кінін-калікрейнової системи, у тому числі з V_2 -рецепторами. Виходячи зі структури речовин та їх гідрофобності, вони здатні не лише вбудовуватись у мембрану, а і проникати всередину клітини. Тому, крім прямої взаємодії з рецептором, можливо, існують механізми їх впливу на шляхи трансдукції сигналу, що виявляється в ефектах, які ми зареєстрували.

Використання інгібіторів різного типу дозволяє виключити окремі ланки трансдукції сигналу від брадикінінових рецепторів та виявити можливий синергізм чи антагонізм їх дії з 3-заміщеними 1,4-бенздіазепін-2-онами. Для цього використовували верапаміл та іони гадолінію (Gd^{3+}). Рідкісноземельні метали здатні змінювати кальцієву провідність мембрани за рахунок взаємодії із селективним фільтром каналів, зменшуючи, таким чином, інтрацелюлярний потік Ca^{2+} (Malasics et al., 2010), а верапаміл – класичний блокатор потенціал-активованих кальцієвих каналів L- та T-типів (Bergson et al., 2011).

Максимальна нормована швидкість розслаблення вказує на тривалість підтримання високого рівня цитоплазматичного кальцію, що визначається часом взаємодії агоніста з рецептором, ефективності роботи ланцюга трансдукції, кальцієвих каналів і помп, роботи скоротливого апарату та спряжених систем. Отримані результати (рис. 1 та 2) вказують на зниження максимальної швидкості скорочення для сполук MX-1785, MX-1906, MX-1664, MX-1626 за використаного діапазону концентрацій 10^{-10} – 10^{-6} М. Теоретично всі речовини виступають перспективними блокаторами брадикінін-індукованого скорочення гладеньких м'язів. Але застосування інгібіторів дозволило ідентифікувати речовину MX-1828, що попередньо відібрана завдяки ефектам, подібним до відомого блокатора V_2 -рецепторів. Можна припустити, що вона володіє більшим афінітетом до рецепторів порівняно з іншими або взаємодіє з початковими ланками трансдукції сигналу, тому, на фоні використаних кальцієвих блокаторів, забезпечує додаткові зміни максимальної нормованої швидкості скорочення та розслаблення гладеньких м'язів.

Використання інгібіторів кальцієвих каналів дозволило ідентифікувати речовини, здатні впливати на ланки трансдукції сигналу брадикінінових рецепторів, забезпечуючи додаткове зниження чи збільшення механокінетичних параметрів скорочення гладеньких м'язів. Отримані дані дозволяють висунути припущення про взаємодію MX-1828 із кінін-калікрейновою системою за механізмом інгібування. Разом із тим додаткових досліджень потребує сполука MX-1906, що виявляє такий ефект за присутності в інкубаційному розчині верапамілу.

Висновки

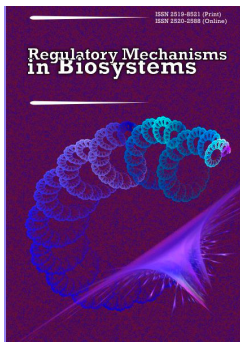
Серед спектра досліджуваних 3-ариламіно-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-онів варто виділити сполуку MX-1828, яка демонструє ефекти, подібні до ефектів конкурентного інгібітора V_2 -рецепторів брадикініну – des-Arg⁹-bradykinin-acetate, що свідчить про її взаємодії з рецептором або шляхами трансдукції сигналу. Ця речовина здатна додатково знижувати максимальну нормовану швидкість скорочення за присутності інгібіторів кальцієвих каналів верапамілу та іонів гадолінію на 32,0% та 19,3%, відповідно. Також за присутності верапамілу такий ефект характерний для MX-1906 (складає 26,4%), що потребує додаткових досліджень у з'ясуванні мішеней впливу сполуки на брадикінін-індуковане скорочення.

Дослідження проведені за підтримки Державного фонду фундаментальних досліджень за договорами Ф64/19-2015 та Ф64/40-2016.

References

Albert-Weibenberger, C., Siren, A., & Kleinschnitz, C. (2013). Ischemic stroke and traumatic brain injury: The role of the kallikrein-kinin system. *Progress in Neurobiology*, 101–102, 65–82.

- Altamura, M., Meini, S., Quartara, L., & Maggi, C. (1999). Nonpeptide antagonists for kinin receptors. *Regulatory Peptides*, 80, 13–26.
- Alves, F., Oliva, M., & Miranda, A. (2015). Conformational and biological properties of *Bauhinia bauhinioidea* kallikrein inhibitor fragments with bradykinin-like activities. *Journals of Peptide Science*, 21, 495–500.
- Andronati, S., Kabanova, T., Pavlovskij, V., Andronati, K., & Bachins'kij, S. (2009). Ligandy bradikininovykh receptorov kak potencial'nie anal'geticheskie i protivovospalitel'nie sredstva. *Zhurnal Organichnoji ta Farmaceutichnoji Khimiji*, 28(4), 70–76 (in Russian).
- Baron, R., Binder, A., & Wasner, G. (2010). Neuropathic pain: Diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *The Lancet Neurology*, 9(8), 807–819.
- Bartusch, S., Sanders, B., D'Alessio, J., & Jernigan, J. (1996). Clonazepam for the treatment of lancinating phantom limb pain. *The Clinical Journal of Pain*, 12, 59–62.
- Becker, D., & Reed, K. (2006). Essentials of local anesthetic pharmacology. *Anesthesia Progress*, 93(3), 98–109.
- Bergson, P., Lipkind, G., Lee, S., Duban, M., & Hanck, D. (2011). Verapamil block of T-type calcium channels. *Molecular Pharmacology*, 79(3), 411–419.
- Burdyga, T., & Kosterin, S. (1991). Kinetic analysis of smooth muscle relaxation. *General Physiology and Biophysics*, 10, 589–598.
- Chou, R., & Huffman, L. (2007). Medications for acute and chronic low back pain: A review of the evidence for an American Pain Society/American College of Physicians clinical practice guideline. *Annals of Internal Medicine*, 147, 505–514.
- Dziadulewicz, E., Brown, M., Dunstan, A., Lee, W., Said, N., & Garratt, P. (1999). The design of non-peptide human bradykinin B_2 receptor antagonists employing the benzodiazepine peptidomimetic scaffold. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 9(3), 463–468.
- Garcia, P., Kolesky, S., & Jenkins, A. (2010). General anesthetic actions on GABAA receptors. *Current Neuropharmacology*, 8, 2–9.
- Gierthmuhlen, J., Binder, A., & Baron, R. (2014). Mechanism-based treatment in complex regional pain syndromes. *Nature Reviews. Neurology*, 10(9), 518–528.
- Higashida, H., Streaty, R., Klee, W., & Nirenberg, M. (1986). Bradykinin-activated transmembrane signals are coupled via No or Ni to production of inositol 1,4,5-trisphosphate, a second messenger in NG108-15 neuroblastoma-glioma hybrid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83, 942–946.
- Howard, P., Twycross, R., Shuster, J., & Mihalyo, M. (2014). Benzodiazepines. *Journal of Pain and Symptom Management*, 47(5), 955–964.
- Hugel, H., Ellershaw, J., & Dickman, A. (2003). Clonazepam as an adjuvant analgesic in patients with cancer-related neuropathic pain. *Journal of Pain and Symptom Management*, 26, 1073–1074.
- Kam, Y., Ro, J., Kim, H., & Choo, H. (2005). Antagonistic effects of novel non-peptide chlorobenzhydryl piperazine compounds on contractile response to bradykinin in the guinea-pig ileum. *European Journal of Pharmacology*, 523, 143–150.
- Kerstman, E., Ahn, S., Battu, S., Tariq, S., & Grabis, M. (2013). Neuropathic pain. In: M. Barnes, D. Good, *Handbook of clinical neurology. Neurological Rehabilitation*. Elsevier B.V., 110, pp. 175–187.
- Ludwig, J., & Baron, R. (2004). Complex regional pain syndrome: An inflammatory pain condition? *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 4(1), 449–455.
- Malasics, A., Boda, D., Valisko, M., Henderson, D., & Gillespie, D. (2010). Simulations of calcium channel block by trivalent cations: Gd^{3+} competes with permeant ions for the selectivity filter. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1798(11), 2013–2021.
- Marcon, R., Claudino, R., Dutra, R., Bento, A., Schmidt, E., Bouzon, Z., Sordi, R., Morais, R., Pesquero, J., & Calixto, J. (2013). Exacerbation of DSS-induced colitis in mice lacking kinin B_1 receptors through compensatory up-regulation of kinin B_2 receptors: The role of tight junctions and intestinal homeostasis. *British Journal of Pharmacology*, 168(2), 389–402.
- Pesquero, J., & Bader, M. (1998). Molecular biology of the kallikrein-kinin system: from structure to function. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 31, 1197–1203.
- Plevry, B. (2008). Mechanism of action of general anaesthetic drugs. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, 9(4), 152–153.
- Scholz, A. (2002). Mechanisms of (local) anaesthetics on voltage-gated sodium and other ion channels. *British Journal of Anaesthesia*, 89(1), 52–61.
- Stadnicki, A. (2011). Intestinal tissue kallikrein-kinin system in Inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 17(2), 645–654.
- Watkins, L., & Maier, S. (2002). Beyond neurons: Evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. *Physiological Reviews*, 82(4), 981–1011.



Changes in the viability of *Strongyloides ransomi* larvae (Nematoda, Rhabditida) under the influence of synthetic flavourings

A. A. Boyko*, V. V. Brygadyrenko**

*Dnipropetrovsk State Agrarian-Economic University, Dnipro, Ukraine

**Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipro, Ukraine

Article info

Received 11.12.2016

Received in revised form

14.01.2017

Accepted 19.01.2017

Dnipropetrovsk State
Agrarian-Economic University,
Voroshilov Str., 25,
Dnipro, 49027, Ukraine
Tel.: +38-097-296-42-10
E-mail:
boikoalexandra1982@gmail.com

Oles Honchar Dnipropetrovsk
National University,
Gagarin Ave., 72,
Dnipro, 49010, Ukraine
Tel.: +38-050-93-90-788
E-mail: brigad@ua.fm

Boyko, A. A., & Brygadyrenko, V. V. (2017). Changes in the viability of *Strongyloides ransomi* larvae (Nematoda, Rhabditida) under the influence of synthetic flavourings. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8(1), 36–40. doi: 10.15421/021707

One of the most common nematodes of pigs globally is *Strongyloides ransomi* Schwartz and Alicata 1930. It usually causes aggravation of physiological indicators of its hosts and damage to their immune system. Also it is a good modelling object for the evaluation of the antiparasitic activity of new antihelminthic drugs. We conducted laboratory experiments to assess the effect of flavouring additives with flower odour (benzaldehyde, citral, D-limonene and β -ionone) upon the viability of *S. ransomi* larvae. The mortality rate was calculated for 24 hours exposure at four concentrations of each substance (10, 1, 0.1 и 0.01 g/l) with eight replications. The lowest LD₅₀ values were obtained for citral (97 mg/l) and benzaldehyde (142 mg/l). These substances are recommended for further evaluation of their antihelminthic effect in experiments using laboratory animals. Unlike other substances, the effect of β -ionone and D-limonene even at a concentration of 10 g/l after 24 hours caused the death of <50% of *S. ransomi* larvae. The study of flavouring additives with flowery odour, which are permitted to be used in food for humans and also to be used in cosmetics, is a promising field for research aimed at the development of new antiparasitic drugs.

Keywords: nematodes; antiparasitic activity; flavouring agents; benzaldehyde; citral; D-limonene; β -ionone

Introduction

Helminthiasis causes significant economic damage to animal husbandry (Faye et al., 2003; Veneziano et al., 2004; Charlier et al., 2007; Cringoli, 2008; Yamov and Antropov, 2008; Ponomar et al., 2014a, b; Boyko et al., 2016). Pig farming is one of the most common sources of meat products. Among the parasites of pigs, the most common are nematodes, including strongyloidiasis agents (Knecht et al., 2011; Eysker et al., 2011; Samsonovich, 2012a; Maslova et al., 2015). Parasitisation by *Strongyloides ransomi* (Schwartz and Alicata, 1930) causes loss of concentration of albuminous and albumin fractions in the blood of piglets, loss of erythrocytes, hemoglobin, albumin, phagocytic and lysozyme activity and immune reaction (Samsonovich, 2012b).

Therefore determining the viability of helminths is significant for controlling their population, both in the host, and in the environment. Nowadays, synthetic antiparasitic drugs (Ponomar et al., 2013) are used and experiments of identifying the antihelminthic properties of plants are being conducted (Rahmann and Seip, 2006; Burke et al., 2009; Lu et al., 2010).

To fight pathogenic organisms, microbiologists and virusologists are researching the effect of flavouring agents in food production (Chiang et al., 2005; Sato et al., 2006; Somolinos et al., 2008; Si et al., 2009; Belletti et al., 2010). Because pigs consume food not only of vegetable origin, but also of animal origin, their diet can include synthetic flavouring agents from the diet of humans. Therefore the objective of this research is to define the effect of flavouring agents upon the level of viability of *S. ransomi* larvae (Rhabditida, Strongyloididae).

Materials and methods

The faeces of pigs were studied to find *S. ransomi* larvae using the Baermann test (Zajac et al., 2011). The material was collected in the summer period in Dnipropetrovsk district, and then transferred to the laboratory in plastic containers at a temperature of 22–24 °C. *S. ransomi* culture is represented by larval stages of freely moving and parasitic forms (Van Wyk and Mayhew, 2013).

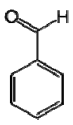
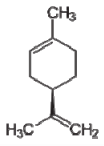
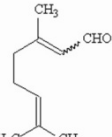
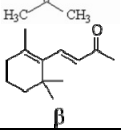
Larvae of first and second stage (freely moving) have a rhabditelike oesophagus with two bulbuses. Their intestinal cells are not distinguishable. The parasitic form (third stage) is distinguished by a filariform oesophagus with no extensions; the intestine does not have cells which can be clearly distinguished through an optical microscope (Fig. 1).

After cultivation, the liquid with the larvae was put in test tubes (10 ml) by 4 ml and was centrifuged for four minutes at 1500 revolutions a minute. 1 ml of sediments with larvae was evenly weighed and put in 0.1 ml portions in plastic containers with a capacity of 1.5 ml. After that, 1 ml of the substance under research was added to the larval culture (20–40 ind.), which then was kept for 24 hours at a temperature of 22–24 °C. Four concentrations (10, 1, 0.1 и 0.01 g/l) of each of the flavouring agents were used in the experiments (Table 1), with eight replications.

Results

The flavouring agents citral, benzaldehyde exhibited the strongest effect on the viability of *S. ransomi* larvae (Table 2).

Table 1Properties and usage of flavouring agents* which were used for establishing the viability level of *S. ransomi* larvae

Name of the substance	Chemical formula	Structural formula	Properties	Content	Usage	
					in food industry	in medicine
Benzaldehyde	C ₆ H ₅ CHO		colourless liquid with odour of bitter almond or of apple pips	cores of kernels of bitter almond, apricot kernels, stones of peaches, cherries, black cherries and other stone fruits, leaves of bird cherry tree, pulp of oyster mushroom (<i>Pleurotus ostreatus</i>)	as food additive	no data concerning usage
D-limonene (1-methyl-4-isopropenylcyclohexene -1)	C ₁₀ H ₁₆		colourless liquid with odour of citrus	many essential oils, including citrus	as food additive	no data concerning usage
Citral (3,7-dimethyl-2,6-octadienal)	C ₁₀ H ₁₆ O		viscous colourless or bright-yellow fluid with odour of lemon	essential oil of lemon grass (citronella), oil of cubeb, lemon essential oil, eucalyptus and some other essential oils	as food additive	antiseptics anti-inflammatory agent, used to relieve intracranial hypertension
Beta-ionone ((3E)-4-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-enyl)but-3-en-2-one)	C ₁₃ H ₂₀ O		has a pleasant flower odour	some essential oils	as food additive	no data concerning usage

Note: * – Official Journal of the European Union, L 354/46 (2008), Sun (2007), Smirnov (2008).

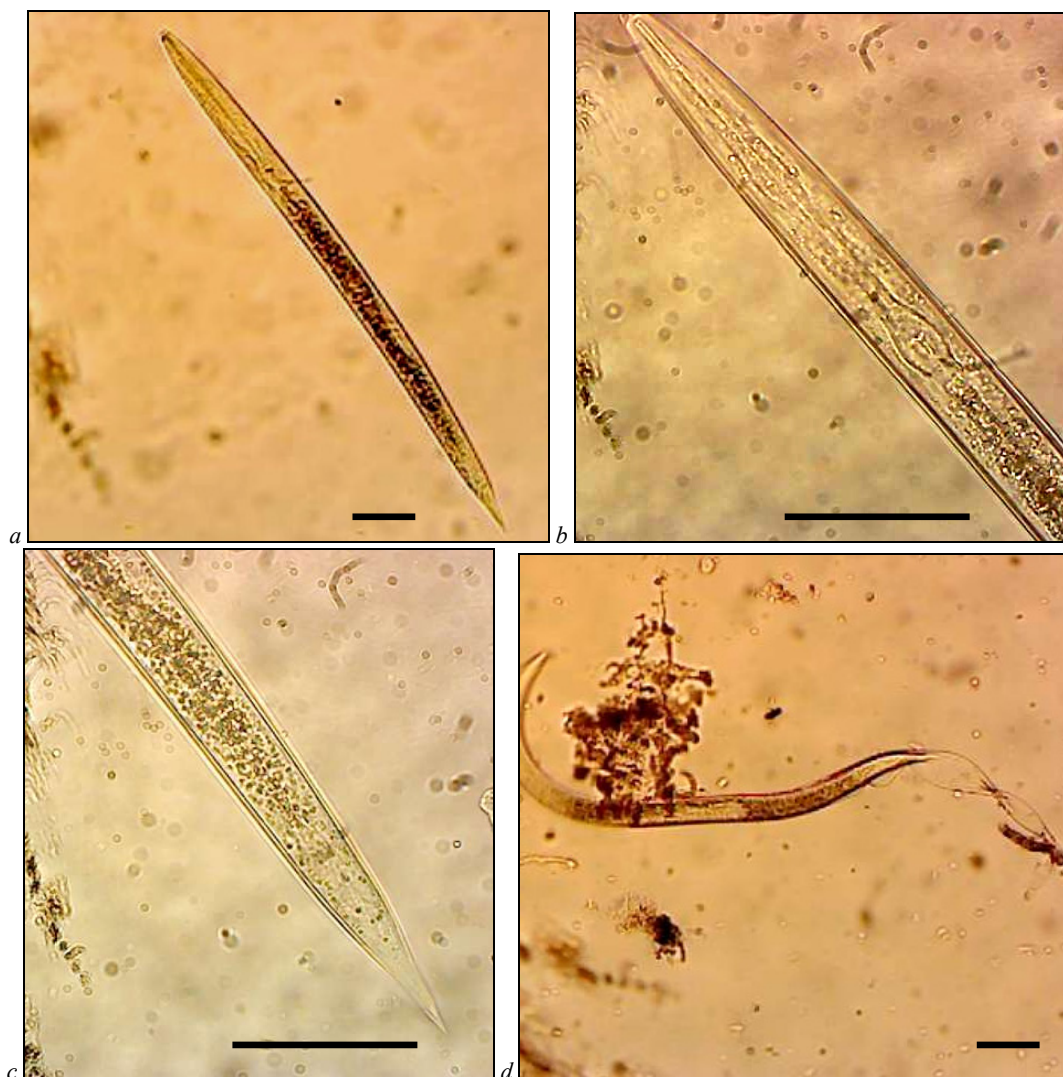


Fig. 1. *S. ransomi* larvae: *a* – noninvasional stage, *b* – filariform oesophagus, *c* – caudal end, *d* – outlet from the cuticle: length of black bar – 50 μ m

Table 2
LD₅₀ (x ± SD) for *S. ransomi* larvae in laboratory experiment

Название вещества	LD ₅₀ , мг/л
Benzaldehyde	142 ± 64
D-limonene	–
Citral	97 ± 36
Beta-ionone	–

Note: «←» – the experiment did not achieve death of 50% larvae (needed concentration of more than 10 g/l).

D-limonene and beta-ionone at the studied concentrations (less than 10 g/m) did not affect the viability of *S. ransomi* larvae significantly, which shows that they are not useful as nematocidal medicines. The maximum effect upon the nematodes at LD₉₀ (Fig. 2a, c) was shown by benzaldehyde at 685 mg/l. In this case, the larvae of the 100% nematodes studied perished in benzaldehyde solutions with a concentration of 1 and 10 g/l. Thus, this substance can be used for further development of veterinary drugs with anthelmintic effect.

Discussion

Nowadays research is being conducted on the extent of effect of flavouring agents on the viability of agents of infection. Chiang et al. (2005) discovered the antiviral function of a broad spectrum of apigenin, linalool and ursolic acid. These substances are extracted from basil, which is familiar in Chinese medicine as a medicinal plant. The antimicrobial function of these compounds such as linalool and citral is well attested. They are capable of inhibiting the growth of pathogenic microorganisms (Sato et al., 2006; Somolinos

et al., 2008; Si et al., 2009; Belletti et al., 2010). Research on the effect of citral on infectious agents also supports the findings from our experiments on the viability of *S. ransomi* larvae. The effect of benzaldehyde and beta-ionone has been insufficiently studied.

For pest control in agriculture a number of authors have suggested using the food flavouring agent cinnamic aldehyde and also acaricidal substances (Knoblauch and Fry, 2011; Na et al., 2011; Shen et al., 2012; Belkind et al., 2013). According to Shen et al. (2012), after using this flavouring agent for 24 hours, LD₅₀ for *Psoroptes* was 107 mg/ml. Na et al. (2011) used it against *Dermatophagoides* of birds: LD₅₀ after 24 hours was 0.54 mg/ml. This substance was also tested by Cheng et al. (2009) against mosquito larvae: during 24 hours LD₅₀ was 40.8 mg/ml (LD₉₀ = 81.7 mg/ml) and 46.5 mg/ml (LC₉₀ = 83.3 mg/ml) for cinnamic aldehyde and cinnamic acetate, respectively. According to Lee et al. (2008), cinnamic aldehyde, benzaldehyde, linalool, limonene, alpha-Terpineol and other flavouring agents have insecticidal properties against *Sitophilus oryzae* (Linnaeus, 1763) (Coleoptera, Curculionidae): LD₅₀ at 48 hours exposure was 0.004–0.200 mg/cm².

As a fungicidal substance it is advised to use E₂₁₀ (Codex Alimentarius), or benzoic acid, which is also included in other food additives, such as E₂₁₁ – Sodium Benzoate, E₂₁₂ – Potassium Benzoate, E₂₁₃ – Calcium dibenzoate (Beerse et al., 2001; Amborabe et al., 2002; Joshi et al., 2008).

Methylparabene is used against fungi, and also as an antiseptic (Shapiro et al., 2002; Posey et al., 2005; Kromidas et al., 2006; Rebbeck et al., 2006; Ishiwatari et al., 2007; Gopalakrishnan et al., 2012). This substance is also included as a preservative in an insecticide aimed at controlling agricultural pests (Bell, 1990).

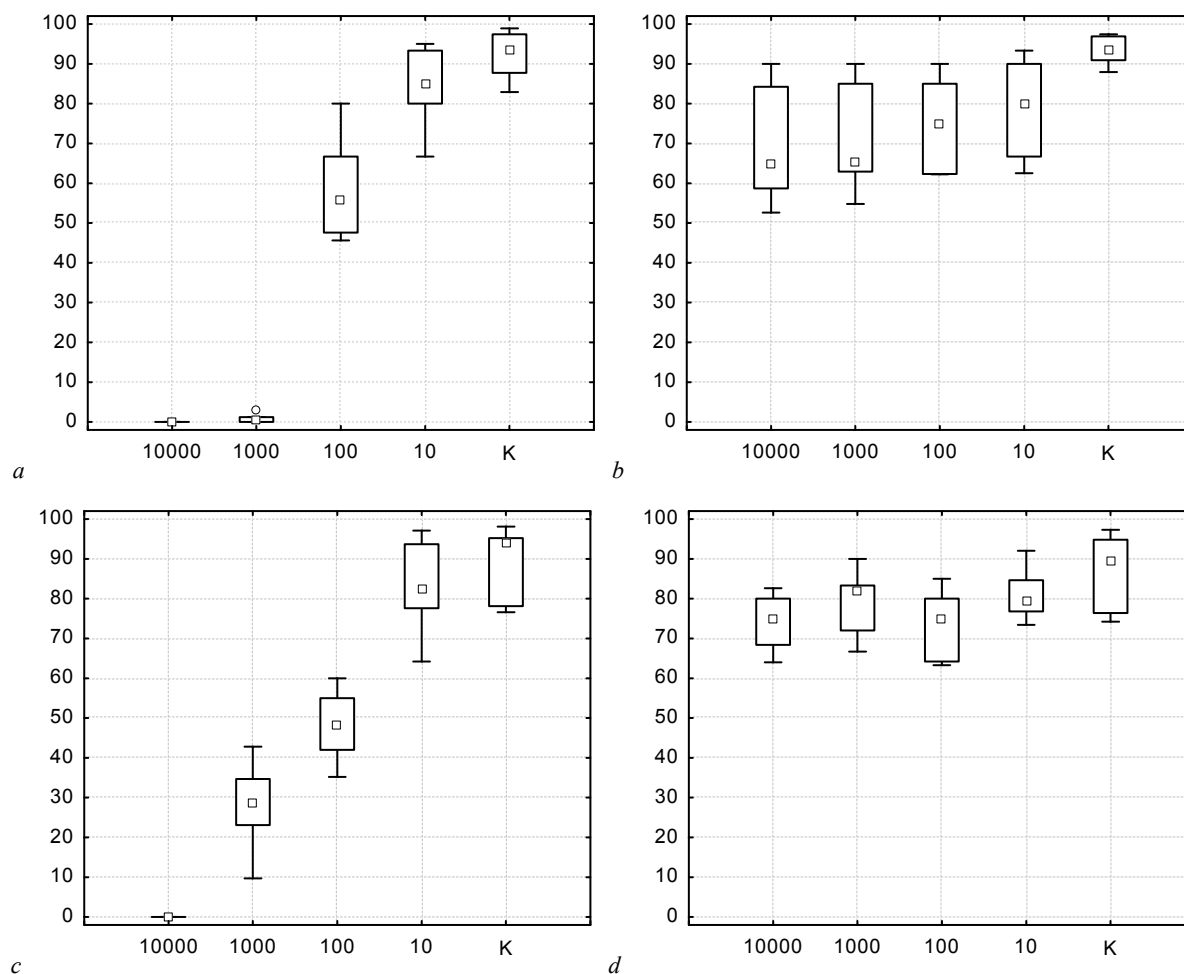


Fig. 2. The effect of benzaldehyde (a), D-limonene (b), citral (c) and beta-ionone (d) on the viability of *S. ransomi* larvae: along the axes of abscissa – variant of experiment (mg/l), along the axes of ordinate – viability of *S. ransomi* larvae during 24 hours of laboratory experiment (%); n = 8 for each variant of experiment

The flavouring agent benzaldehyde also shows insecticidal properties. The negative effect of benzaldehyde upon *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) has been demonstrated. Therefore it is recommended for use in developing new agricultural insecticidal preparations (Ullah et al., 2015). The effect of beta-ionone upon living organisms has received insufficient study. Indeed, the effect of entire groups of flavouring agents upon living organisms requires further study in general.

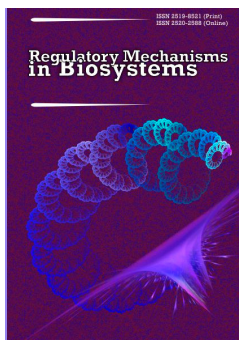
Conclusions

We researched the effect of flavouring agents such as benzaldehyde, citral, D-limonene and beta-ionone upon the viability of *S. ransomi*, parasitic larvae on pigs. We determined the minimum values of LD₅₀ for benzaldehyde and citral. Experimentally, a death rate of 50% of the tested larvae was not achieved using D-limonene and beta-ionone. Food additives with a pleasant flower odour, which are permitted to be used for food, and which are used as cosmetics, are important for evaluating potential new antihelminthic medical and veterinary preparations.

References

- Amborabe, B.-E., Fleurat-Lessard, P., Chollet, J. F., & Roblin, G. (2002). Antifungal effects of salicylic acid and other benzoic acid derivatives towards *Eutypa lata*: Structure – activity relationship. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 1051–1060.
- Beerse, P. W., Biedermann, K. A., Page, S. H., Mobley, M. J., & Morgan, J. M. (2001). Antimicrobial compositions comprising a benzoic acid analog and a metal salt. U.S. Patent No. 6294186. Libertyville, IL, USA.
- Belkind, B. A., Shammo, B., Dickenson, R., Rehberger, L. A., & Heiman, D. F. (2013). Cinnamaldehyde and diallyl disulfide formulations and methods of use. U.S. Patent No. 20130018107. Libertyville, IL, USA.
- Bell, M. (1990). Insecticidal aqueous-based microemulsion compositions. U.S. Patent No. 4904695. Stamford, CT, USA.
- Belletti, N., Kamdem, S. S., Tabanelli, G., Lanciotti, R., & Gardini, F. (2010). Modeling of combined effects of citral, linalool and β-pinene used against *Saccharomyces cerevisiae* in citrus-based beverages subjected to a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 136(3), 283–289.
- Boyko, O. O., Zazharska, N. M., & Brygadyrenko, V. V. (2016). The influence of the extent of infestation by helminths upon changes in body weight of sheep in Ukraine. *Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Ecology*, 24(1), 3–7.
- Burke, J. M., Wells, A., Casey, P., & Kaplan, R. M. (2009). Herbal dewormer fails to control gastrointestinal nematodes in goats. *Veterinary Parasitology*, 160(1–2), 168–170.
- Charlier, J., Duchateau, L., Claerebout, E., Williams, D., & Vercruyse, J. (2007). Associations between anti-*Fasciola hepatica* antibody levels in bulk-tank milk samples and production parameters in dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 78(1), 57–66.
- Cheng, S.-S., Liu, J.-Y., Huang, C.-G., Hsui, Y.-R., Chen, W.-J., & Chang, S.-T. (2009). Insecticidal activities of leaf essential oils from *Cinnamomum osmophloeum* against three mosquito species. *Bioresource Technology*, 100, 457–464.
- Chiang, L.-C., Ng, L.-T., Cheng, P.-W., Chiang, W., & Lin, C.-C. (2005). Antiviral activities of extracts and selected pure constituents of *Ocimum basilicum*. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 32(10), 811–816.
- Cringoli, G., Veneziano, V., Jackson, F., Vercruyse, J., Greer, A. W., Fedele, V., Mezzino, L., & Rinaldi, L. (2008). Effects of strategic anthelmintic treatments on the milk production of dairy sheep naturally infected by gastrointestinal strongyles. *Veterinary Parasitology*, 156(3–4), 340–345.
- Eysker, M., Boerdam, G. A., Hollanders, W., & Verheijden, J. H. M. (1994). The prevalence of *Isospora suis* and *Strongyloides ransomi* in suckling piglets in the Netherlands. *Veterinary Quarterly*, 16(4), 203–205.
- Faye, D., Leak, S., Noulala, S., Fall, A., Losson, B., & Geerts, S. (2003). Effects of gastrointestinal helminth infections and plane of nutrition on the health and productivity of F1 (West African Dwarf × Sahelian) goat crosses in The Gambia. *Small Ruminant Research*, 50(1–2), 153–161.
- Gopalakrishnan, S., Chitra, T. A., Aruna, A., & Chenthihnanathan, A. (2012). Development of RP-HPLC method for the simultaneous estimation of ambroxol hydrochloride, cetirizine hydrochloride and antimicrobial preservatives in combined dosage form. *Scholars Research Library, Der Pharma Chemica*, 4(3), 1003–1015.
- Ishiwatari, S., Suzuki, T., Hitomi, T., Yoshino, T., Matsukuma, S., & Tsuji, T. (2007). Effects of methyl paraben on skin keratinocytes. *Journal of Applied Toxicology*, 27, 1–9.
- Joshi, S. D., Vagdevi, H. M., Vaidya, V. P., & Gadaginamath, G. S. (2008). Synthesis of new 4-pyrrol-1-yl benzoic acid hydrazide analogs and some derived oxadiazole, triazole and pyrrole ring systems: A novel class of potential antibacterial and antitubercular agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43, 1989–1996.
- Knecht, D., Popiolek, M., & Zalesny, G. (2011). Does meatiness of pigs depend on the level of gastro-intestinal parasites infection? *Preventive Veterinary Medicine*, 99(2–4), 234–239.
- Knoblauch, C., & Fry, K. (2011). Non-toxic insecticide. U.S. Patent No. 7956092. Edmonton, Alberta, CA, USA.
- Kromidas, L., Perrier, E., Flanagan, J., Rivero, R., & Bonnet, I. (2006). Release of antimicrobial actives from microcapsules by the action of axillary bacteria. *International Journal of Cosmetic Science*, 28, 103–108.
- Lee, E.-J., Kim, J.-R., Choi, D.-R., & Ahn, Y.-J. (2008). Toxicity of cassia and cinnamon oil compounds and cinnamaldehyde-related compounds to *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Economic Entomology*, 101(6), 1960–1966.
- Lu, C. D., Gangyi, X., & Kawas, J. R. (2010). Organic goat production, processing and marketing: Opportunities, challenges and outlook. *Small Ruminant Research*, 89(2–3), 102–109.
- Maslova, E. N., Sidorova, K. A., Antropov, V. A., & Dragich, O. A. (2015). Otsenka tyazhesti techeniya boleznii pri parazitozakh svinej [Assessment of the severity of the disease in parasitic diseases of pigs]. *Modern Problems of Science and Education*, 3, 1–8 (in Russian).
- Na, Y. E., Kim, S.-I., Bang, H.-S., Kim, B.-S., & Ahn, Y.-J. (2011). Fumigant toxicity of cassia and cinnamon oils and cinnamaldehyde and structurally related compounds to *Dermatophyllum gallinae* (Acari: Dermatophyidae). *Veterinary Parasitology*, 178, 324–329.
- Ponamar, S. I., Shendrik, L. I., Shendrik, C. M., Gugosyan, Y. A., & Shendrik, I. M. (2014a). Izmenenie gematologicheskikh pokazatelej do i posle lecheniya telyat pri strongiloidoze [Changes in hematology parameters before and after treatment of calves reached strongyloidiasis]. *Science and Technology Bulletin of Scientific Research Center for Biosafety and Environmental Control of Agro-Industrial Complex*, 2(2), 112–118 (in Ukrainian).
- Ponamar, S. I., Goncharenko, V. P., Kruchinenko, O. V., & Shendrik, C. N. (2014b). Ehffektivnost' kompleksnogo podkhoda pri postanovke diagnoza na strongiloidoz [Effectiveness of the integrated approach in the diagnosis of strongyloidiasis]. *Scientific Messenger of Veterinary Medicine*, 13, 190–193 (in Ukrainian).
- Ponamar, S. I., Soroka, N. M., & Ponamar, Z. S. (2013). Kompleksnaya ehliotropnaya terapiya svinej pri nematodozakh [Complex ethiotropic therapy for pigs infected by nematodes]. *Veterinary*, 2, 29–31 (in Russian).
- Posey, R., Culbertson, E. C., & Westermeier, J. C. (2005). Clear barrier coating and coated film. U.S. Patent No. 6911255. Greer, SC, USA.
- Rahmann, G., & Seip, H. (2006). Alternative strategies to prevent and control endoparasite diseases in organic sheep and goat farming systems. *Ressortforschung für den Ökologischen Landbau*, 298, 49–90.
- Rebbeck, C., Hammond, R., Wong, J., Nair, L., & Raghavan, N. (2006). Solid-phase extraction and HPLC analysis of methylparaben and propylparaben in a concentrated antibiotic suspension. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 32, 1095–1102.
- Samsonovich, V. A. (2012a). Ehkologicheskie osobennosti ehpizootologii strongiloidoza porosyat [Ecological features of epizootology strongyloidosis pigs]. *Scientific Notes of the Bauman Kazan State Academy of Veterinary Medicine*, 211, 135–138 (in Russian).
- Samsonovich, V. A. (2012b). Vliyanie strongiloidov na morfologicheskij sostav krovi i pokazateli estestvennoj rezistentnosti u porosyat [Influence of *Strongyloides* on the morphological composition of the blood and indicators of natural resistance in pigs]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Series of Agrarian Sciences*, 3, 74–79 (in Russian).
- Sato, K., Krist, S., & Buchbauer, G. (2006). Antimicrobial effect of trans-Cinnamaldehyde, (–)-Perillaldehyde, (–)-Citronellal, Citral, Eugenol and Carvacrol on airborne microbes using an airwasher. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(11), 2292–2294.
- Shapiro, S., Giertsen, E., Guggenheim, B. (2002). An *in vitro* oral biofilm model for comparing the efficacy of antimicrobial mouthrinses. *Caries Research*, 36, 93–100.
- Shen, F., Xing, M., Liu, L., Tang, X., Wang, W., Wang, X., Wu, X., Wang, X., Wang, X., Wang, G., Zhang, J., Li, L., Zhang, J., & Yu, L. (2012). Efficacy of trans-cinnamaldehyde against *Psoroptes cuniculi* *in vitro*. *Parasitology Research*, 110, 1321–1326.
- Si, W., Ni, X., Gong, J., Yu, H., Tsao, R., Han, Y., & Chambers, J. R. (2009). Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards *Clostridium perfringens*. *Journal of Applied Microbiology*, 106(1), 213–220.

- Smirnov, E. V. (2008). Pishhevye aromatizatory [Food flavors]. Profession, Saint Petersburg (in Russian).
- Somolinos, M., Garcia, D., Pagan, R., & Mackey, B. (2008). Relationship between sublethal injury and microbial inactivation by the combination of high hydrostatic pressure and citral or tert-butyl hydroquinone. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(24), 7570–7577.
- Sun, J. (2007). D-Limonene: Safety and clinical applications. *Alternative Medicine Review*, 12(3), 259–264.
- Ullah, I., Latif, A. K., Ali, L., Khan, A. R., Waqas, M., Hussain, J., Lee, I.-J., & Shin, J.-H. (2015). Benzaldehyde as an insecticidal, antimicrobial, and antioxidant compound produced by *Photobacterium temperata*. *Journal of Microbiology*, 53(2), 127–133.
- Van Wyk, J. A., & Mayhew, E. (2013). Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: A practical lab guide. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 80(1), 1–14.
- Veneziano, V., Rubino, R., Fedele, V., Rinaldi, L., Santaniello, M., Schioppi, M., Cascone, C., Pizzillo, M., & Cringoli, G. (2004). The effects of five anthelmintic treatment regimes on milk production in goats naturally infected by gastrointestinal nematodes. *South African Journal of Animal Science*, 34, 238–240.
- Yamov, V. Z., & Antropov, V. A. (2008). Ehpizootologiya gel'mintozov svinej na tyumenskom yuge [Epizootology of pigs helminthosis in the south of Tyumen]. *Agricultural Messenger of Ural Veterinary Science*, 47, 70–71 (in Russian).
- Zajac, A. M., & Conboy, G. A. (eds.) (2011). *Veterinary clinical parasitology*, 8th ed. John Wiley and Sons, UK.



Research on acute and chronic toxicity of the experimental drug Amprolinsyl

B. Gutyj, I. Khariv, V. Binkevych, O. Binkevych, N. Levkivska, D. Levkivskyj, Y. Vavrysevich

Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named after S. Z. Gzhytskyj, Lviv, Ukraine

Article info

Received 08.01.2017

Received in revised form
30.01.2017

Accepted 05.02.2017

Lviv National University
of Veterinary Medicine
and Biotechnologies
named after S. Z. Gzhytskyj,
Pekarska Str., 50,
Lviv, 79010, Ukraine
Tel. +38-068-136-20-54
E-mail: bvh@ukr.net

Gutyj, B., Khariv, I., Binkevych, V., Binkevych, O., Levkivska, N., Levkivskyj, D., & Vavrysevich, Y. (2017). Research on acute and chronic toxicity of the experimental drug Amprolinsyl. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(1), 41–45. doi: 10.15421/021708

The drug Amprolinsyl is a mixture of hydrochloric amprolium (12.5 g) and milled fruits of the milk thistle (up to 100 g), designed to prevent and treat protozooses in birds, especially when mixed associative invasions occur. The fruits of the milk thistle contain the natural vitamins (A, C, E, B) and the minerals (copper, iron, cobalt) and other factors that significantly expand and enhance the pharmacological effect of the drug Amprolinsyl. We found that when the drug Amprolinsyl was administered intra gastrically to white rats at a dose of 5000 mg/kg and higher clinical signs of toxicity occurred after 4–5 hours. Damage to motor activity and tremors of individual muscles of these animals was observed. The rats died after 1–4 days. A direct relationship was found between the drug at a specific dosage and the death of rats. After intra gastric administration of the drug Amprolinsyl to white rats clinical signs of toxicity appeared after 5–6 hours at a dose of 4000 mg/kg body weight. These animals attempted to gather in groups and to hide in the bedding. The death of the mice occurred in 1–3 days. Thus, LD₅₀ drug of Amprolinsyl following intra gastric administration to white rats was 5,917 and for white mice 5,167 mg/kg. After studying the cumulative properties of Amprolinsyl, it was found that the total drug administered in average doses was 831 mg/kg, and the cumulative rate – 8.31. Long-term daily intragastric administration of Amprolinsyl over 24 days affected the functional state of the liver and kidneys. The magnitude of weight ratios of lungs, heart and spleen during the research period was the same as in the control group of rats. Significant changes were found only after analyzing the leukocyte profile. A reduction was observed in the number of neutrophils to 54.7% and an increase in the number of lymphocytes to 9.2%. Following prolonged daily administration of increasing doses Amprolinsyl causes a slight degradation of the membranes of hepatocytes, which indicates increased activity of aminotransferases. When investigating the chronic toxicity of Amprolinsyl it was found that at doses of 1/50 LD₅₀, and 1/100 LD₅₀ the drug had no effect on the results of functional tests, due to the normal functioning of the liver tissue and the lack of negative impact on animals in the 3rd and 4th groups. Administration of the drug at doses of 1/20, 1/50 and 1/100 LD₅₀ over 30 days did not significantly affect the functional state of the internal organs of the experimental animals. When investigating the morphological blood parameters of the rats following oral administration of Amprolinsyl at different doses a downward trend in the haemoglobin and colour index value and a likely reduction in the number of white blood cells, compared to the control group was observed in all experimental groups. According to the values of haematological and biochemical parameters, it was established that in spite of the low toxicity of Amprolinsyl at doses of 1/20 and 1/50 LD₅₀ the drug had an effect on lipid metabolism, as was shown following the increase of glycerol.

Keywords: pharmacology; accumulation; toxicity; amprolium; milk thistle; rats; mice; turkeys

Introduction

In our previous studies (Khariv, 2010) we found that in treating coccidiosis and histomoniasis in turkeys Brovitacoccid with total use of milk thistle fruits showed a high level of therapeutic efficiency. Brovitacoccid is a 12.5% premix containing: 12.5 g of hydrochloric amprolium, vitamin A – 1 million IU, Vitamin K – 200 mg, corn flour up to 100 g. Amprolium is an anticoccidiosis preparation of benzimidazole (Gibbon et al., 2016). In the bodies of *Eimeria* amprolium blocks the metabolism of glucose-6-phosphate dehydrogenase, which leads to disorders in the carbohydrate metabolism and death of the parasites (Joyner, 1970; McDougald and Galloway, 1973; Chapman, 1982; McDougald and Seibert, 1998; Nweze and Obiwulu, 2009). In the small intestine where *Eimeria* parasites are located, epithelial cells of the mucosa are destroyed. This leads to catarrhal inflammation, *Eimeria* toxins delay blood clotting, so in the complex preparation Brovitacoccid

vitamin K is present, which acts as a haemocoagulant and generates vitamin A, which activates the regeneration of the epithelium of the mucous membranes. Several experimental studies have found that the protozoan infestations suppress the immune system, resulting in the development of secondary immunodeficiency in animals and birds. In these animals, protozoan infestation was complicated with viral and bacterial microflora (McLoughlin, 1970; Chapman, 1976; Platzer et al., 2005; Rosadio et al., 2010; Bangoura et al., 2014; Chapman and Jeffers, 2014). In our studies of healthy turkeys it was found that Brovitacoccid even at a therapeutic dose (2 g/kg feed) suppressed the immune system of birds. Given the above immunosuppressive effect of Brovitacoccid, we have developed a method of treatment for turkeys using Brovitacoccid together with the fruits of the milk thistle – 2 g/kg feed of both drugs over 5 days. The high therapeutic efficiency of milk thistle fruit is engendered by the flavinoid group “silymarin” (Khariv and Gutyj, 2016; Khariv et al., 2016; Martyschuk et al., 2016). This blocks excessive lipid

peroxidation and protects cell membranes from aggressive forms of oxygen. All this ensures the strong hepatoprotective and antioxidant action of the drug.

Another essential component of milk thistle fruit is the wide range and high level of its vitamins. In particular, vitamin C (ascorbic acid) activates the synthesis of antibodies – immunoglobulin classes IgA and IgM. Vitamin C enhances the activity component, enhances immune function and increases the nonspecific interferon parts of the immune defense of the body against bacterial infections (Gutyj et al., 2016; Lavryshyn et al., 2016; Smolynets et al., 2016). Vitamin K, which is part of the thistle, ensures stable blood clotting, and provides the minerals copper, iron and cobalt which are involved in erythropoiesis. Vitamins A and E provide quick regeneration of the intestinal epithelium affected by *Eimeria* (Khariy, 2010).

As a result of detailed study of the pharmacodynamics of Brovitacoccid and fruits of milk thistle in the treatment of birds affected with *Eimeria* and histomonads, we have developed the drug Amprolinsyl. This product contains amprolium – an anti-*Eimeria* agent and silymarin – an antioxidant, hepatoprotective and immunostimulation agent. Amprolinsyl is intended for the prevention and treatment of protozooses in birds, especially mixed associative invasions. For prevention, it should be administered at 1 g/kg of feed, for therapeutic use at 2 g/kg of feed. Like Brovitacoccid, Amprolinsyl contains hydrochloric amprolium with antiprotozoan action. Instead of synthetic vitamins A and C, the drug Amprolinsyl contains ground fruits of the milk thistle containing natural vitamins (A, C, E, B) and minerals (copper, iron, cobalt etc.), which greatly expand and enhance its pharmacological effect. In accordance with the guidelines of the pre-clinical study of drugs, every new drug must be examined for the following indicators: determination of the toxicity of the Amprolinsyl bioassay to infusoria; establishment of the toxicity of Amprolinsyl in laboratory animals after a single administration (acute toxicity); exploration of the cumulative properties of the drug on white rats; investigation of the toxicity of Amprolinsyl in laboratory animals after long-term administration (chronic toxicity) in order to study the efficiency of Amprolinsyl. The study was conducted in accordance with the recommendations “Toxicological control of new means of protecting animals” and “Preclinical studies of veterinary medicines”.

The aim of research was:

- 1) to determine the toxicity of Amprolinsyl with laboratory animals after a single administration (“acute toxicity”);
- 2) to investigate the cumulative properties of the drug with white rats;
- 3) to establish the toxicity of Amprolinsyl with laboratory animals when it was administered over a long period (chronic toxicity).

Materials and methods

Setting the acute toxicity of the drug. Experiments to study the acute toxicity of Amprolinsyl were performed on 30 white rats, 2–3-months of age, weighing 170–190 g and 30 white mice, 2–3-months of age, weighing 19–22 g. The drug was injected once into the empty stomachs of the test animals using a metal probe. The experiment was conducted on 5 groups of animals, each consisting of 6 animals. The drug was administered to laboratory animals in the following doses: white rats 4,000, 5,000, 6,000, 7,000, 8,000 mg/kg active ingredient (a. i.) and white mice – 3,000, 4,000, 5,000, 6,000, 7,000 mg/kg (a. i.). The studies of acute toxicity of Amprolinsyl for young turkeys were performed on birds 25 days old, weighing 1,000–1,200 g. The drug was administered into the goiter of the research turkeys at doses of 5, 25 and 50 g/kg of body weight of birds. The high dose was administered in small installments at intervals of 2–3 hours. Following administration of the drug, monitoring observation of the laboratory animals and poultry lasted for 14 days. On the first day of the experiment the animals were under constant surveillance. Then we took into account the following indicators: general condition, appearance, behaviour of the animals, intensity and nature of the mobile activity, presence of

convulsions, coordination, response to external stimuli (tactile, sound, light), the condition of the hair, visible mucous membranes, reaction to the food, rhythm, respiratory rate, time of occurrence and nature of intoxication, its severity, course, the death or recovery of the animals. During the experiment attention was paid to the loss of laboratory animals and, depending on the action of the drug at particular dosages the average dose (LD_{50}) of the dosage form was calculated by the method of G. Koerber.

LD_{50} was calculated using the formula:

$$LD_{50} = LD_{100} = -\Sigma(z d)/m,$$

where DL_{100} – the dose that killed all the animals, Σ – the symbol of sum, z – half the total number of animals that died from the effects of the researched drug in the following two doses, d – difference of two subsequent doses, m – the number of animals in the group at each dose.

The study of cumulative properties. Properties on the drug accumulation were studied with 12 white rats weighing 140–150 g. The rats were divided into two groups: control and experimental. To determine the degree of accumulation of the drug we used method of K. S. Lima et al. (1961). The drug was injected into the experimental animals, daily on an empty stomach, once intragastrically using a metal probe for laboratory rats. The drug was administered in large doses every day in small portions at intervals of 2 to 4 hours between doses. The experiment lasted for 24 days. Amprolinsyl was administered to rats at doses ranging from 0.1 LD_{50} , the dose being increased by 1.5 times every 4 days. At the end of the experiment the dose of Amprolinsyl was 0.50–0.75 LD_{50} . During the experiment the general condition and death rate of rats was assessed. Depending on the dose, the cumulative rate was calculated according to the formula proposed by Kahan and Stankevych (1964):

$$K_{cum} = LD_{50} n / LD_{50} l,$$

where K_{cum} is cumulation coefficient, $DL_{50} n$ and $DL_{50} l$ – mortal middle dose for multiple and single injection, respectively. To identify the impact of the drug in the above dosage on the body at the end of the experiment, at the end of the next day after the final administration of Amprolinsyl the animals from each group were weighed and then decapitated under conditions of mild ether anesthesia and their blood samples were taken for haematological and biochemical studies. After dissection of the animals, the internal organs were extracted and weighed, and the ratios of weight compared to the control group were calculated.

Study of toxicity Amprolinsyl in chronic experiment. In the study of chronic toxicity we were guided by the results obtained in the course of acute toxicity. The drug was administered daily by intramuscular injection. During the experiment we monitored the clinical condition and behaviour of the animals.

Chronic toxicity was studied with 40 white rats weighing 90–110 g. They were formed into 4 groups of 10 rats equal in number and weight. The first (I) group was the control animals' group. They were injected with isotonic sodium chloride solution. Animals from other three groups were administered Amprolinsyl at the following doses: Group II – 1/20 LD_{50} , Group III – 1/50 LD_{50} and Group IV – 1/100 LD_{50} . In the chronic experiment Amprolinsyl was administered to rats for 30 days.

On 31st day from the start of administration, the detoxification of liver function was measured for 5 rats from each group using hexenal tests (Rozin, 1964). For this, the laboratory animals were injected intraperitoneally with 1% solution of hexenal at a dose of 45 mg/kg. Then we recorded the average sleep time from the moment when the animal took the side position.

At the same time, the other 5 rats were subjected to the M. L. Rylova swimming test. For this experiment, a glass aquarium was used. The column of water in the tank was 50 cm. Water temperature – 12–13 °C. The experimental animals were weighted with objects (metal batch) – 5% of body weight. Before the experiment, the rats were weighed and the abovementioned weight load was attached to their tails. Then both experimental and control animals of about the same weight were placed into the tank. We then made a constant observation of the animals swimming. The indicator of efficiency was how long the animals could survive in the water.

The animals swam until they sank to the bottom without resurfacing. On the next day, the laboratory animals were decapitated under light ether anesthesia, and haematological and biochemical investigations made using the commonly recognized methods and their body mass as compared to the control group established.

Mathematical processing of the research results was statistically worked out using the software package Statistica 6.0. The average values of the data were considered statistically significant at $P < 0.05$ (ANOVA).

Results

Setting the acute toxicity of the drug. We found that intragastric administration of the drug Amprolinsyl to white rats, at a dose of 5,000 mg/kg and higher caused onset of clinical signs of intoxication after 4–5 hours, which was marked by poor coordination of movements and tremor of individual muscles. The death of the animals took place within 1–4 days. The number of dead animals was in direct proportion to the dose of the drug. The research data and calculations LD_{50} drug are presented in Table 1.

Table 1
Average lethal dose of Amprolinsyl for white rats following intra gastric administration after calculation by G. Kerber method

Drug, mg/kg	4000	5000	6000	7000	8000
survivors	6	4	3	1	0
dead	0	2	3	5	6
Z	1.0	2.5	3.5	5.5	
d	1000	1000	1000	1000	
z d	1000	2500	3500	5500	

$$DL_{50} = 8000 - [(1000 + 2500 + 3500 + 5500) : 6] = 5916,7 \text{ mg/kg.}$$

So, LD_{50} of the drug Amprolinsyl for intra gastric administration of white rats is 5,917 mg/kg. After intragastric introduction to white mice, it was found that the drug Amprolinsyl at a dose of 4,000 mg/kg and higher brought clinical signs of toxicity after 5–6 hours, and was marked by poor coordination of movements and tremor individual muscles. The animals stayed together in a group and tried to hide in the bedding. The deaths of the mice occurred over 1–3 days in direct proportion to the particular dosage of the drug (Table 2).

Table 2
Average lethal dose of Amprolinsyl for white mice following intra gastric administration after calculation by G. Kerber method

Drug, mg/kg	3000	4000	5000	6000	7000
survivors	6	5	3	2	0
dead	0	1	3	4	6
Z		0.5	2.0	3.5	5.0
d		1000	1000	1000	1000
z d		500	2000	3500	5000

$$LD_{50} = 7000 - [(500 + 2000 + 3500 + 5000) : 6] = 5166,7 \text{ mg/kg.}$$

So, LD_{50} drug of Amprolinsyl after intragastric administration to white mice is 5,167 mg/kg. Introduction of drug to turkeys in doses of 5, 25 and 50 g/kg body weight did not cause the death of the birds during the period of the experiment. After administration of the drug at a dose of 50 g/kg the turkeys experienced a sharp depression, refusal to feed and lost their response to stimuli. On the following day, the state of birds is greatly improved, and by the 3–4th day changes in the clinical condition of the experimental animals compared with the control group were not registered. LD_{50} for internal intragastric introduction to laboratory animals of Amprolinsyl (white mice and rats) is 5,000 mg/kg.

The study of cumulative properties. Study was conducted on the properties of cumulative doses of Amprolinsyl following the death of the experimental animals. The total introduction of the drug in high doses was 831.25 mg/kg and the maximum accumulation was under 8.31, indicating mild to cumulative properties of the drug. We set reduction coefficients of liver weight to 5.0% and right

kidney by 5.2% after long-term oral administration of Amprolinsyl to rats in increasing doses (Table 3).

The magnitude of weight ratios of lungs, heart and spleen for the research period was the same as in the control group of rats. Thus, prolonged daily intragastric administration of Amprolinsyl over 24 days affected the functional state of the liver and kidneys. After study of the morphological parameters of rats' blood after oral administration of Amprolinsyl in increasing doses, we established that the main parameters of the blood of the research group were the same as in the rats in the control group (Table 4).

Significant changes were found only after analyzing the leukocyte profile. We found a probable decrease, as compared with the control group, in the number of neutrophils by 54.7% and increase by 9.2% in the number of lymphocytes. It was established that long-term administration of the drug at increasing doses significantly influenced some biochemical parameters of the experimental animals (Table 5). Thus, ALT activity significantly increased compared to rats in the control group to 14.6%, and alkaline phosphatase – decreased by 39.9%. We found a significant increase in serum compared with the control group, the level of glycerol to 46.1% of total lipids – by 27.9% and total cholesterol – by 21.6%, which points to increased lipid metabolism in the body of the experimental rats. Thus, Amprolinsyl, when provided over a long period (24 days) in daily administration of increasing doses causes a slight degradation of the membranes of hepatocytes, which indicates increased activity of the intracellular enzyme ALT.

Table 3
Factors of internal organ mass of white rats in studying the cumulative properties of Amprolinsyl ($M \pm m$, $n = 12$)

Internal organs	Control	After the 24 th day
Lungs	8.9 ± 0.50	8.1 ± 0.87
Liver	41.5 ± 2.15	39.4 ± 1.00
Right kidney	3.8 ± 0.17	3.6 ± 0.08
Left kidney	3.6 ± 0.22	3.4 ± 0.11
Heart	3.7 ± 0.17	3.62 ± 0.11
Spleen	5.5 ± 0.70	5.0 ± 0.24

Table 4
The morphological parameters of blood of white rats at the 24th day of the experiment studying the cumulative properties of Amprolinsyl ($M \pm m$, $n = 12$)

Indices	Group	
	control	the 24 th day
Hemoglobin, g/l	116.8 ± 6.29	117.5 ± 3.68
Red blood cells, T/L	7.7 ± 0.70	8.56 ± 0.78
Hematocrit, %	36.7 ± 0.01	40.0 ± 1.29
Colour indicator	0.47 ± 0.04	0.42 ± 0.03
The average content of hemoglobin, pg	31.8 ± 1.15	29.7 ± 0.37
The average volume of red blood cells, mkm ³	49.8 ± 4.56	40.0 ± 1.29
White blood cells, D/L	10.0 ± 1.19	11.8 ± 3.52
Eosinophils, %	0.01 ± 0.001	0.01 ± 0.001
Neutrophils, %	15.0 ± 1.83	6.8 ± 0.80*
Lymphocytes, %	83.5 ± 1.66	91.2 ± 1.46*
Monocytes, %	1.8 ± 0.37	2.5 ± 0.86

Table 5
Biochemical parameters of blood of white rats at the end of the experiment to determine the cumulative properties of Amprolinsyl ($M \pm m$, $n = 12$)

Indices	Animals' group	
	control	The 24 th day
Total protein, g/l	8.40 ± 0.25	7.40 ± 0.39
ALT, mkkat/l	0.41 ± 0.04	0.47 ± 0.01*
AST, mkkat/l	0.66 ± 0.04	0.70 ± 0.03
LF, mkkat/l	1.48 ± 0.07	0.89 ± 0.06*
Glycerol, mmol/L	1.02 ± 0.11	1.49 ± 0.12*
Lipids general, g/l	2.19 ± 0.15	2.80 ± 0.14*
Cholesterol general, mmol/L	5.65 ± 0.58	6.87 ± 0.45*
Cholesterol free, mmol/L	2.12 ± 0.13	2.09 ± 0.11
Glucose, mg/l	4.97 ± 0.12	5.52 ± 0.52

Study of toxicity of Amprolinsyl in chronic experiment.

After conducting experiments to study the chronic toxicity the death of rats was not registered. On the 30th day of the experiment, after the introduction of the drug in doses 1/20, 1/50 and 1/100 LD₅₀, probable variation of the mass of internal organs compared with the control group was not shown (Table 6).

A statistically significant ($P < 0.05$) increase in the average sleep time and decrease in the average swimming time ($P < 0.05$) was found in two groups of animals. These changes indicate damage to detoxification of liver function in the context of overall depressing effect on the body caused by long-term administration of the drug at a dose 1/20 LD₅₀. The drug doses 1/50 and 1/100 LD₅₀ had no effect on the results of functional tests, due to the normal functioning of the liver tissue and the lack of negative impact on animals of the 3rd and 4th groups. On the 30th day of the experiment, after the introduction of the drug at doses 1/20, 1/50 and 1/100 LD₅₀ probable variation of the mass of internal organs compared with the control group was not shown (Table 7).

Thus, the drug Amprolinsyl after administration at doses 1/20, 1/50 and 1/100 LD₅₀ over 30 days did not significantly affect the functional state of the internal organs of the experimental animals. After researching morphological blood parameters in rats after oral administration of Amprolinsyl at different doses, we established a

downward trend in hemoglobin and colour index value and a likely reduction in the number of white blood cells, compared with the control group, in all experimental groups (Table 8).

Table 6
Results of functional tests ($M \pm m$, $n = 20$)

Animal's group	Drug in a dose	Hexenal test, average sleeping time, min	Swimming test, average swimming time, min
1	control	28.8 ± 1.66	12.8 ± 1.51
2	1/20 LD ₅₀	35.8 ± 1.67*	9.1 ± 1.37*
3	1/50 LD ₅₀	31.1 ± 0.66	11.3 ± 1.89
4	1/100 LD ₅₀	29.9 ± 1.89	13.0 ± 1.59

So, after the introduction of Amprolinsyl at a dose of 1/20 LD₅₀ the leukocyte count decreased by 35.1%, and at doses 1/50 LD₅₀ and 1/100 LD₅₀ by 34.7% and 39.3% respectively. In the fourth group after using Amprolinsyl at a dose 1/100 LD₅₀ we found a likely increase in the number of red blood cells, and tendency to increase in the average content of hemoglobin, resulting in colour index value which was significantly lower compared with the control group, by 19.2%. An analysis of the leukocyte profile showed a probable 3–6 fold increase in the number of eosinophils in all experimental groups compared with the control group.

Table 7
Factors mass of internal organs of white rats on the 30th day of the study of chronic toxicity of Amprolinsyl ($M \pm m$, $n = 6$)

Internal bodies	Animal group			
	control	1/20 LD ₅₀	1/50 LD ₅₀	1/100 LD ₅₀
Lungs	8.8 ± 0.54	8.5 ± 0.54	7.7 ± 0.63	7.7 ± 0.22
Liver	41.5 ± 2.14	41.5 ± 2.16	43.5 ± 2.02	40.2 ± 0.78
Right kidney	3.8 ± 0.17	3.6 ± 0.16	3.7 ± 0.08	3.4 ± 0.05
Left kidney	3.6 ± 0.22	3.7 ± 0.18	3.6 ± 0.88	3.3 ± 0.87
Heart	3.7 ± 0.17	3.9 ± 0.26	3.7 ± 0.16	3.6 ± 0.19
Spleen	5.5 ± 0.70	5.8 ± 0.39	6.7 ± 0.22	4.8 ± 0.19

Table 8
The morphological parameters of white rats' blood on the 15th day of the experiment studying the chronic toxicity of Amprolinsyl ($M \pm m$, $n = 24$)

Indicess	Animal group			
	control	1/20 LD ₅₀	1/50 LD ₅₀	1/100 LD ₅₀
Hemoglobin, g/l	116.8 ± 6.29	104.2 ± 7.98	108.3 ± 8.47	114.3 ± 6.89
Red blood cells, T/L	7.7 ± 0.70	7.5 ± 0.49	8.0 ± 0.6	9.2 ± 0.94*
Hematocrit, %	37.7 ± 1.28	32.2 ± 1.93	33.0 ± 1.78	33.3 ± 1.65
Colour indicator	0.47 ± 0.04	0.41 ± 0.01	0.42 ± 0.05	0.38 ± 0.04*
The average content of hemoglobin, pg	31.8 ± 1.15	32.3 ± 1.63	33.5 ± 2.99	38.9 ± 3.53
The average volume of red blood cells, mkm ³	49.8 ± 4.56	43.6 ± 2.32	41.7 ± 2.43	37.4 ± 4.43
White blood cells, D/L	10.01 ± 1.19	6.50 ± 1.12*	6.54 ± 0.68*	6.08 ± 1.12*
Eosinophils, %	0.2 ± 0.01	0.66 ± 0.06*	0.67 ± 0.03*	0.33 ± 0.03*
Neutrophils, %	15.0 ± 1.83	11.83 ± 1.97	12.8 ± 3.02	11.75 ± 2.39
Lymphocytes, %	83.0 ± 1.66	85.5 ± 2.4	84.6 ± 2.82	86.0 ± 2.7
Monocytes, %	1.8 ± 0.37	2.4 ± 0.37	1.67 ± 0.67	2.0 ± 0.71

Table 9
Biochemical parameters of white rats' blood on the 30th day of the experiment studying the chronic toxicity of Amprolinsyl ($M \pm m$, $n = 24$)

Indices	Animal group			
	control	1/20 LD ₅₀	1/50 LD ₅₀	1/100 LD ₅₀
Total protein, g/l	8.4 ± 0.25	8.8 ± 0.78	9.0 ± 0.29	9.7 ± 0.47*
ALT, mkkat/l	0.41 ± 0.04	0.35 ± 0.03	0.42 ± 0.02	0.43 ± 0.03
AST, mkkat/l	0.66 ± 0.04	0.74 ± 0.02	0.76 ± 0.02	0.80 ± 0.12
LF, mkkat/l	1.48 ± 0.07	1.47 ± 0.05	1.52 ± 0.03	1.60 ± 0.16
Glycerol, mmol/L	1.0 ± 0.11	1.6 ± 0.33	1.1 ± 0.08	1.4 ± 0.10
Lipids general, g/l	2.19 ± 0.15	3.35 ± 0.26**	2.7 ± 0.15*	2.6 ± 0.13
Cholesterol general, mmol/L	5.65 ± 0.58	5.11 ± 0.58	5.23 ± 0.26	5.54 ± 0.42
Cholesterol free, mmol/L	2.12 ± 0.13	2.02 ± 0.07	1.95 ± 0.07	2.12 ± 0.06
Glucose, mg/l	4.97 ± 0.12	4.83 ± 0.14	4.85 ± 0.28	4.29 ± 0.19*

After administration of Amprolinsyl at doses of 1/20 and 1/50 LD₅₀ the rats' serum level was quite high, glycerol – by 52.9% and 23.3% higher than in the control group of rats. Significant changes of total and free cholesterol in the blood serum of the experimental animals was registered (Table 9). Rats which were administered the drug at a dose 1/100 LD₅₀ had total protein level that increased by 15.5% while glucose was significantly lower by 13.7% compared to

the rats in the control group. So, after studying the action of Amprolinsyl at toxic doses in a chronic experiment, the values of haematological and biochemical parameters revealed that, despite the low toxicity, Amprolinsyl at doses of 1/20 and 1/50 LD₅₀ affects lipid metabolism indicating an increase in glycerol. Amprolinsyl at doses higher than therapeutic, affects the hematopoietic function (reducing the number of white blood cells in all experimental groups).

Discussion

Considering the pathogenesis of *Eimeria* and *Histomonas* invasion, the treatment of poultry should be causal and pathogenetic. For etiotropic treatment it is necessary to free the body of the bird from parasites. Among the wide range of anti-*Eimeria* drugs available today, the most effective is Brovitacoccid of domestic production (McLoughlin, 1970; Chapman, 1976; Khariv, 2010; Rosadio et al., 2010; Gibbons et al., 2016). During the second phase of treatment it is necessary to use medicines that activate the hematopoietic function of bone marrow, restore liver function, stabilize the state of the cell membranes of hepatocytes and enhance cellular, humoral and nonspecific parts of the immune system. In the range of immunostimulatory and hepatoprotective drugs a prominent position is occupied by herbs which are used for treating a variety of diseases caused by the weakening of endogenous antioxidant defence, secondary immunodeficiency and related disorders in homeostasis (Gutyj et al., 2016; Martyshuk et al., 2016; Smolynets et al., 2016). Based on reports in the literature and our own researches on healthy turkeys and those affected by *Eimeria* and *Histomonas* invasion, we found that among the most effective hepatoprotectors the fruits of milk thistle merit special attention. They contain flavonoids – silycristin, silidianin, silibilin, united under the title “Silymarin” (Khariv, 2010; Gutyj et al., 2016). Flavonoids act hepatoprotectively, stabilize the state of cell membranes and activate protein synthesis liver function. It should be noted that in the fruit of milk thistle there is a wide range of vitamins (A, E, K, C, B), macro (K, Ca, Mg), micronutrients (Cu, Co, Fe, J, Si), and essential and inessential amino acids involved in metabolism and erythropoiesis, stimulating the formation of antibodies and raising immune health (Khariv et al., 2016; Martyshuk et al., 2016).

Conclusions

This study of the acute toxicity of the antiprotozoan drug Amprolinsyl, which has been recently developed in Ukraine, using laboratory animals concerns a drug of low toxicity (the 4th grade of toxicity State ST 12.1.007-76). Long-term daily intragastric administration of Amprolinsyl during 24 days affects the functional state of the liver and kidneys. We studied of morphological parameters of the blood of rats by oral administration of Amprolinsyl in increasing doses, and established that the main parameters of blood in the research group were the same as in the control group of rats, significant changes were found only after analyzing the leukocyte profile. We established that there was a probable decrease as compared with the control group, in the number of neutrophils by 54.7% and increase by 9.2% in the number of lymphocytes. Amprolinsyl, under long-term (24 days) daily administration of increasing doses causes a slight degradation of the membranes of hepatocytes, which indicates increased activity of the intracellular enzyme ALT.

Amprolinsyl at doses 1/50 and 1/100 LD₅₀ had no effect on the results of functional tests, due to the normal functioning of the liver tissue and the lack of negative impact on animals in the 3rd and 4th groups. Amprolinsyl after administration at doses 1/20, 1/50 and 1/100 LD₅₀ over 30 days did not significantly affect the functional state of the internal organs of the experimental animals.

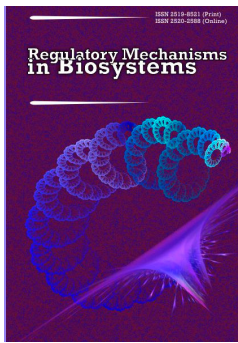
The study of the morphological parameters of rats' blood following oral administration of Amprolinsyl at different doses established a downward trend in hemoglobin values and the colour indicator and a probable reduction in the number of white blood cells in all experimental groups compared with the control group.

According to hematological and biochemical parameters we revealed that, despite the low toxicity of Amprolinsyl at doses of 1/20 and 1/50 LD₅₀ the drug affects lipid metabolism, which indicates increase in glycerol.

References

Bangoura, B., Alnassan, A. A., Lendner, M., Shehata, A. A., Krüger, M., & Daugschies, A. (2014). Efficacy of an anticoccidial live vaccine in

- prevention of necrotic enteritis in chickens. *Experimental Parasitology*, 145, 125–134.
- Chapman, H. D. (1976). Studies on the mode of action of anticoccidial drugs in the chicken and chicken embryo. *Veterinary Parasitology*, 1(4), 299–308.
- Chapman, H. D. (1982). The treatment of coccidiosis: Studies on the sensitivity of recent field isolates of *Eimeria acervulina* type to anticoccidial drugs given in the drinking water. *Journal of Comparative Pathology*, 92(2), 213–218.
- Chapman, H. D., & Jeffers, T. K. (2014). Vaccination of chickens against coccidiosis ameliorates drug resistance in commercial poultry production. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 4(3), 214–217.
- Gibbons, P., Love, D., Craig, T., & Budke, C. (2016). Efficacy of treatment of elevated coccidial oocyst counts in goats using amprolium versus ponazuril. *Veterinary Parasitology*, 218, 1–4.
- Gutyj, B. V., Hufriy, D. F., Hunchak, V. M., Khariv, I. I., Levkivska, N. D., & Huberuk, V. O. (2016). The influence of metisevit and metifen on the intensity of lipid peroxidation in the blood of bulls on nitrate load. *Scientific Messenger LNUVMBT named after S.Z. Gzhytskyj*, 18(3), 67–70.
- Gutyj, B. V., Murs'ka, S. D., Gufriy, D. F., Hariv, I. I., Levkiv'ska, N. D., Nazaruk, N. V., Gajdjuk, M. B., Pryjma, O. B., Bilyk, O. J., & Guta, Z. A. (2016). Influence of cadmium loading on the state of the antioxidant system in the organism of bulls. *Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Ecology*, 24(1), 96–102.
- Gutyj, B., Lavryshyn, Y., Binkevych, V., Binkevych, O., Paladischnik, O., Strons'kyj, J., & Hariv, I. (2016). Influence of Metisevit on the activity of enzyme and nonenzyme link of antioxidant protection under the bull's body cadmium loading. *Scientific Messenger LNUVMBT named after S.Z. Gzhytskyj*, 18(2), 52–58.
- Gutyj, B., Paska, M., Levkivska, N., Pelenyo, R., Nazaruk, N., & Guta, Z. (2016). Study of acute and chronic toxicity of 'injectable mevesel' investigational drug. *Biological Bulletin of Bogdan Chmelnytsky Melitopol State Pedagogical University*, 6(2), 174–180.
- Joyner, L. P. (1970). Coccidiosis: Problems arising from the development of anticoccidial drug resistance. *Experimental Parasitology*, 28(1), 122–128.
- Khariv, I. I. (2010). The influence of milk thistle on the performance of non-specific resistance of the turkey organism. *Scientific Messenger LNUVMBT named after S. Z. Gzhytskyj*, 13(3), 292–296.
- Khariv, M., Gutyj, B., Butsyak, V., & Khariv, I. (2016). Hematological indices of rat organisms under conditions of oxidative stress and liposomal preparation action. *Biological Bulletin of Bogdan Chmelnytsky Melitopol State Pedagogical University*, 6(1), 276–289.
- Khariv, M. I., & Gutyj, B. V. (2016). Influence of the liposomal preparation Butaintervite on protein synthesis function in the livers of rats under the influence of carbon tetrachloride poisoning. *Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Medicine*, 7(2), 123–126.
- Lavryshyn, Y. Y., Varkholyak, I. S., Martyschuk, T. V., Guta, Z. A., Ivankiv, L. B., Paladischnik, O. R., Murska, S. D., Gutyj, B. V., & Gufriy, D. F. (2016). The biological significance of the antioxidant defense system of animals body. *Scientific Messenger LNUVMBT named after S. Z. Gzhytskyj*, 18(2), 100–111.
- Martyschuk, T. V., Gutyj, B. V., & Vishchur, O. I. (2016). Level of lipid peroxidation products in the blood of rats under the influence of oxidative stress and under the action of liposomal preparation of Butaselmavit. *Biological Bulletin of Bogdan Chmelnytsky Melitopol State Pedagogical University*, 6(2), 22–27.
- McDougald, L. R., & Galloway, R. B. (1973). *Eimeria tenella*: Anticoccidial drug activity in cell cultures. *Experimental Parasitology*, 34(2), 189–196.
- McDougald, L. R., & Seibert, B. P. (1998). Residual activity of anticoccidial drugs in chickens after withdrawal of medicated feeds. *Veterinary Parasitology*, 74(2–4), 91–99.
- McLoughlin, D. K. (1970). Coccidiosis: Experimental analysis of drug resistance. *Experimental Parasitology*, 28(1), 129–136.
- Nweze, N. E., & Obiwulu, I. S. (2009). Anticoccidial effects of *Ageratum conyzoides*. *Journal of Ethnopharmacology*, 122(1), 6–9.
- Platzer, B., Prosl, H., Cieslicki, M., & Joachim, A. (2005). Epidemiology of *Eimeria* infections in an Austrian milking sheep flock and control with diclazuril. *Veterinary Parasitology*, 129, 1–9.
- Rosadio, R., Londoño, P., Pérez, D., Castillo, H., Véliz, A., Llanco, L., Yaya, K., & Maturano, L. (2010). *Eimeria macusaniensis* associated lesions in neonate alpacas dying from enterotoxemia. *Veterinary Parasitology*, 168, 116–120.
- Rozin, D. G. (1964). Modern evaluation of toxicity chlorproductive carbohydrates of fatty raw yder gexanal test with white mice. *Pharmacology and Toxicology*, 5, 613–614.
- Smolynets, I. B., Gutyj, B. V., Khariv, I. I., Petryshak, O. Y., & Lytvyn, R. I. (2016). Pharmaceutical marketing: Objectives and types. *Scientific Messenger LNUVMBT named after S.Z. Gzhytskyj*, 18(2), 151–154.



Pathogenic specifics of development of vegetative dysfunction in adolescents in relation to their morphological status

O. Skyba

Sumy State Pedagogical University named after A. S. Makarenko, Sumy, Ukraine

Article info

Received 28.12.2016

Received in revised form
04.02.2017

Accepted 08.02.2017

Sumy State

Pedagogical University
named after A. S. Makarenko,
Romenskaya str., 87,
Sumy, 40002, Ukraine
Tel.: +38-066-474-36-74
E-mail: skiba_olga@mail.ua

Skyba, O. (2017). Pathogenic specifics of development of vegetative dysfunction in adolescents in relation to their morphological status. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(1), 46–50. doi: 10.15421/021709

Exploring the mechanisms of vegetative regulation in children and adolescents of different somatotypes has a prognostic value in regard to the character of adaptive reactions of the organism, as it facilitates the identification of the risk factors of pathological processes and states of vegetative systems, which may cause chronic illness in adulthood. The author defines the pathogenic specifics of development of vegetative dysfunction in adolescents in relation to their morphological status. Cardiointervallography and anthropometric, mathematical and statistical methods of research were used. Based on the results of cardiointervallography, the structure of initial vegetative tonus was established, which was characterized by prevalence of eutonia ($38.4 \pm 4.9\%$). The specific weight with background eutonia of adolescent boys and girls tended to be higher among the representatives of the thoracic and muscular somatotypes, compared to adolescents of the alimentive and osseous somatotypes ($P < 0.001-0.05$). The established specifics indicate that thoracic and muscular somatotypes ensure optimal adaptation of organisms to the environment. Sympathicotonia was measured among the majority of boys of extreme constitutional variants (alimentive and osseous somatotypes) (36.3% and 30.0% respectively), which demonstrates the activation of adaptive mechanisms in the abovementioned category of examined adolescents, while among girls this phenomenon was evident among the representatives of the osseous and thoracic somatotypes (38.5% and 30.8% respectively). We found that the majority of examined adolescents (53.4%) had a normal vegetative reactivity. Gender differences in the structure of vegetative reactivity of adolescents could well be explained by the higher number of girls of asympaticotonic type (19.2%) compared to boys (7.3%, $P < 0.05$). Furthermore, we found that hypersympathicotonic and asympaticotonic types of vegetative reactivity were characteristic of the majority of representatives of the alimentive and osseous somatotypes irrespective of the gender, which indicates activation of functioning of the cardiovascular system, decreased adaptive capacity of the organism among the examined group. The research shows that the group at risk of developing functional deviations in vegetative systems is formed by the representatives of the alimentive and osseous somatotypes.

Keywords: cardiointervallography; neuroendocrine imbalance; initial vegetative tonus; vegetative reactivity; somatotype

Патогенетичні особливості формування вегетативних дисфункцій у підлітків залежно від їх морфологічного статусу

О. О. Скиба

Сумський державний педагогічний університет імені А. С. Макаренка, Суми, Україна

Визначено патогенетичні особливості формування вегетативних дисфункцій у підлітків залежно від їх морфологічного статусу. За результатами кардіоінтервалографії визначено структуру вихідного вегетативного тону, яка характеризувалась перевагою ейтонії (38,4%). Встановлено залежність вихідного вегетативного тону підлітків від їх морфологічного статусу ($\chi^2 = 26,7$, $P < 0,01$). Питома вага осіб із фоновою ейтонією, як серед хлопців, та і серед дівчат, була вірогідно вищою серед представників торакального та м'язового соматотипів, порівняно з підлітками астенійного та дигестивного соматотипів, ($P < 0,001-0,05$). Симпатикотонію визначено серед більшості хлопців крайніх конституційних варіантів (дигестивний та астенійний соматотипи) (36,3% та 30,0% осіб відповідно), що свідчить про напруження адаптаційних механізмів у визначеного контингенту осіб, тоді як у групі дівчат – серед представників астенійного та торакального соматотипів (38,5% та 30,8% осіб відповідно). Переважна більшість обстежених підлітків (53,4%) має нормальну вегетативну реактивність. Статеві відмінності структури вегетативної реактивності підлітків полягали у вірогідно вищій частці дівчат з асимпатикотонічним типом (19,2%), порівняно з хлопцями (7,3%, $P < 0,05$). Гіперсимпатикотонічний та асимпатикотонічний типи вегетативної реактивності притаманні переважній більшості представників дигестивного та астенійного соматотипів незалежно від статі. Визначено групу підвищеного ризику розвитку функціональних відхилень із боку вегетативних систем, яку формують представники дигестивного та астенійного соматотипів.

Ключові слова: кардіоінтервалографія; нейроендокринний дисбаланс; вегетативний тонус; вегетативна реактивність; соматотип

Вступ

Показник ефективності державної політики у сфері охорони здоров'я – соціальне благополуччя та стан здоров'я населення країни. Нині одна з найгостріших медико-соціальних проблем в Україні – стан здоров'я дітей та підлітків, найчутливіших до несприятливого впливу різних чинників зовнішнього середовища. У вирішенні проблеми збереження та зміцнення здоров'я дитячого населення одна із провідних ролей належить профілактиці як складовій системи охорони здоров'я (Serdjuk et al., 2016). Дитячий організм має підвищений ризик розвитку відхилень у стані здоров'я через наявність критичних періодів росту та розвитку, особливостей обміну речовин, недосконалості адаптаційних механізмів, недорозвиненості імунної та інших систем, що може спричинити зниження активності регуляторних механізмів через їх перенапруження та виснаження внаслідок розвитку патологічних станів (Majdannyyk et al., 2014; Reeva, 2015).

Вегетативна нервова система (ВНС) – регуляторна ланка у процесі формування адаптаційних і компенсаторних змін в організмі у результаті формування патологічних станів (Petković and Čojbašić, 2012; Chernyavskikh et al., 2015). Причому практично немає таких патологічних станів, розвиток яких не був би пов'язаний із розладами вегетативної нервової системи (Messina et al., 2013; Brandão et al., 2014; Majdannyyk et al., 2014; Bartczak et al., 2016; Huang et al., 2016; Regitz-Zagrosek and Kararigas, 2017). Вегетативна дисфункція, як правило, розвивається на тлі фенотипічних ознак функціонального стану ВНС (ваготонічна або симпатикотонічна її спрямованість) (Vejn, 2003; Esler, 2010; Thayer et al., 2010; Nalyotov, 2014; Campos, 2015). Особливе значення в генезі функціональних відхилень діяльності різних органів та систем, зокрема серцево-судинної, ендокринної, травної та інших, належить дисфункціям ВНС і нейроендокринному дисбалансу, що спостерігається в підлітковому віці (Grosu, 2014; Nóbrega et al., 2014; Marongiu and Crisafulli, 2015; Sladek et al., 2015). Саме в цьому віці виникають передумови для розвитку функціональних розладів із боку вегетативних систем, які можуть стати причиною розвитку хронічних захворювань у дорослому віці (Kraus et al., 2013; Ubrich et al., 2016).

Аналіз останніх досліджень і публікацій вказує на те, що кожному з конституційних типів властиві специфічні особливості функціонування нервової, гуморальної, серцево-судинної та імунної систем (Miculic, 2008; Kazakova et al., 2009; Koenig, et al., 2014; Schoen, 2016). Тому вивчення патогенетичних механізмів виникнення дисфункцій ВНС у підлітків різних соматотипів має прогностичне значення перебігу адаптаційних реакцій організму, що дозволить виявляти донозологічні стани та здійснювати ранню профілактику соматичних захворювань, що зумовлює актуальність дослідження (Denefil, 2013; Messina et al., 2013). Мета цього дослідження – визначити патогенетичні особливості формування вегетативних дисфункцій у підлітків залежно від їх морфологічного статусу.

Матеріал і методи досліджень

У дослідженні брали участь 99 дітей 15–16 років (58 хлопців та 41 дівчина), які навчаються в інноваційних навчальних закладах (гімназіях) м. Суми. Програма дослідження включала антропометричне обстеження, що проводили за загально визначеними методиками. Визначали тотальні розміри тіла: довжину (ДТ), масу (МТ), окружність грудної клітки (ОГК). Оцінювання соматотипу здійснювали за схемою Штефко – Островського з виділенням чотирьох конституційних варіантів: астеноїдний, торакальний, м'язовий та дигестивний (Shtefko and Ostrovskyy, 1929).

Для оцінювання функціонального стану ВНС досліджували варіабельність серцевого ритму (BCP) з використанням апаратно-програмного комплексу «КардіоСпектр» (АТ Солвейр) відповідно до вимог Міжнародного стандарту (Task Force of the European

Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology, 1996) для коротких записів. Проводили аналіз двох категорій BCP: часовий (Time – Domain Results) та частотний (Frequency – Domain Results). У часовому аспекті оцінювали показники NN – ряд нормальних R-R інтервалів із виключенням екстрасистол; SDNN – стандартне відхилення NN інтервалів; RMSSD – квадратний корінь із середнього значення квадратів різниць величин послідовних інтервалів R-R; pNN50 – відсоток кардіоінтервалів, що відрізняються від сусідніх більше ніж на 50 мс, від загальної кількості кардіоінтервалів; ІН – індекс напруження.

У частотній ділянці визначали абсолютні значення показників TF (Total Frequency) – загальної потужності спектра; HF (High Frequency) – потужності височастотних коливань спектра, яка характеризує дихальний компонент BCP, пов'язаний із парасимпатичним регулюванням; LF (Low Frequency) – потужності низькочастотних коливань спектра, який відображає активність підкіркового вазомоторного центру та пов'язаний із симпатичною ланкою регуляції; VLF (Very Low Frequency) – потужності наднизькочастотних коливань спектра, який відображає активність надсегментарних відділів автономної нервової системи та нейрогуморальний компонент регулювання; LF/HF – коефіцієнт, який відображає баланс вегетативних впливів. Комп'ютерний аналіз включав визначення вихідного вегетативного тону: перевага тону парасимпатичного (ваготонія) чи симпатичного (симпатикотонія) відділу ВНС, баланс (ейтонія).

Реєстрацію кардіоінтервалограм проводили в горизонтальному положенні (лежачи на спині), у стані відносного спокою у першій половині дня протягом 5 хвилин. Визначення реактивності ВНС здійснювали за допомогою активної ортостатичної проби (Vejn, 2003; Fedorowski and Melander, 2013). Після проведення фонових записів кардіоінтервалограм обстежений без різких рухів набував вертикального положення, у якому проводився повторний запис кардіоінтервалограм.

Оцінку вегетативної реактивності визначали за відношенням ІН₂ (індекс напруження в ортостазі) до ІН₁ (індекс напруження у стані відносного спокою) з виділенням нормального, гіперсимпатикотонічного та асимпатикотонічного типів (Majdannyyk et al., 2014).

Статистичну обробку отриманих даних здійснювали за допомогою програми Statistica 8.0 (StatSoft Inc., USA) з визначенням середнього арифметичного (M) та його стандартної похибки (m). Для процентів стандартну похибку (m) розраховували за формулою:

$$m = \frac{\sqrt{p(100-p)}}{n}$$

Для номінальних змінних розраховували взаємозв'язок за таблицями спряженості та критерієм χ^2 Пірсона. Відмінності між вибірками у випадках порівняння їх середніх значень, розподілених за нормальним законом, оцінювали за параметричним критерієм Стьюдента (t). Відмінності між вибірками вважали вірогідними за $P < 0,05$.

Дослідження виконане за планом науково-дослідницької роботи кафедри медико-біологічних основ фізичної культури Сумського державного педагогічного університету імені А. С. Макаренка за темою «Фізіолого-гігієнічний супровід здоров'язбережувальної діяльності закладів освіти», № державної реєстрації 0113U004662.

Результати

У структурі вихідного вегетативного тону переважала фонові ейтонія ($38,4 \pm 4,9\%$), яка забезпечує оптимальну адаптацію організму до факторів зовнішнього середовища. Вегетативний баланс, виявлений у більшості осіб, ймовірно пов'язаний із завершенням адаптаційних перебудов і формуванням оптимальної регуляції на визначеному етапі онтогенезу.

Частка осіб із ваготонією становила $32,3 \pm 4,7\%$ обстежених, причому серед дівчат вона вірогідно вища ($38,2 \pm 7,6\%$) порів-

няно із хлопцями ($19,4 \pm 5,2\%$, $P < 0,05$). Вагусно-холінергічна спрямованість вегетативної регуляції відповідає морфологічній зрілості організму та забезпечує стабілізацію регуляції серцевого ритму за рахунок удосконалення механізмів саморегуляції. Вегетативний тонус $29,3 \pm 4,6\%$ підлітків характеризується симпатикотонією та відсутністю вірогідних відмінностей між обстеженими особами чоловічої та жіночої статі.

Установлено залежність вихідного вегетативного тону підлітків від їх морфологічного статусу ($\chi^2 = 26,7$, $P < 0,01$). Аналіз структури вихідного вегетативного тону хлопців залежно від їх соматотипологічних особливостей виявив вірогідну перевагу фонові ейтонії серед осіб торакального ($40,0 \pm 6,4\%$) та м'язового ($30,0 \pm 6,0\%$) соматотипів, порівняно з представниками астеноїдного ($10,0 \pm 3,9\%$, $P < 0,001-0,01$) та дигестивного ($20,0 \pm 5,3\%$, $P < 0,05$) соматотипів (рис. 1).

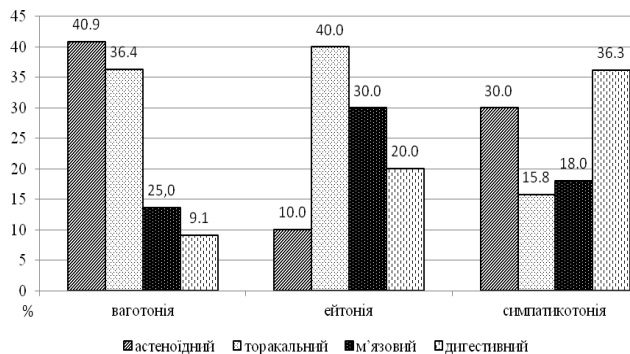


Рис. 1. Структура вихідного вегетативного тону хлопців (%) залежно від соматотипу ($n = 58$)

Частка осіб із ваготонією вірогідно вища серед хлопців астеноїдного, торакального та м'язового соматотипів ($40,9 \pm 6,5\%$, $36,4 \pm 6,3\%$ та $25,0 \pm 5,7\%$ осіб відповідно), порівняно з підлітками дигестивного соматотипу ($9,1 \pm 2,8\%$, $P < 0,001-0,05$).

Вегетативний дисбаланс, що проявляється симпатикотонією, притаманний більшості підлітків крайніх конституційних варіантів (дигестивний та астеноїдний соматотипи) ($36,2 \pm 6,3\%$ та $30,0 \pm 6,0\%$ осіб відповідно), що свідчить про напруження адаптаційних механізмів у визначеного контингенту осіб.

У групі дівчат структура вихідного вегетативного тону подібна показникам осіб чоловічої статі, оскільки характеризується вірогідною перевагою ейтонії серед представників торакального ($50,0 \pm 7,8\%$) та м'язового ($38,9 \pm 7,6\%$) соматотипів, порівняно з представниками астеноїдного ($11,1 \pm 4,9\%$, $P < 0,001-0,01$) та дигестивного (0%) соматотипів (рис. 2). Визначені особливості свідчать про те, що торакальний і м'язовий соматотипи забезпечують оптимальну адаптацію організму до факторів навколишнього середовища.

Ваготонічний вихідний вегетативний тонус спостерігається у більшості дівчат м'язового та торакального соматотипів ($50,0 \pm 7,8\%$ та $30,0 \pm 7,2\%$ обстежених відповідно), тоді як симпатикотонічний – у дівчат астеноїдного та торакального соматотипів ($38,5 \pm 7,6\%$ та $30,8 \pm 7,2\%$ осіб відповідно). Виявлений дисбаланс стану регуляторних систем осіб жіночої статі може бути пов'язаний із нерівномірністю дозрівання регуляторних механізмів на даному етапі онтогенезу.

Інтегральний показник, що відображає ступінь централізації управління серцевим ритмом, – індекс напруженості (ІН). В ортостатичному положенні і серед хлопців ($+156,8 \pm 20,0\%$), і серед дівчат ($+146,2 \pm 24,1\%$) відбувається збільшення ІН, – закономірна реакція, яка свідчить про активацію центрального контуру вегетативної регуляції.

Аналіз приросту ІН серед хлопців залежно від їх соматотипологічних особливостей свідчить про вірогідно вищі значення ІН серед представників дигестивного соматотипу ($+218,8 \pm 66,1\%$), порівняно з хлопцями м'язового соматотипу ($+91,5 \pm 19,4\%$, $P < 0,05$) (рис. 3).

На фоні загальної тенденції до збільшення ІН у відповідь на ортостаз серед дівчат дигестивного соматотипу відмінене найбільше значення його приросту ($+239,0 \pm 100,5\%$) (рис. 3).

За результатами оцінювання вегетативної реактивності встановлено перевагу нормальної вегетативної реактивності ($53,4 \pm 5,0\%$), однак частка осіб із гіперсимпатикотонією була високою ($35,6 \pm 4,8\%$ обстежених), що вказує на підвищення внеску симпатoadреналових впливів у відповідь на ортостаз і свідчить про напруження адаптаційних можливостей організму підлітків. Статеві відмінності структури вегетативної реактивності підлітків полягали у вірогідно вищій частці дівчат з асимпатикотонією ($19,2 \pm 6,3\%$) порівняно з хлопцями ($7,3 \pm 3,4\%$, $P < 0,05$), а гіперсимпатикотонічна реактивність характеризувалась тенденцією до переваги у групі хлопців. Аналіз показників вегетативної реактивності дозволив визначити їх залежність від особливостей морфологічного статусу підлітків ($\chi^2 = 34,2$, $P < 0,001$). Нормальна вегетативна реактивність притаманна більшості представників чоловічої статі торакального ($31,8 \pm 6,1\%$) та м'язового ($36,4 \pm 6,3\%$) соматотипів (рис. 4). У переважній більшості хлопців визначених соматотипів у структурі вихідного вегетативного тону переважала ейтонія ($40,0 \pm 6,4\%$ та $30,0 \pm 6,0\%$ відповідно).

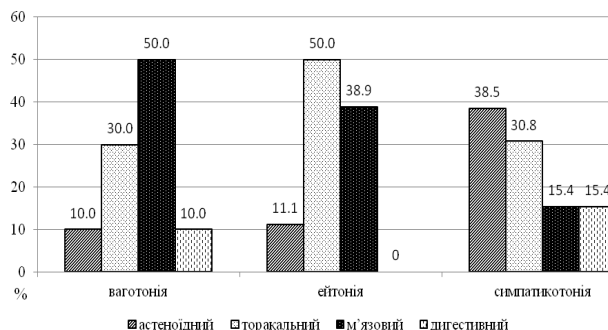


Рис. 2. Структура вихідного вегетативного тону дівчат (%) залежно від їх соматотипу ($n = 41$)

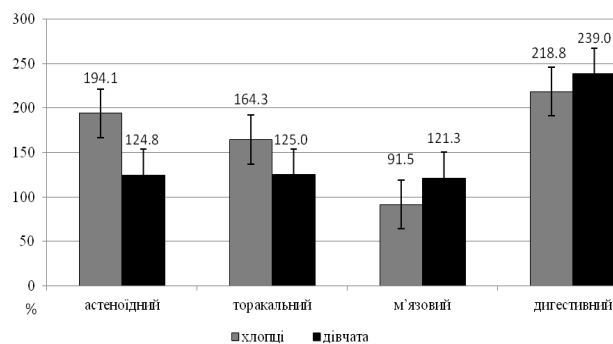


Рис. 3. Приріст значень індексу напруження (%) у підлітків різних соматотипів у відповідь на ортостаз ($n = 99$)

Асимпатикотонічна реактивність спостерігалась тільки серед підлітків астеноїдного та дигестивного соматотипів ($66,7 \pm 6,2\%$ та $33,3 \pm 6,2\%$ осіб відповідно), що свідчить про незадовільну адаптацію внаслідок зниження захисно-приспосувальних механізмів їх організму. Вегетативний дисбаланс, що проявлявся гіперсимпатикотонією, визначено серед переважної більшості представників крайніх конституційних типів (дигестивний та астеноїдний соматотипи) ($43,8 \pm 6,5\%$ та $31,3 \pm 9,1\%$ осіб) на фоні високої вихідної активності симпатичного відділу ВНС, що вказує на напруження функціонування серцево-судинної системи, зниження адаптаційних можливостей організму у визначеного контингенту осіб. Установлені особливості можуть слугувати прогностичним маркером розвитку вегетативних дисфункцій та патології серцево-судинної системи. Структура вегетативної реактивності у групі дівчат подібна до структури групи осіб чоловічої статі:

нормальна вегетативна реактивність притаманна переважній більшості осіб м'язового та торакального соматотипів ($41,2 \pm 7,7\%$ та $35,3 \pm 7,5\%$ осіб відповідно), тоді як частка дівчат астенійного та дигестивного соматотипів вірогідно нижча ($P < 0,05$, рис. 5).

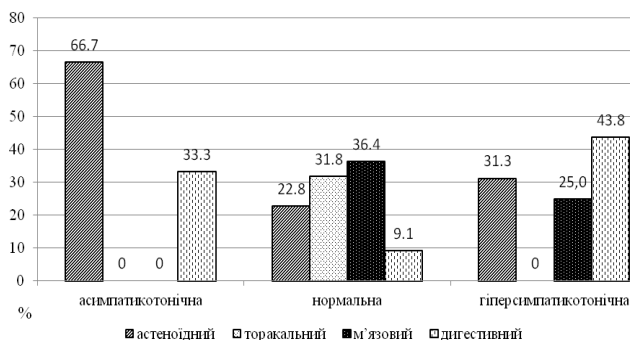


Рис. 4. Структура вегетативної реактивності хлопців (%) залежно від їх соматотипу (n = 58)

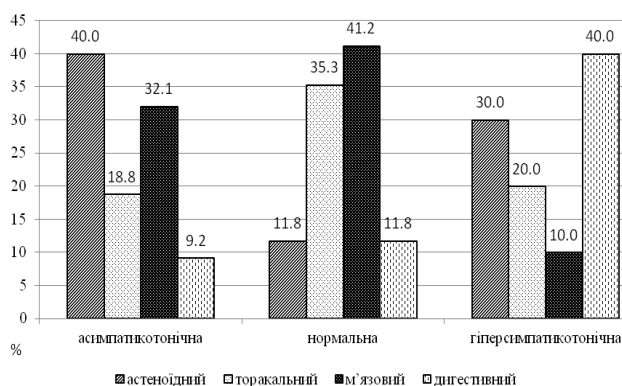


Рис. 5. Структура вегетативної реактивності дівчат (%) залежно від їх соматотипу (n = 41)

Збільшення симпатоадреналового впливу та напруження резервних можливостей організму дівчат спостерігали серед більшості осіб дигестивного соматотипу ($40,0 \pm 7,7\%$). Асимпатикотонічна вегетативна реактивність виявлена серед більшості представників астенійного соматотипу ($40,0 \pm 7,7\%$ дівчат), що вказує на нестійкість та зниження у них адаптаційних можливостей організму.

Обговорення

Визначено перевагу ейтонії та нормальної вегетативної реактивності серед обстежених підлітків на фоні зменшення частки осіб із симпатикотонічним вихідним вегетативним тонусом і гіперсимпатикотонічною реактивністю, що віддзеркалює вікові закономірності їх онтогенетичного розвитку (Majdanuk et al., 2014; Nóbrega et al., 2014; Sladek et al., 2015; Angelovski et al., 2016). У більшості практично здорових підлітків м'язового та торакального соматотипів спостерігається оптимальна взаємодія парасимпатичної та симпатичної ВНС. Менш сприятливими в плані вегетативної регуляції виявляються підлітки з дигестивним соматотипом, серед переважної більшості яких визначається депресія парасимпатичного відділу ВНС (Kazakova et al., 2009; Koenig et al., 2014).

Вегетативний дисбаланс, що проявлявся гіперсимпатикотонічним і асимпатикотонічним типами вегетативної реактивності, притаманний більшості представників (як хлопців, так і дівчат) дигестивного та астенійного соматотипів, які формують групу підвищеного ризику розвитку функціональних відхилень із боку вегетативних систем (Kazakova et al., 2009; Fedorowski and Melander, 2013; Marongiu and Crisafulli, 2015).

Висновки

Структура вихідного вегетативного тонусу більшості обстежених осіб ($38,4 \pm 4,9\%$) характеризувалася перевагою ейтонії. Частка осіб із фоновою ейтонією, як серед хлопців, так і серед дівчат, вірогідно вища серед представників торакального та м'язового соматотипів, порівняно з підлітками астенійного та дигестивного соматотипів ($P < 0,001-0,05$).

У групі хлопців симпатикотонія притаманна більшості підлітків крайніх конституційних варіантів (дигестивний і астенійний соматотипи) ($36,3 \pm 6,3\%$ та $30,0 \pm 6,0\%$ осіб відповідно), що свідчить про напруження адаптаційних механізмів у визначеного контингенту осіб, тоді як у групі дівчат – представникам астенійного та торакального соматотипів ($38,5 \pm 7,6\%$ та $30,8 \pm 7,2\%$ осіб відповідно).

Серед переважної більшості обстежених підлітків установлено нормальну вегетативну реактивність ($53,4 \pm 5,0\%$ осіб). Статеві відмінності структури вегетативної реактивності підлітків полягали у вірогідно вищій частці дівчат з асимпатикотонічним типом ($19,2 \pm 6,3\%$), порівняно із хлопцями ($7,3 \pm 3,4\%$, $P < 0,05$).

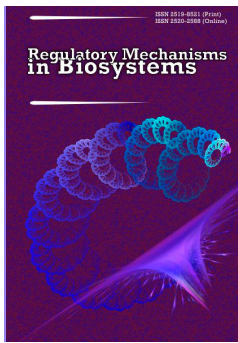
Гіперсимпатикотонічний та асимпатикотонічний типи вегетативної реактивності визначені серед переважної більшості представників дигестивного та астенійного соматотипів (незалежно від статі), що вказує на зниження адаптаційних можливостей організму підлітків визначених конституційних варіантів. Оцінка показників вегетативної регуляції з урахуванням соматотипологічних особливостей дозволяє виділити групу осіб підвищеного ризику розвитку патологічних станів із боку вегетативних систем і розробити заходи профілактики захворювань та їх ранньої діагностики.

Перспективи подальших досліджень – визначення патогенетичних особливостей розвитку вегетативних дисфункцій у спортсменів за впливу факторів навчально-тренувального процесу.

References

- Angelovski, A., Sattel, H., Henningsen, P., & Sack, M. (2016). Heart rate variability predicts therapy outcome in pain-predominant multisomatoform disorder. *Journal of Psychosomatic Research*, 83, 16–21.
- Bartczak, D., Szymański, L., Bodera, P., & Stankiewicz, W. (2016). Psychoneuroimmunological aspects of cardiovascular diseases: A preliminary report. *Central European Journal of Immunology*, 41(2), 209–216.
- Brandão, G. S., Urbano, J. J., Fonsêca, N. T., Apostólico, N., Oliveira, E. F., Perez, E. A., Almeida, R. G., Dias, I. S., Santos, I. R., Nacif, S. R., & Oliveira, L. V. (2014). Analysis of heart rate variability in the measurement of the activity of the autonomic nervous system: Technical note. *Manual Therapy, Posturology & Rehabilitation Journal*, 12, 243–251.
- Campos, R. R. (2015). Autonomic dysfunction in renovascular hypertension. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 192, 40.
- Chemyavskikh, S.D., Rzhetskaya, S. A., Goldayeva, K. A., & Ponomarchuk, N. V. (2015). Functional capabilities of cardiovascular system of adolescents. *Nauchnyj Rezultat. Serija Fiziologija*, 6, 12–17.
- Denefil, O. V. (2013). Pokaznyky kardiointervalografii' u studentiv z riznym vyhidnym typtom vegetatyvnoi' regulacii'. *Visnyk Problem Biologii' ta Medycyny*, 99, 324–328.
- Esler, M. (2010). The 2009 Carl Ludwig lecture: Pathophysiology of the human sympathetic nervous system in cardiovascular diseases: The transition from mechanisms to medical management. *Journal of Applied Physiology*, 108(2), 227–237.
- Fedorowski, A., & Melander, O. (2013). Syndromes of orthostatic intolerance: A hidden danger. *Journal of Internal Medicine*, 273(4), 322–335.
- Grosu, V. (2014). The research of parameters of cardiac rhythm variability of arterial hypertension in children and adolescents. *Romanian Journal of Medical Practice*, 9(4), 264–271.
- Huang, W. L., Liao, S. C., Yang, C. C., Kuo, T. B., Chen, T. T., Chen, I. M., & Gau, S. S. (2016). Measures of heart rate variability in individuals with somatic symptom disorder. *Psychosomatic Medicine*, 79(1), 34–42.
- Kazakova, T. V., Fefelova, V. V., Nikolaev, V. G., & Ermoshkyna, A. J. (2009). Sravnitel'nyj analiz pokazatelej dejatel'nosti vegetativnoj nervnoj sistemy v zavisimosti ot pola i tipa teloslozhenija. *Bjulleten' SO RAMN*, 140, 54–60.

- Koenig, J., Jarczok, M. N., Warth, M., Ellis, R. J., Bach, C., Hillecke, T. K., & Thayer, J. F. (2014). Body mass index is related to autonomic nervous system activity as measured by heart rate variability – a replication using short term measurements. *The Journal of Nutrition, Health and Aging*, 18(3), 300–302.
- Kraus, U., Schneider, A., Breitner, S., Hampel, R., Rückerl, R., Pitz, M., Geruschkat, U., Belcredi, P., Radon, K., & Peters, A. (2013). Individual daytime noise exposure during routine activities and heart rate variability in adults: A repeated measures study. *Environ Health Perspect*, 121(2), 607–612.
- Majdannyk, V. G., Smijan, O. I., Bynda, T. P., & Savel'jeva-Kulyk, N. O. (2014). Vegetatyvni dysfunkcii' u ditej. Sums'kyj Derzhavnyj Universytet, Sumy (in Ukrainian).
- Marongiu, E., & Crisafulli, A. (2015). Gender differences in cardiovascular functions during exercise: A brief review. *Sport Sciences for Health*, 11(3), 235–241.
- Messina, G., Luca, V., Viggiano, An., Ascione, A., Iannaccone, T., Chieffi, S., & Monda, M. (2013). Autonomic nervous system in the control of energy balance and body weight: Personal contributions. *Neurology Research International*, 2013, 1–5.
- Miculic, P. (2008). Anthropometric and physiological profiles of rowers of varying ages and ranks. *Kinesiology*, 40 (1), 80–88.
- Nalyotov, A. V. (2014). Vegetative dysfunction and way of its correction in children with chronic gastroduodenal pathology. *Zdorov'e Rebenka*, 54, 56–60.
- Nóbrega, A. C. L., O'Leary, D. S., Silva, B. M., Marongiu, E., Piepoli, M. F., & Crisafulli, A. (2014). Neural regulation of cardiovascular response to exercise: Role of central command and peripheral afferents. *BioMed Research International*, 2014, 1–20.
- Petković, D., & Čojbašić, Z. (2012). Adaptive neuro-fuzzy estimation of autonomic nervous system parameters effect on heart rate variability. *Neural Computing and Applications*, 21(8), 2065–2070.
- Reeva, S. V. (2015). Ocenka vegetativnoj reguljacii u lic mladogo vozrasta. *Pediatr*, 7(3), 70–75.
- Regitz-Zagrosek, V., & Kararigas, G. (2017). Mechanistic pathways of sex differences in cardiovascular disease. *Physiological Reviews*, 97(1), 1–37.
- Schoen, F. J. (2016). Morphology, clinicopathologic correlations, and mechanisms in heart valve health and disease. *Cardiovascular Engineering and Technology*, 2016, 1–15.
- Serdjuk, A. M., Kobljans'ka, A. V., & Skljarenko, K. A. (2016). Derzhavni cil'ovi programy jak instrument deravnoi' polityky z ohorony zdorov'ja v Ukraini. *Dovkillja ta Zdorov'ja*, 78, 4–8.
- Shtefko, V. G., & Ostrovskij, A. D. (1929). Shema klyncheskoj dyagnostyky konstytucyonal'nyh tipov. Gosmedyzdat, Moscow (in Russian).
- Sladek, C. D., Michelini, L. C., Stachenfeld, N. S., Stern, J. E., & Urban, J. H. (2015). Endocrine-autonomic linkages. *Comprehensive Physiology*, 5(3), 1281–1323.
- Thayer, J. F., Yamamoto, S. S., & Brosschot, J. F. (2010). The relationship of autonomic imbalance, heart rate variability and cardiovascular disease risk factors. *International Journal of Cardiology*, 141(2), 122–131.
- Ubrich, R., Barthel, P., Berkefeld, A., Hnatkova, K., Huster, K. M., Dommasch, M., Sinnecker, D., Steger, A., Schmidt, G., & Malik, M. (2016). Electrocardiographic and cardiac autonomic indices – implications of sex-specific risk stratification in women after acute myocardial infarction. *Current Pharmaceutical Design*, 22(25), 3817–3828.
- Vejn, A. M. (2003). Vegetativnye rasstroystva: Klinika, diagnostika, lechenie [Autonomic dysfunction: Clinical features, diagnosis, treatment]. *Meditinskoe Informatsionnoe Agentstvo, Moscow* (in Russian).



Coherece of EEG frequency components during manual movements executed by the subdominant hand in women

O. V. Korzhyk, O. S. Pavlovyeh, A. H. Morenko

Lesia Ukrainka Eastern European National University, Lutsk, Ukraine

Article info

Received 11.01.2017

Received in revised form
08.02.2017

Accepted 10.02.2017

*Lesia Ukrainka
Eastern European
National University,
Voli Ave., 13b,
Lutsk, 43000, Ukraine
Tel.: +38-066-826-27-23
E-mail: alevmore@gmail.com*

Korzhyk, O. V., Pavlovyeh, O. S., & Morenko, A. H. (2017). Coherece of EEG frequency components during manual movements executed by the subdominant hand in women. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8(1), 51–57. doi: 10.15421/021710

The academic community is paying more and more attention to the question of the individual characteristics of the brain processes which ensure the manual motor programming of movements performed not only by the leading, but also by the subdominant hand. Researchers do not exclude the existence of the particular parameters of the human brain correlating with manual motor activities. This study involved 136 women at the age of 19–21 years. The testees were divided into two groups according to high and low values of the EEG modal α -frequency determined individually and in a motionless state. We evaluated the coherence status of the EEG frequency components in the motionless state and during movements performed by fingers of the subdominant (left) hand in response to rhythmic sound signals. The testing stages involved the sequential execution of motor tasks including clamping and unclamping performed by the fingers of the subdominant hand (such as grasping movements) without effort. The testees also performed fingering (a manual response to each stimulus) at in different times and not by all the fingers of the hand simultaneously, but separately, one by one, in a given sequence). Clamping and unclamping was executed by the fingers subject to power loading the (additional load on the fingers being 10H). Execution of manual movements by means of the subdominant hand in response to the sensory signals was accompanied by an increase in coherence in the EEG frequency components, especially in the frontal, temporal, and parietal cortexes of the central areas. Women with a low individual α -rate of such a regularity had significantly increased scores at the high (α_3 , β -) frequencies of the EEG spectrum. At the same time, women in both groups mainly showed a decrease in the coherence coefficients of θ -, α_1 - and α_3 -activity in the frontal cortex leads in terms of the execution of the sequential finger movements and movements under power loading. The analysis of differences proved that women with a low I α F had relatively higher coherence of the EEG frequency components in the frontal lobes. However, relatively higher frequency components of EEG coherence in the central, posterior temporal and parietal leads were set in women with high I α F. Changes in cortical activity were established during different movements performed by fingers of the subdominant hand, namely, grasping movements of common occurrence, successive movements and movements under power loading. They differ from each other in their low specificity. Thus, the factor of motor performance of tests by means of the subdominant hand had obviously more decisive importance in the nature of the organization of brain activity than for the actual specifics of manual movements.

Keywords: individual α -frequency; successive movements; power load; grasping movements

Когерентність частотних компонентів електроенцефалограми під час виконання мануальних рухів субдомінантною рукою у жінок

O. V. Коржик, O. C. Павлович, A. Г. Моренко

Східноєвропейський національний університет імені Лесі Українки, Луцьк, Україна

Обстежено 136 жінок віком 19–21 року, яких поділено на дві групи з високими та низькими значеннями модальної α -частоти електроенцефалограми (ЕЕГ), визначеної індивідуально у стані спокою. Оцінювали показники когерентності частотних компонентів електроенцефалограми у стані спокою та під час стискання та розтискання пальців кисті (за типом хапальних рухів) без зусилля, почергових рухів пальців, стискання та розтискання пальців кисті із силовим навантаженням. Обстежувані виконували рухи пальцями кисті субдомінантної (лівої) руки у відповідь на ритмічні слухові сигнали. Виконання зазначених мануальних рухів у жінок обох груп загалом супроводжувало збільшення когерентності частотних компонентів ЕЕГ, особливо в лобових, скроневих, центральних і тім'яних кортикальних ділянках. Поряд із тим, за умови виконання почергових рухів пальців та рухів із силовим навантаженням у всіх жінок фіксували зменшення коефіцієнтів когерентності θ -, α_1 - і α_3 -активності, здебільшого у лобових відведеннях кори. У жінок із низькою I α Ч реєстрували вищу когерентність частотних компонентів ЕЕГ у лобових ділянках. Натомість у центральних, задніх скроневих та тім'яних відведеннях встановлено порівняно вищу когерентність частотних компонентів ЕЕГ у жінок із високою I α Ч. Зміни кортикальної

активності, встановлені під час виконання різних рухів пальців субдомінантної руки, як от звичних хапальних рухів, почергових рухів та рухів із силовим навантаженням, як правило, відзначалися низькою специфічністю.

Ключові слова: індивідуальна α -частота; почергові рухи; силове навантаження; хапальні рухи

Вступ

Використання сучасних технічних засобів і технологій про-вокує підвищення вимог до функціональних можливостей сенсорної та моторної систем, діяльності головного мозку тієї чи іншої людини. Тому наукова спільнота (Averbeck et al., 2002; Hikosaka et al., 2002; Ioffe, 2003; Müller et al., 2003; Cisek, 2005; Ruge et al., 2014) приділяє все більшу увагу проблемі індивідуальних особливостей мозкових процесів, які забезпечують моторне програмування мануальних рухів (МР). Дослідники не виключають, що існують певні показники роботи головного мозку, які корелюють із мануальною моторикою.

Багато вчених (Kaplan and Borisov, 2003; Bazanova, 2008; Razumnikova et al., 2009; Umjühin et al., 2009) з'ясували, що індивідуальна варіативність амплітудно-частотних характеристик α -ритму електроенцефалограми (ЕЕГ), зокрема модальна частота цього ритму, відзначаються високою інформативністю для визначення стану нервових процесів та низки психофізіологічних функцій людини. Для людей, які відрізняються характеристиками α -ритму, характерні відмінні поведінкові стратегії, механізми сприйняття, переробки інформації (Hummel et al., 2004; Kristeva et al., 2005; Bazanova, 2008). Такі твердження ґрунтуються на тому, що модальну α -частоту ЕЕГ вважають (Anderson et al., 2005; Page et al., 2006; Anokhin et al., 2006; Spergel, 2007) жорстко детермінованою генетичною ознакою, оскільки вона відображає важливі вроджені особливості структурної організації таламичних і кортикальних нейронів (Niswender et al., 2005; Smit et al., 2006; Bellone and Nicoll, 2007; Ng and Raveendran, 2007).

Визнаючи виняткову важливість отриманих різними вченими результатів, все ж слід підкреслити, що така інформація вочевидь недостатня для вичерпного розуміння того, як пов'язаний такий уроджений аспект функціонування мозку як модальна частота α -ритму ЕЕГ із керуванням діяльністю дистальних м'язів руки під час виконання певних МР. У проведених раніше дослідженнях (Mogenko et al., 2013; 2013; 2014) у контексті такої проблематики показано особливості мозкових процесів, які лежать в основі керування МР ведучої руки в жінок із різними вихідними характеристиками α -ритму ЕЕГ, зокрема модальною частотою цього ритму. Відповідно до одержаних результатів осіб із вихідною високою модальною частотою α -ритму ЕЕГ відзначався вищий рівень вибіркової уваги та локальніші зміни електричної активності кори головного мозку у перебігу регуляції мануальної моторики. Для осіб із низькою α -частотою притаманні менш специфічні та диференційовані процеси активації кори. Створення повноцінного уявлення про особливості мозкових процесів людини, пов'язаних із мануальною моторикою, передбачає дослідження останніх під час рухів пальців не лише ведучої, а й субдомінантної руки. Отже, в реальному житті людина під час мануальної моторики використовує як ведучу, так і субдомінантну руку. Тому мета цього дослідження – виявлення показників когерентності електричної активності кори головного мозку під час виконання жінками з різною вихідною модою альфа-частоти МР субдомінантною рукою. Застосування силового навантаження та зниження стереотипності завдання (під час перебирання пальців) – фактори, які ускладнюють як виконання, так і програмування МР у відповідь на дію певних сигналів. Вивчення когерентності частотних коливань ЕЕГ під час виконання різних МР дасть уявлення щодо характерних функціональних об'єднань кортикальних ділянок, безпосередньо пов'язаних із програмуванням МР субдомінантної руки. Мета цього дослідження – виявити особливості когерентності частотних компонентів електричної активності кори головного мозку під час виконання жінками МР субдомінантною рукою.

Матеріал і методи досліджень

Відповідність етичним стандартам. Комісія з питань біоетики Східноєвропейського національного університету імені Лесі Українки встановила (протокол № 1 від 18.10.2012), що всі обстеження проведені відповідно до основних біотичних норм Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення науково-медичних досліджень за участі людини (1964–2000), Декларації принципів толерантності (1995), Універсальної декларації з біоетики та прав людини (1997), Конвенції Ради Європи з прав людини та біомедицини (1997), наказу МОЗ України від 13.02.2006 р. № 66. Всі обстежувані давали письмову згоду для участі в експерименті. Вжиті необхідні заходи для забезпечення анонімності обстежуваних.

Об'єкт дослідження. У наших дослідженнях взяли участь 136 жінок у віці 19–21 рік: усі здорові, мають нормальний слух за даними медичного професійно-консультативного висновку. Під час формування контингенту до уваги брали й такі фактори як відсутність у тестованих черепно-мозкових травм в анамнезі, добрий стан самопочуття на час тестування, профіль мануальної та слухової асиметрії. Обстеження жінок проводили під час лютеїнової фази менструального циклу, оскільки рівень збудливості мозку в жінок залежить від впливу статевих гормонів. У пізню фолікулярну фазу нервова система більш збудлива, що спричинено естрогеном, а в лютеальну фазу, навпаки, загальний рівень збудливості головного мозку жінки найнижчий упродовж овуляційного циклу, оскільки в дію вступає прогестерон, який здійснює гальмівний вплив (Razumnikova et al., 2009).

Усі обстеження здійснювали в робочі дні тижня, у першій половині дня у два послідовні етапи – психофізіологічного та електроенцефалографічного тестувань. Експеримент проводили на базі навчально-наукової лабораторії вікової нейрофізіології кафедри фізіології людини та тварин Східноєвропейського національного університету імені Лесі Українки.

Психофізіологічне тестування. Час проведення такого тестування – до десяти хвилин. Профіль мануальної та слухової асиметрії визначали в кожній випробуваній за характером відповідей у ході опитування, виконання моторних і психоакустичних проб, за розрахунком коефіцієнтів мануальної та слухової асиметрії (K_{ac}) (Zhavoronkova, 2007):

$$K_{ac} = \frac{\sum_{np} - \sum_{лів}}{\sum_{np} + \sum_{лів}} \times 100\%, \quad (1)$$

де \sum_{np} – сума завдань, під час виконання яких домінує права рука (праве вухо), $\sum_{лів}$ – сума завдань, під час виконання яких домінує ліва рука (ліве вухо). У подальшому обстеженні взяли участь жінки, коефіцієнти мануальної та слухової асиметрії котрих мали позитивне значення та були вищі 50%. Загальна кількість таких жінок склала 113. Профіль асиметрії оцінювали за 30 хвилин до початку реєстрації ЕЕГ.

Електроенцефалографічне тестування. Під час ЕЕГ-експерименту обстежувані перебували у звуко- та світлонепро-никній кімнаті, у положенні напівлежачи в кріслі з підголовником, із заплісненими очима. Передпліччя фіксували на підлокітниках. Перед початком запису тестована отримувала загальну інструкцію про хід експерименту.

Для кожної обстежуваної протокол експериментальної процедури реєстрації ЕЕГ включав такі послідовні етапи: стан функціонального спокою, стискання та розтискання пальців без зусилля (за типом хапальних рухів, один цикл стискання та розтискання за секунду), почергові рухи пальців (перебирання), стискання та розтискання пальців із силовим навантаженням. Під час перебирання пальцями мануальне реагування на кожний стимул обстежувані здійснювали не одночасно всіма

пальцями кисті, а по-одному в черговості, визначеній безпосередньо перед тестуванням: вказівний – безіменний – середній – мізинний пальці. Умови цього експерименту повідомляля обстежуваним безпосередньо перед початком проби. На етапі застосування силового навантаження обстежувані додатково утримували напівзгнутими пальцями навантаження 10 Н (1 кг). Обстежувані виконували рухи пальцями кисті субдомінантної (лівої) руки у відповідь на ритмічні слухові сигнали.

Таким чином, у ході експерименту створено різні експериментальні умови для виконання рухів пальців, які мали відмінне функціональне значення. Під час етапу стискання та розтискання пальців кисті без зусилля обстежувані виконували звичні мануальні дії за типом хапальних рухів. За умови тесту «Почергові рухи пальців» висувалися підвищені вимоги до індивідуальних можливостей обстежуваних раціонально розподіляти увагу між сенсорним сприйняттям і моторним реагуванням, перебудовувати моторну програму згідно з черговістю включення в роботу рухових одиниць м'язів різних пальців. Застосування силового навантаження створювало необхідність зосередження уваги під час утримання та фіксації пальцями кисті вантажу, подолання його ваги. Важливим фактором було те, що усі МР обстежуваним необхідно виконувати із дотриманням темпу пред'явлення звукових сигналів.

Як ритмічний сигнальний подразник для стискання та розтискання пальців кисті використовували низькочастотну фоностимуляцію. Під час фоностимуляції як стимули звучали ритмічні акустичні сигнали, що імітували барабанний бій (програмне забезпечення Finale 2006; частота 2 c^{-1} , загальна кількість стимулів у пробі – 80). Вибір відносно низької частоти фоностимуляції зумовлений тим, що саме така частота відповідає частотному діапазону виконання мануальних рухів, що вивчаються. А останній принцип зумовлений біомеханічними можливостями реалізації рухів дистальних частин руки. Інерційні властивості таких частин руки виключають можливість реалізації рухів із частотами, які перевищують 3 c^{-1} . Слухові сигнали подавали бінаурально за допомогою чотирьох акустичних колонок, які розміщували на відстані 1,2 м від обстежуваного. Тривалість кожного сигналу становила 120 мс, частотний діапазон – 220–235 Гц, гучність на виході колонок не перевищувала 55 дБ над порогом чутності (визначали за допомогою шумоміра DE-3301 № 050701882). Така організація фоностимуляції забезпечує комфортне для сприйняття звучання стимулів, відповідає санітарним нормам. Гучність звуку додатково регулювали індивідуально для кожного обстежуваного до досягнення комфортного рівня.

Між етапами для відпочинку обстежуваних і унеможливлення розвитку явищ монотонії робили перерву на 1 хвилину. Упродовж цього часу проводили інструктаж про їх дії в наступній експериментальній ситуації. Це давало змогу обстежуваним краще налаштуватися на виконання наступного завдання та мінімізувало вплив попереднього етапу на параметри ЕЕГ. Задля виключення крайових ефектів реєстрацію ЕЕГ під час усіх проб починали через 15 с після початку діяльності та припиняли за 5 с до її завершення. ЕЕГ-тестування загалом тривало 15 хвилин.

Реєстрація та первинний аналіз електроенцефалографічних даних. Біоелектричну активність кори головного мозку вважали показником його інформаційних процесів. Її реєстрацію та первинний аналіз здійснювали за допомогою апаратно-програмних електроенцефалографічних комплексів «Нейроком», «Нейролаб» (ТУ У 33.1-02066769-001-2002, свідоцтво про державну реєстрацію № 6038/2007 від 26 січня 2007 року, сертифікат відповідності засобам виміральної техніки Державного комітету України з питань технічного регулювання та споживчої політики № UA-M1/2p-3641-2001, чинний до 18.04.2014 р.). Виробник – науково-технічний центр радіоелектронних медичних приладів і технологій «ХАІ-Медіка» Національного аерокосмічного університету імені М. С. Жуковського «Харківський аерокосмічний авіаційний інститут». ЕЕГ відводили з поверхні шкіри з використанням стандартних методичних прийомів.

Активні електроди розміщували за міжнародною системою 10/20 у дев'ятнадцяти точках на скальпі; використовували лобові (Fp1, Fp2, F3, F4, F7, F8), центральні (C3, C4), скроневі (T3, T4, T5, T6), тім'яні (P3, P4), потиличні (O1, O2), сагітальні (Fz, Cz, Pz) відведення. Відведення з непарним індексом відповідали лівій півкулі, а з парним – правій. Відведення монополярні: як референтні використовували вушні контакти A1 і A2. Для поліпшення якості запису використовували додаткові референтні електроди, які встановлювали між передньолобовим і латеральнолобовим відведеннями (Ref), між правим та лівим передніми лобовими відведеннями (N, nazion). Для поліпшеної режекції ЕКГ-сигналу (електрокардіографічного сигналу) з ЕЕГ використовували систему реєстрації ЕКГ. Кардіосигнал реєстрували в другому ЕКГ відведенні.

Для відстеження функціонального стану та реакції обстежуваних на стимули використовували вмонтовану в комплексну систему відеомоніторингу з інфрачервоним підсвічуванням. Реєстрували 40 с інтервали ЕЕГ під час кожної функціональної проби. Під час проведення Фур'є-реалізації епоха аналізу становила 4 с із 50% перекриттям, частота дискретизації аналогового сигналу – 500 Гц, вхідний опір для синфазного сигналу – понад 100 МОм. Фільтри високих частот устатковували на рівні 45 Гц, низьких – 0,5 Гц. Напруга внутрішніх шумів, приведена до входу, не перевищувала 0,8 мкВ. Стала часу перехідного процесу становила не менше 0,3 с, коефіцієнт послаблення синфазних сигналів – не менше 140 дБ, опір електродів – близько 100 кОм. Під'єднання реєструвальної апаратури до ЕОМ (процесор Intel Core TM 2 Duo CPU, звуковий пристрій Audio Device on High Definition) здійснювали через USB/2 порт. Межі можливої відносної похибки під час вимірювання напруги та часових інтервалів ЕЕГ сигналів становили $\pm 5\%$. Для режекції ЕЕГ-артефактів використовували процедуру ІСА-аналізу (Independent Component Analysis, аналізу незалежних компонент). У подальшому фільтрували ІСА-компоненти з артефактним сигналом із результативною ЕЕГ. Під час фільтрації артефактів з ЕЕГ видаляли не більше п'яти артефактних ІСА-компонент. У разі якщо окремі спалахи артефактної активності не вдавалося відфільтрувати за допомогою ІСА-обробки, артефактні відрізки видаляли з нативною ЕЕГ у ручному режимі.

Використання когерентного аналізу ЕЕГ дає змогу оцінити рівень просторової синхронізації нейронних ансамблів різних відділів кори однієї або протилежних півкуль під час формування функціональних станів людини. Обчислення цієї функції дає можливість стверджувати існування постійних фазових відношень, схожих або синхронних потенціалів між двома ЕЕГ відведеннями. Постійність фазових відношень, тобто висока когерентність потенціалів, відображає тісний функціональний зв'язок між активністю досліджуваних ділянок кори головного мозку, функціональну координацію, часову координацію (Lurija, 2000; Sviderskaja, 2009; Zhavoronkova, 2009). Первинний аналіз когерентності електричної активності основних частотних компонентів ЕЕГ здійснювали за допомогою програмного забезпечення «Нейроком». Показники когерентності розраховували для всіх відведень і тестових ситуацій. Оцінювали когерентність ЕЕГ-осциляцій у між- і внутрішньопівкульових парах відведень. Аналізували зміни коефіцієнтів когерентності, більших за 0,5.

У кожного обстежуваного в кожному відведенні ЕЕГ у стані спокою із заплющеними очима визначали моду спектральної потужності α -ритму ЕЕГ. Її значення усереднювали за всіма відведеннями; отриману величину вважали індивідуальною α -частотою обстежуваного (І α Ч, Гц) (Klimesch et al., 2007). В усіх жінок розраховували середнє значення такого показника. Прийняли умовний розподіл вибірки. Жінки, які мали менше значення І α Ч, ніж середнє, увійшли до групи з низькою І α Ч. Жінки, які мали більше значення І α Ч, ніж середнє, увійшли до групи з високою І α Ч. Додатково в десяти обстежуваних визначили рівень сталості величини індивідуальної α -частоти ЕЕГ у стані спокою за показниками п'яти реєстрацій у різні дні. Межі частотних субдіапазонів ЕЕГ визначали індивідуально за методи-

кою Angelakis et al. (2004), Klimesch et al. (2007). У правий бік від ІаЧ з кроком 2 Гц відкладали верхню межу $\alpha 3$ -субдіапазону. Вона відповідала нижній межі $\beta 1$ смуги. Зліва від піка з кроком у 2 Гц визначали нижню межу $\alpha 2$ -, у 4 Гц – $\alpha 1$ -, у 6 Гц – θ -частот. Відповідно до класичних уявлень визначали верхню межу $\beta 1$ - (25 Гц) і $\beta 2$ - (26–35 Гц) субдіапазонів.

Статистична обробка результатів. Для перевірки на нормальність розподілів числових даних у вибірках застосовано W-тест Шапіро – Уїлкоксона за допомогою програми Statistica 6.0. Оскільки розподіли наших даних звичайно були нормальними, розраховували середні значення (M), стандартні відхилення (σ) та величини похибки середнього ($\pm m$). Обчислення значущих відмінностей (від $P < 0,05 - < 0,01$) здійснювали, використовуючи параметричні тести, зокрема t-критерій Стюдента для залежних вибірок (між тестами) та незалежних із рівними вибірками (між групами).

Результати

Оцінювання індивідуальної модальної частоти α -ЕЕГ-активності та визначення індивідуальних меж субдіапазонів частотного спектра ЕЕГ в обстежуваних. Середнє значення модальної частоти α -активності у вибірці жінок – $10,25 \pm 0,03$ Гц. Враховуючи згладжений характер (відсутність вираженого піка) гістограми значень індивідуальної α -частоти (рис. 1) в об-

стежуваних жінок здійснили умовний розподіл вибірки за середнім значенням модальної частоти α -активності. Сформулювали дві групи: з високими значеннями ІаЧ ($n = 59, I\alpha Ч \geq 10,25$ Гц); із низькими значеннями ІаЧ ($n = 54, I\alpha Ч < 10,25$ Гц).

Похибка середнього ($\pm m$) для значень ІаЧ за показниками п'яти реєстрацій фонові ЕЕГ у різні дні варіювала в обстежуваних у діапазоні від 0,003 до 0,024. Такі результати свідчили про досить високу сталість величини ІаЧ в обстежуваних.

Когерентність ЕЕГ під час стискання та розтискання пальців кисті субдомінантної руки без зусилля у жінок із різною індивідуальною частотою α -ритму. У жінок із високою та низькою індивідуальною α -частотою у цих умовах фіксували збільшення когерентності всіх частотних діапазонів ЕЕГ у лобових, скроневих, центральних та тім'яних ділянках кори (з $P < 0,05 - < 0,01$). Така закономірність мала найбільшу значущість у $\alpha 2$ -субдіапазоні (рис. 2).

Когерентність ЕЕГ під час почергових рухів (перебирання) пальців кисті субдомінантної руки у жінок із різною індивідуальною частотою α -ритму. У жінок із високою та низькою індивідуальною α -частотою в цих умовах фіксували загалом збільшення когерентності всіх частотних діапазонів ЕЕГ у корі (з $P < 0,05 - < 0,01$). Така закономірність мала найбільшу значущість у $\alpha 2$ -, $\alpha 3$ - і β -субдіапазонах (рис. 3). Натомість у лобових ділянках у смугі θ -, $\alpha 1$ - і $\alpha 3$ -коливачь фіксували зменшення значень когерентності в групах обстежуваних (із $P < 0,05 - < 0,01$).

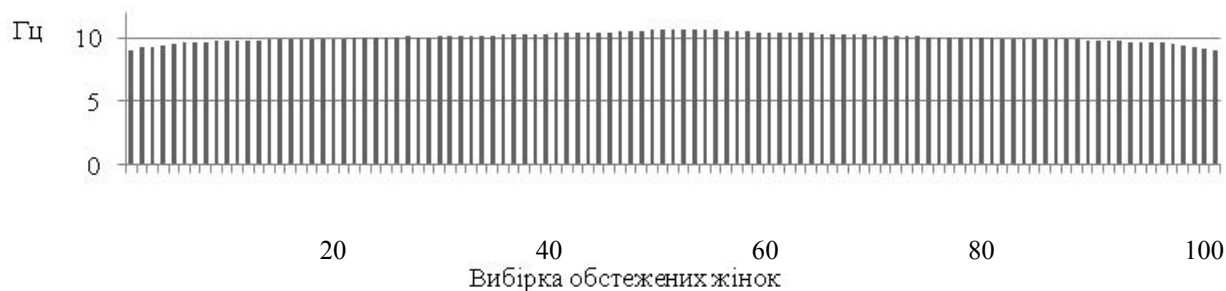


Рис. 1. Гістограма значень моди α -частоти в обстежуваних жінок: вертикальні стовпчики – індивідуальні значення моди α -частоти ЕЕГ в обстежуваних жінок

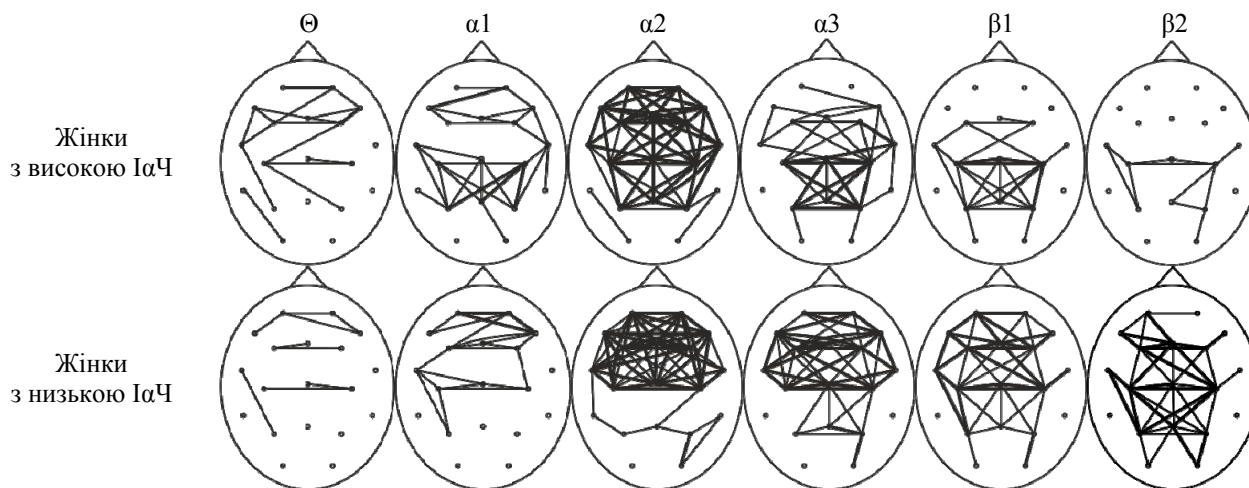


Рис. 2. Топокарти змін когерентності частотних компонентів ЕЕГ у групах жінок із різною індивідуальною частотою α -ритму під час стискання та розтискання пальців кисті субдомінантної руки без зусилля: **—**(••••) – зростання (зниження) когерентності порівняно зі спокоєм, тонка риска – $P < 0,05$, товста риска – $P < 0,01$

Когерентність ЕЕГ під час стискання та розтискання пальців кисті субдомінантної руки із силовим навантаженням у жінок із різною індивідуальною частотою α -ритму. У жінок із високою індивідуальною α -частотою в цих умовах фіксували збільшення когерентності частотних діапазонів ЕЕГ у ділянках кори (з $P < 0,05 - < 0,01$) (рис. 4). Така закономірність мала найбільшу значущість у $\alpha 2$ -, $\alpha 3$ - і β -субдіапазонах. Водночас, у жінок із високою ІаЧ фіксували зменшення коефіцієнтів когерентності θ - і

$\alpha 1$ -активності у центральних ділянках кори ($P < 0,05$), передусім справа, $\alpha 3$ -коливачь – у лобових відведеннях ($P < 0,05$). Жінок із низькою ІаЧ відзначало генералізоване зростання $\alpha 2$ -, $\alpha 3$ - і β -когерентності коливачь ЕЕГ у корі (з $P < 0,05 - < 0,01$) (рис. 4). Натомість у діапазоні θ - і $\alpha 1$ -активності реєстрували зменшення значень когерентності ($P < 0,05$) в лобових, центральних та тім'яних ділянках. Такі зміни мали більш локальний характер. Зниження когерентності також установлювали у лобовій ділянці у $\alpha 3$ -смугі.

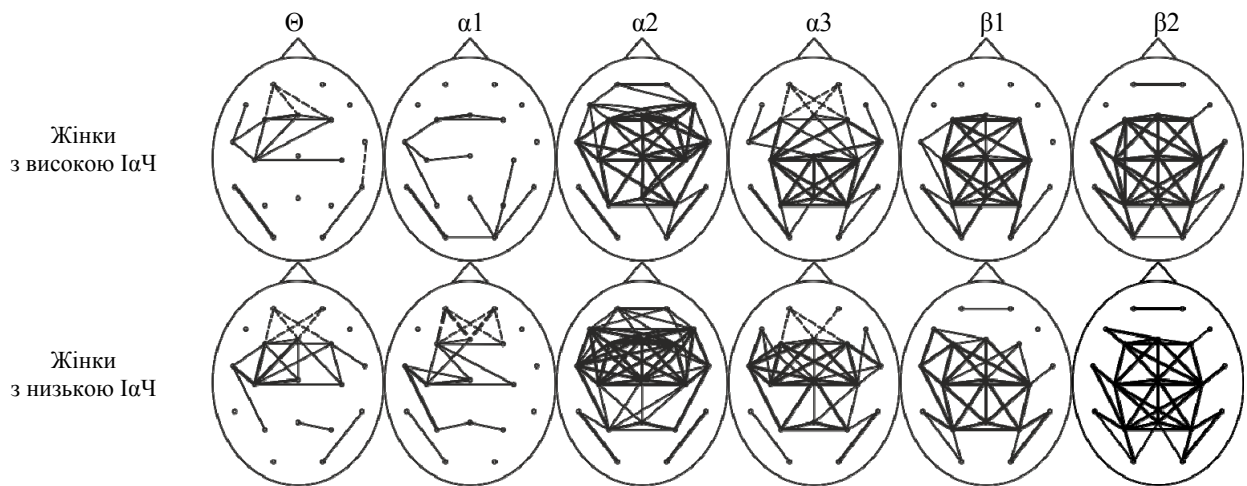


Рис. 3. Топокарти змін когерентності частотних компонентів ЕЕГ у групах жінок із різною індивідуальною частотою α -ритму під час почергових рухів (перебирання) пальців кисті субдомінантної руки: позначення див. рис. 2

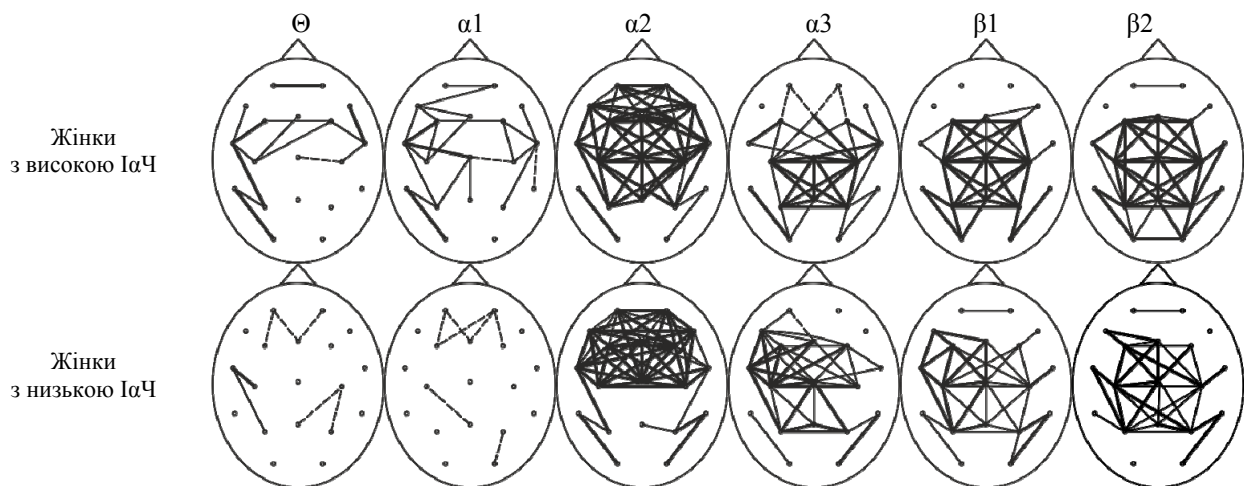


Рис. 4. Топокарти змін когерентності частотних компонентів ЕЕГ у групах жінок із різною індивідуальною частотою α -ритму під час стискання та розтискання пальців кисті субдомінантної руки із силовим навантаженням: позначення див. рис. 2

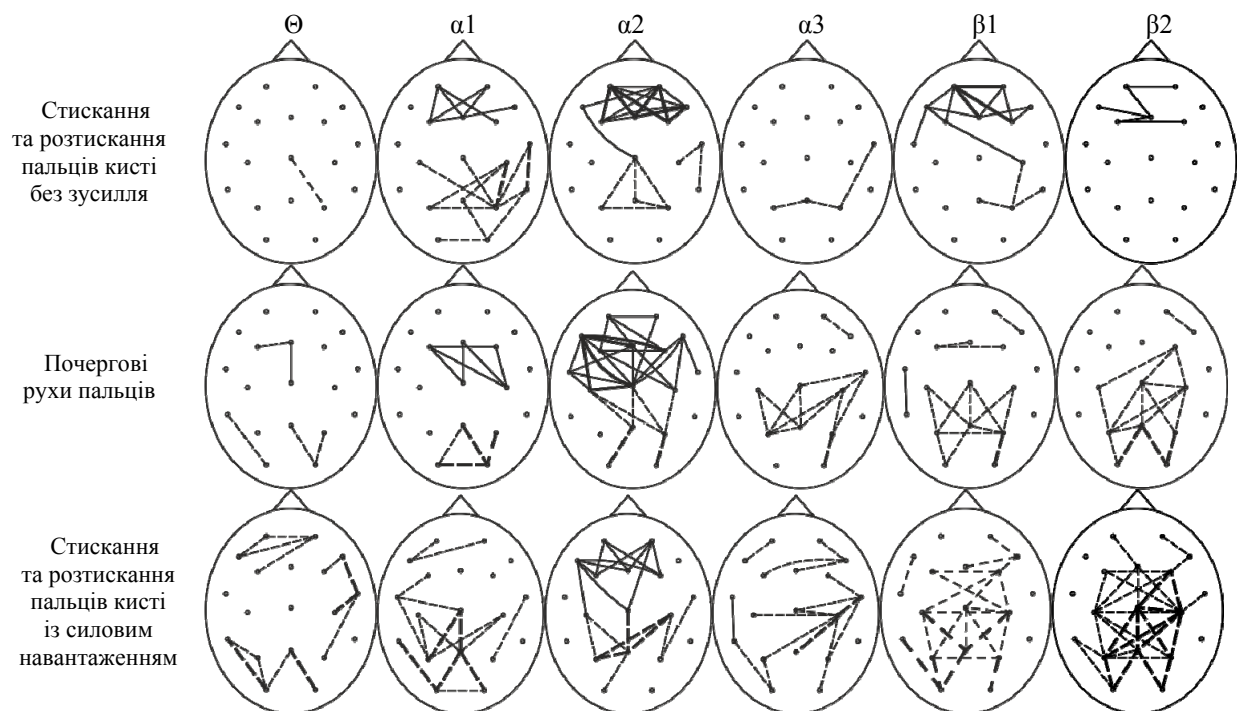


Рис. 5. Топокарти міжгрупових відмінностей когерентності частотних компонентів ЕЕГ під час виконання мануальних рухів у жінок із різною індивідуальною α -частотою: позначення див. рис. 2

Міжгрупові відмінності. Жінок із низькою ІαЧ під час стикування та розтискання пальців кисті без зусилля характеризували відносно більші значення коефіцієнтів когерентності α_1 -, α_2 - і β -коливань у лобових ділянках ($z P < 0,05 - < 0,01$) (рис. 5). Натомість у центральних, задніх скроневих та тім'яних кортикальних ділянках встановлено порівняно вищу когерентність частотних компонентів ЕЕГ у жінок із високою ІαЧ ($z P < 0,05 - < 0,01$). Почергові рухи пальців та, особливо, рухи із силовим навантаженням супроводжувалися порівняно вищими значеннями когерентності у корі у жінок із високою ІαЧ ($z P < 0,05 - < 0,01$) (рис. 5). В α_2 -субдіапазоні в цих умовах відзначали відносне переважання когерентності коливань у передніх кортикальних ділянках у жінок із низькою ІαЧ ($P < 0,05$).

Обговорення

Відповідно до одержаних результатів встановлено, що виконання МР, пов'язаних зі стикуванням і розтисканням пальців кисті без зусилля, супроводжувалося збільшенням значень коефіцієнтів когерентності у корі. За даними Lurija (2000), це може бути пов'язане із функціональним об'єднанням кортикальних ділянок, задіяних під час керування рухами дистальних м'язів, із посиленням довільного контролю. Відповідно до даних Zhavoronkova (2007), така особливість в умовах виконання рухів субдомінантною рукою може мати компенсаторний характер і полегшувати поширення збудження між окремими ділянками кори. У жінок із низькою індивідуальною α -частотою така закономірність мала більшу генералізованість і значущість у високих (α_3 -, β -) частотах спектра ЕЕГ, що може вказувати на більшу неспецифічність процесів кортикальної активації.

За виконання почергових рухів пальців і рухів із силовим навантаженням поряд із подібними змінами у жінок обох груп фіксували зменшення коефіцієнтів когерентності θ -, α_1 - і α_3 -активності, здебільшого у лобових відведеннях кори. За даними Klimesh et al. (2007), Lurija (2000), Buzsáki (2006), такі зміни у α_1 - і θ -субдіапазонах можуть бути наслідком актуалізації оперативної пам'яті під час утримання у фокусі уваги інформації про сенсорні стимули та здійснювані рухи, посилення процесів селективної уваги. Зменшення когерентності α_3 -активності у лобовій ділянці може відобразити додаткове селективне гальмування механізмів сенсорного входу (Ioffe, 2003; Kostandov, 2013) під час моторного програмування. Встановлену закономірність із функціональної точки зору можна розглядати, наприклад, як ЕЕГ-корелят процесу зіставлення аферентних інформаційних потоків про нові параметри роботи м'язів із низхідними впливами з боку фронтальної кори щодо попередньої моторної програми. Такі низхідні гальмірні впливи у процесі виконання мануальних рухів субдомінантною рукою загалом заважають моторному програмуванню (Ioffe, 2003), та, відповідно до результатів Kostandov (2013), у нашому експерименті можуть свідчити про певне зменшення пластичності процесів моторного програмування за виконання рухів складнішого характеру та необхідності дотримання заданого темпу. Виявлені зміни когерентності частотних компонентів ЕЕГ загалом можуть бути показником збільшення контролю з боку лобових структур за цих умов.

Варто зауважити як загальну тенденцію, що зміни кортикальної активності, встановлені за умови виконання різних рухів пальців субдомінантною руки, як от звичних хапальних рухів, почергових рухів та рухів із силовим навантаженням, як правило, відзначалися низькою специфічністю. Таку закономірність ми пояснюємо тим, що фактор виконання експериментальних тестів субдомінантною рукою, очевидно, мав вирішальне значення в характері організації мозкової активності, ніж сама специфіка мануальних рухів. На противагу, під час виконання рухів пальців ведучою (правою) рукою у жінок і чоловіків Morenko et al. (2013; 2014) Morenko (2016), Morenko and Korzyk (2016) відмічали характерні зміни кортикальної активності залежно від специфіки організації мануальної моторики.

Аналіз міжгрупових відмінностей вказує, що жінок із низькою ІαЧ характеризували відносно більші значення коефіцієнтів когерентності α_1 -, α_2 - і β -коливань у лобових ділянках. Це може свідчити про активніше залучення префронтальної ділянки у процес моторного програмування у жінок із низькою ІαЧ та вищий рівень їх довільної уваги за цих умов (Posner et al., 2006; Sviderskaja, 2009). Натомість у центральних, задніх скроневих і тім'яних кортикальних ділянках встановлено порівняно вищу когерентність частотних компонентів ЕЕГ у жінок із високою ІαЧ. Такі результати можуть бути пов'язані з меншим рівнем концентрації довільної уваги у жінок із високою ІαЧ під час моторного програмування на тлі можливо активнішого використання моторних програм-автоматизмів, вилучених зі слів пам'яті. Наше припущення узгоджується з інформацією Kazennikov (2009) про роль моторної кори в активації наявних нервових автоматизмів для виконання рухів. Почергові рухи пальців та, особливо, рухи із силовим навантаженням супроводжувалися порівняно вищими значеннями когерентності у корі у жінок із високою ІαЧ. Відповідно до результатів Kiroj et al. (2010) порівняно нижча когерентність частот спектра ЕЕГ у жінок із низькою ІαЧ може бути зумовлена слабшими інтегративними можливостями кори, пов'язаними із взаємодією неокортикальних проєкцій різних аналізаторних систем. Водночас, в α_1 - і α_2 -субдіапазонах ЕЕГ за цих умов відзначали відносне переважання когерентності коливань у фронтальних кортикальних ділянках у жінок із низькою ІαЧ.

Функціональний зміст таких міжгрупових відмінностей загалом відображає використання додаткових механізмів для досягнення результату та, як наслідок, певну надлишковість мозкових процесів (Kiroj and Belova, 2000) на тлі, можливо, слабших інтегративних можливостей кори у групі з низькою ІαЧ.

Висновки

Виконання мануальних рухів субдомінантною рукою у відповідь на сенсорні сигнали в жінок із різними вихідними характеристиками α -активності загалом супроводжувалося збільшенням когерентності частотних компонентів ЕЕГ, особливо в лобових, скроневих, центральних та тім'яних кортикальних ділянках. Поряд із тим, під час виконання почергових рухів пальців та рухів із силовим навантаженням у жінок обох груп фіксували зменшення коефіцієнтів когерентності θ -, α_1 - і α_3 -активності, здебільшого у лобових відведеннях кори. У жінок із низькою ІαЧ реєстрували вищу когерентність частотних компонентів ЕЕГ у лобових кортикальних ділянках. Натомість у центральних, задніх скроневих та тім'яних відведеннях встановлено порівняно вищу когерентність частотних компонентів ЕЕГ у жінок із високою ІαЧ.

Зміни кортикальної активності, встановлені під час виконання різних рухів пальцями субдомінантною руки, як от звичних хапальних рухів, почергових рухів та рухів із силовим навантаженням, як правило, відзначалися низькою специфічністю. Таким чином, фактор виконання експериментальних тестів субдомінантною рукою, очевидно, мав вирішальне значення в характері організації мозкової активності, порівняно із самою специфікою мануальних рухів.

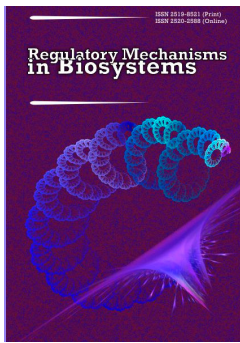
Подяки

Дослідження виконане в рамках наукової теми біологічного факультету Східноєвропейського національного університету імені Лесі Українки «Нейрофізіологічні механізми та системна організація сенсомоторної діяльності людини (віковий і статевий аспекти)», № 0111U002143 (2009–2011 рр.).

References

Anderson, M. P., Mochizuki, T., Xie, J., Fischler, W., Manger, J. P., Talley, E. M., Scammell, T. E., & Tonegawa, S. (2005). Thalamic Cav3.1 T-type Ca^{2+}

- channel plays a crucial role in stabilizing sleep. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(5), 1743–1748.
- Angelakis, E., Lubar, J. F., Stathopoulou, S., & Kounios, J. (2004). Peak alpha frequency: An electroencephalographic measure of cognitive preparedness. *Clinical Neurophysiology*, 115, 887–897.
- Anokhin, A., Muller, V., Lindenberger, U., Heath, A. C., & Myers, E. (2006). Genetic influences on dynamic complexity of brain oscillations. *Neuroscience Letter*, 397(1–2), 93–98.
- Averbeck, B. B., Chafee, M. V., Crowe, D. A., & Georgopoulos, A. P. (2002). Parallel processing of serial movements in prefrontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(20), 13172.
- Bazanova, O. M. (2008). Age related alpha activity change differs for males and females and for low and high alpha frequency EEG patterns. *Revista Española de Neuropsicología*, 10(1), 82–83.
- Bellone, C., & Nicoll, R. A. (2007). Rapid bidirectional switching of synaptic NMDA receptors. *Neuron*, 55(5), 779–788.
- Buzsáki, G. (2006). *Rhythms of the brain*. Oxford University Press, New York.
- Cisek, P. (2005). Neural representations of motor plans, desired trajectories, and controlled object. *Cognitive Process*, 6(1), 15–24.
- Hikosaka, O., Nakamura, K., Saka, K., & Nakahara, H. (2002). Central mechanisms of motor skill learning. *Current Opinion in Neurobiology*, 12(2), 217–222.
- Hummel, F., Saur, R., Lasogga, S., Plewnia, C., Erb, M., Wildgruber, D., Grodd, W., & Gerloff, C. (2004). To act or not to act: Neural correlates of executive control of learned motor behavior. *NeuroImage*, 23, 1391–1401.
- Ioffe, M. (2003). *Mozgovye mehanizmy formirovaniya novyh dvizhenij pri obuchenii: Jevoljucija klassicheskikh predstavlenij [Brain mechanisms of formation of new movements in the training: the evolution of classical concepts]*. I. P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity, 53(1), 5–21 (in Russian).
- Kaplan, A. J., & Borisov, S. V. (2003). Dinamika segmentnih karakteristik al'fa-aktivnosti EEG cheloveka v pokoe i pri kognitivnyh nagruzkah [Dynamics segment characteristics of EEG alpha-activity of man at rest and during cognitive load]. I. P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity, 53(1), 22–32 (in Russian).
- Kazennikov, O. V. (2009). Kortiko-spinal'nye vlijaniya na distal'nye myschy ruk pri inercionnoj nagruzke [Corticospinal effect on distal muscles of the hands when the inertial load]. I. P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity, 59(3), 288–295 (in Russian).
- Kiroj, V. N., Vladimirov, B. M., Aslanjan, E. V., Bahtin, O. M., & Minjaeva, N. R. (2010). Jeletrograficheskie korreljaty real'nyh i myslenykh dvizhenij: Spektral'nyj analiz [Electrographic correlates of real and mental movements: Spectral analysis]. I. P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity, 60(5), 525–533 (in Russian).
- Kiroj, V. N., & Belova, E. I. (2000). Mechanisms of formation and role of the oscillatory activity of neuronal populations in brain state and information processing. I. P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity, 50(2), 179–191.
- Klimesch, W., Sauseng, P., & Hanslmayr, S. (2007). EEG alpha oscillations: The inhibition-timing hypothesis. *Brain Research Reviews*, 53, 63–88.
- Kostandov, J. A. (2013). Izmeneniya niz'ko- i vysokochastotnyh kolebanij al'fa-diapazona EEG v intervalah mezhdzhu znachimimi zritel'nymi stimulami [Changes in the low- and high-frequency oscillations of EEG alpha range in the intervals between the significance of visual stimuli]. *Human Physiology*, 39(4), 5–12 (in Russian).
- Kristeva, R., Chakarov, V., Losch, F., Hummel, S., Popa, T., & Schulte-Mönting, J. (2005). Electroencephalographic spectral power in writer's cramp patients: Evidence for motor cortex malfunctioning during the cramp. *NeuroImage*, 27(3), 706–714.
- Lurija, A. R. (2000). Vysshie kortikal'nye funkcii cheloveka i ih narusheniya pri lokal'nyh porazhenijah mozga [Higher cortical functions of man and their disturbances in local brain lesions]. *Akademicheskij Prospekt*, Moscow (in Russian).
- Morenko, A. G., Kocan, I. J., & Pavlovich, O. S. (2013). Kortikal'ni aktivacijni procesi u cholovikiv iz visokuju ta niz'koju vihidnoju individual'noju chastotoju al'fa-ritmu pid chas sensomotornoj dijafnosti riznoji skladnosti. *Fiziologichnij Zhurnal*, 59(5), 41–49 (in Ukrainian).
- Morenko, A. G., Tsjos, A. V., & Kotsan, I. Y. (2014). Features of the cortical activity of men having a high or low alpha-frequency background of the EEG while performing alternate finger movements. *Health Problems of Civilization*, 8(1), 24–31.
- Morenko, A. G., Tsjos, A. V., & Kotsan, I. Y. (2013). Electrical activity of the cerebral cortex in men having high or low output alpha-frequencies while performing usual manual movements in response to sensory signals. *Human and Health*, 7(3), 3–9.
- Morenko, A. H. (2016). Bioelectrical activity of the brain during performance of manipulative movements in women with different modal alpha-frequencies. *Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Medycyna*, 7(1), 65–70.
- Morenko, A. H., & Korzyk, O. V. (2016). Brain processes in women with different modal alpha-frequency through the execution of manual movements with applying of force. *Biological Bulletin of Bogdan Chmelnytsky Melitopol State Pedagogical University*, 1, 326–341.
- Müller, G. R., Neuper, C., Rupp, R., Keinrath, C., Geyer, H. J., & Pfurtscheller, G. (2003). Event-related beta EEG changes during wrist movements induced by functional electrical stimulation of forearm muscles in man. *Neuroscience Letters*, 340(2), 143–147.
- Ng, S. C., & Raveendran, P. (2007). EEG peak alpha frequency as an indicator for physical fatigue. *Medicon*, 16, 517–520.
- Niswender, C. M., Jones, C. K., & Conn, P. J. (2005). New therapeutic frontiers for metabotropic glutamate receptors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 5(9), 847–857.
- Page, A. J., O'Donnell, T. A., & Blackshaw, L. A. (2006). Inhibition of mechanosensitivity in visceral primary afferents by GABA(B) receptors involves calcium and potassium channels. *Neuroscience*, 137(2), 627–636.
- Posner, M. I., Sheese, B. E., Oldudas, Y., & Tang, Y. (2006). Analyzing and shaping human attentional networks. *Neural Networks*, 19, 1422.
- Razumnikova, O. M., Tarasova, I. V., & Vol'f, N. V. (2009). Osobennosti aktivacii kory u lic s vysokoj i nizkoj verbal'noj kreativnost'ju: Analiz al'fa 1-, 2-ritmov [Features activation in persons with peak and off-peak times verbal creativity: Analysis of alpha 1-, 2-rhythm]. I. P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity, 59(5), 581–586 (in Russian).
- Ruge, D., Muggleton, N., Hoard, D., Caronni, A., & Rothwell, J. C. (2014). An unavoidable modulation? Sensory attention and human primary motor cortex excitability. *European Journal of Neuroscience*, 40(5), 2850–2858.
- Smit, C. M., Wright, M. J., Hansell, N. K., Geffen, G. M., & Martin, N. G. (2006). Genetic variation of individual alpha frequency (IAF) and alpha power in a large adolescent twin sample. *International Journal of Psychophysiology*, 61(2), 235–243.
- Spergel, D. J. (2007). Calcium and small-conductance calcium-activated potassium channels in gonadotropin-releasing hormone neurons before, during, and after puberty. *Journal of Endocrinology*, 148(5), 2383–2390.
- Sviderskaja, N. E. (2009). Formy funkcional'noj asimmetrii prostranstvennoj organizacii fonovyh EEG u cheloveka [The forms of functional asymmetry of the spatial organization of the background EEG in humans]. I. P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity, 59(1), 66–74 (in Russian).
- Umrjuhin, E. A., Korobejnikova, I. I., & Karatygin, N. A. (2009). Uspeshnost' vypolnenija testovyh zadaniy studentami s razlichnymi spektral'nymi karakteristikami α -ritma fonovyh jeletroencefalogrammy [Successful execution of tests students with different spectral characteristics α -EEG background rhythm]. *Human Physiology*, 35(5), 33–39 (in Russian).
- Zhavoronkova, L. A. (2009). Pravshi-levshi. Mezhpolutshamaja asimmetrija biopotencialov mozga cheloveka [Right-handed people, the left-hander. Hemispheric asymmetry of the human brain biopotentials]. *Jekoinvest*, Krasnodar (in Russian).



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(1), 58–65
doi: 10.15421/021711

Three-dimensional structure of the lingual papillae of healthy rats and rats with experimental diabetes mellitus (in the context of mechanism of development of diabetic glossitis)

S. L. Popel', O. V. Baskevich*, V. M. Zhurakivskiy**,
O. Y. Zhurakivska**, I. V. Melnik**, S. Z. Krasnopolskij**, O. V. Atamanchuk**

**Precarpatian National University named after V. Stefanik, Ivano-Frankivsk, Ukraine*

***Ivano-Frankivsk National Medical University, Ivano-Frankivsk, Ukraine*

Article info

Received 18.01.2016

Received in revised form

10.02.2017

Accepted 12.02.2017

*Precarpatian National University
named after V. Stefanik,
Shevchenko str., 57,
Ivano-Frankivsk, 76000, Ukraine
Tel.: +38-097-87-41-446
E-mail: serg_popel@mail.ru*

*Ivano-Frankivsk
National Medical University,
Galitska Str., 2,
Ivano-Frankivsk, 76000, Ukraine*

Popel', S. L., Baskevich, O. V., Zhurakivskiy, V. M., Zhurakivska, O. Y., Melnik, I. V., Krasnopolskij, S. Z., & Atamanchuk, O. V. (2017). Three-dimensional structure of the lingual papillae of healthy rats and rats with experimental diabetes mellitus (in the context of mechanism of development of diabetic glossitis). Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(1), 58–65. doi: 10.15421/021711

We studied the three-dimensional structure and patterns of distribution of the lingual papillae of healthy rats (the norm) and their changes in the process of development of diabetes mellitus I type. The research was conducted on 65 laboratory rats of the Weestar line. The research investigated the mucus shell and the microcirculatory network of the tongue. The distribution and three-dimensional structure of the papillae of the tongue were studied using a scanning electron microscope. It was found that there are 5 morphological subspecies of filiform papillae on the dorsal surface of body of the tongue: true filiform, flattened, thin and giant conical and brush-like. Isolated fungiform papillae are unevenly distributed between filiform papillae. The dorso-lateral edge of the dorsal lingual surface is covered by foliate papillae. The unique oval papilla vallate is located in the back-end of the middle line of the root of the tongue. The far back of the root of the tongue lacks papillae, is flattened and covered by squamous formations. The distribution and types of lingual papillae is similar in rats to other rodents. In the process of development of diabetic glossitis a reduction in the height of different types of papillae of the tongue was observed, and an increase in the amount of keratinized mass, which plays a role in the fixation of microflora on the surface of the mucus shell, which as a result may lead to development of inflammatory process in the tongues of rats with experimental diabetes mellitus. The stages of morphological and morphometric changes in the mucus shell and microcirculatory network of the tongues of rats with diabetes mellitus were investigated, the characteristic signs of these changes were marked. On the basis of morpho-functional changes of the tongues of rats with experimental streptozotocin induced diabetes mellitus, two stages of development of pathomorphological changes were distinguished: 1) reactive changes (2–4th week) and 2) destructive processes (6–8th week). At the end of the first stage there was a reduction in height of the filiform papillae and width of mushroom-like papillae in the mucus shell of the tongue, an increase in its keratinization, a considerable reduction in the number of cells in the deeper layers of the epithelium of the tongue and the adsorption capacity of superficial epitheliocytes diminished, a significant reduction in the diameter of path clearance of all departments of the microcirculatory network is traced here. At the end of the secondary stage, there was a reduction in the sizes of all papillae of the back of the tongue, in all links of the microcirculatory network there was a development of diabetic microangiopathy which is characterized: by narrowing of the arterial and exchange links on a background expansion of capacity link. The question of influencing the pathological process in the vessels of the microcirculatory network on the state of the mucus shell of the tongue in animals with experimental streptozotocin induced diabetes mellitus is discussed.

Keywords: lingual papillae; diabetes mellitus; diabetic glossitis; rat

Тривимірна структура сосочків язика щурів у нормі та при експериментальному цукровому діабеті (до механізму розвитку діабетичного глоситу)

С. Л. Попель*, О. В. Баскевич*, В. М. Жураківський**,
О. Я. Жураківська**, І. В. Мельник**, С. З. Краснополський**, О. В. Атаманчук**

**Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника, Івано-Франківськ, Україна*

***Івано-Франківський національний медичний університет, Івано-Франківськ, Україна*

Вивчено тривимірну структуру та виявлено закономірності розподілу сосочків язика у щурів у нормі та їх зміни у процесі розвитку цукрового діабету I типу. Дослідження виконані на 45 статевозрілих білих щурах-самцях лінії Вістар. Досліджено слизову оболонку та мікроциркуляторне русло язика. Розподіл та тривимірну структуру сосочків язика вивчено за допомогою сканувального електронного мікроскопа. На дорзальній поверхні тіла язика вперше виявлено п'ять морфологічних підвидів ниткоподібних сосочків: сплюснені, справжні ниткоподібні, конусоподібні, гігантські конічні та розщеплені на верхівці (щіткоподібні). Поодинокі грибоподібні сосочки нерівномірно розподілені між ниткоподібними сосочками. Тіло язика в задній частині бічного краю містить листкоподібні сосочки. Єдиний овальний валикоподібний сосочок розташовується на межі тіла та кореня язика. Задня частина кореня язика позбавлена сосочків, сплюснена та вкрита лусочкоподібними утвореннями. Розподіл і види сосочків язика, що спостерігаються у щурів, подібні до таких в інших різновидів гризунів. Досліджено поетапні морфологічні та морфометричні зміни слизової оболонки та мікроциркуляторного русла язика за цукрового діабету, відмічено характерні ознаки цих змін. На основі морфофункціональних змін язика за ЕСЦД виділено дві стадії розвитку в ньому патоморфологічних змін: 1) реактивних змін (2–4-й тиждень) і 2) деструктивних процесів (6–8-й тиждень). У процесі розвитку діабетичного глоситу спостерігається зменшення висоти різних видів сосочків язика, збільшується кількість кератинових мас, що відіграє роль у затриманні мікрофлори на поверхні слизової оболонки і як наслідок спричиняє розвиток запального процесу в язиці за експериментального цукрового діабету.

Ключові слова: сосочки язика; цукровий діабет; діабетичний глосит; щурі

Вступ

Вивчення морфології язика, особливо структури слизової оболонки з її сосочками на дорзальній поверхні, вказує на значну мінливість цих утворень у різних хребетних тварин (Abumandour, 2014). Дослідження мікроструктури язика проведені, в основному, з використанням світлооптичної мікроскопії та здійснюється, перш за все, на лабораторних тваринах (Can et al., 2016). Такі дослідження проведені також у диких видів гризунів (Jackowiak et al., 2014; Goodarzi and Hoseini, 2015). У науковій літературі описано характерні риси язика гризунів – значно подовжене тіло та добре виражена вигнутість спинки язика (Torrak and Yilmaz, 2016). Дорзальна поверхня слизової оболонки язика покрита сосочками, для яких характерне певне різноманіття, різна кількість і структура, залежно від типу живлення, поведінки та способу пережовування їжі (Reginato et al., 2014; Can et al., 2016). Окремі автори (Jackowiak et al., 2014; Wolczuk, 2014) у своїх дослідженнях розрізняють сосочки, які виконують суто механічну функцію (ниткоподібні, конічні) та три види смакових сосочків (грибоподібні, валикоподібні, листкоподібні), які спостерігаються в усіх ссавців (Kilinc et al., 2010). Необхідність існування цих видів сосочків продиктована тим, що слизова оболонка язика (СОЯ) упродовж життя зазнає дії різних механічних, термічних, хімічних факторів та впливу продуктів життєдіяльності мікроорганізмів (Westfall et al., 2015).

Останні роки ознаменовані значним підвищенням інтересу до «нетрадиційних функцій» епітелію СОЯ. Це пов'язано з визнанням його ролі в реакціях місцевого імунітету та ініціалізації та стабілізації запальних процесів, які посідають провідне місце у патології шлунково-кишкового тракту (Ding et al., 2016). Епітеліоцити володіють значним ефекторним потенціалом під час здійснення імунокомпетентних реакцій, реалізуючи його у відповідь на стимулювальний вплив екзогенної та ендогенної природи (Gouri et al., 2013). Епітеліоцити конститутивно експресують, а за активації – посилюють секрецію інгібіторів протизапальних пептидних медіаторів, цитокинових рецепторів тощо (Rukavina, 2016). Завдяки цьому вони набувають здатності активно взаємодіяти з індукторами та ефекторами запалення та імунітету (нейтрофілами, еозинофілами, макрофагами, Т- і В-лімфоцитами). Однак про їх морфометричні показники у щурів відомо мало, а відомості про кількісні зміни лейкоцитарних елементів СОЯ за експериментального стрептозоцинозного цукрового діабету (ЕСЦД) взагалі відсутні. Також залишається невивченою проблема взаємозв'язку між перебудовою СОЯ та гемомікроциркуляторного русла (ГМЦР) язика за ЕСЦД (Rezki et al., 2016).

Мета дослідження – вивчити особливості структури слизової оболонки спинки язика щурів та її гемомікроциркуляторного русла в нормі та закономірностей їх змін за цукрового діабету I типу.

Матеріал і методи досліджень

Спостереження проводилися на 45 дорослих білих щурах лінії Вістар, масою 150–200 г. Язик відпрепарували від ниж-

ньої щелепи та фіксували в 10% нейтральному формаліні, зневоднювали в серіях етанолу та ацетону зростаючої концентрації. Після цього висушували методом переходу критичної точки. Зразки напилували вуглем (під кутом 90°), відтіняли алюмінієм (під кутом 15°) і створювали електропровідний шар срібла (15 нм). Зразки переглядали в сканувальному електронному мікроскопі JEOL-25A-T3225 (Японія) з прискорювальною напругою 20 кВ. Тварин утримували за умов віварію згідно з нормативними документами. ЕСЦД моделювали за методикою Abdel-Reheim et al. (2014). Тварин дослідної групи (40 щурів) виводили з експерименту через 2, 4, 6 і 8 тижнів від початку моделювання ЕСЦД із дотриманням загальноприйнятих правил. Контрольну групу (КГ) склали п'ять інтактних тварин. Тканини язика після фіксації у 12% нейтральному формаліні занурювали у парафін. Зрізи товщиною 15–20 мкм забарвлювали гематоксилином і еозином, фукселін-пікрофуксином і за Романовським – Гімза.

Розмір, висота та щільність розташування сосочків язика, товщину епітеліального шару та діаметр судин гемомікроциркуляторного русла (ГМЦР) СОЯ визначали за допомогою комп'ютерної програми Biovision 4.01.

Для трансмісійної електронної мікроскопії матеріал фіксували у 2,4% глютаральдегіді, дофіксували в 1,0% розчині OsO₄, зневоднювали в серії спиртів і ацетонів, поміщали в суміш епоксидних смол Епон-812-Аралдит. Напівтонкі зрізи забарвлювали метиленовим синім, ультраатонкі – контрастували за Рейнольдс за загальноприйнятою методикою та переглядали в електронному мікроскопі ПЕМ-125К Сумського ПО «Електрон» (Україна).

Комп'ютерне опрацювання даних проводили за допомогою статистичного пакета Statistica 6 (StatSoft Inc., USA). Використовували непараметричні методи дослідження (критерій Уїлкоксона, Манна – Уїтні). Вибіркові параметри, наведені далі в таблицях і тексті, мають такі позначення: \bar{x} – вибіркове середнє, SE – стандартна помилка середнього. Статистичні відмінності вважали достовірними, коли отриманий рівень відмінності для тестової статистики був меншим $P = 0,05$.

Результати

Язик щурів має 1,5–2,0 см у довжину та близько 7–10 мм в ширину в ділянці кореня. На дорзальній поверхні язика спостерігали глибоку серединну борозну, довжиною 3–4 мм. У слизовій оболонці спинки язика розрізняють чотири види сосочків: нитко-, листко-, грибо- та валикоподібні.

Методом сканувальної електронної мікроскопії вперше диференційовано п'ять різновидів ниткоподібних сосочків. Справжні ниткоподібні сосочки на верхівці язика мають неправильну циліндричну або сплюснену форму та вигинаються у напрямку до кореня язика (рис. 1а). Основа сосочків має 20–30 мкм ширину за висоти 60–75 мкм. Щільність розташування коливається від 80 до 110 сосочків на 1 мм² площі поверхні язика. Другий різновид – сплюснені сосочки, які розташовуються по серединній лінії тіла язика (рис. 1б). Основа таких сосочків має

40–50 мкм ширину, тоді як їх довжина складає 90–120 мкм. Їх поверхня часто покрита кератиновими лусочками. Щільність розташування сплюснених сосочків вища на тілі, ніж на верхівці язика: 290–320 на 1 мм². По краях тіла язика спостерігаються тонші конічні сосочки (рис. 2а), яких у цій частині значно більше, ніж в інших відділах. Це третій різновид ниткоподібних сосочків язика. Ширина цих сосочків поблизу їх основи складає 20 мкм, тоді як довжина дорівнює 130–140 мкм. Щільність конічних сосочків на краях язика складає 330–340 на 1 мм². На валикоподібних підвищеннях дорзальної поверхні язика по обидва боки середньої лінії розташовуються великі конічні сосочки, часто відомі як «гігантські» (рис. 2б). Їх верхівки направлені вертикально у фронтальній площині.

Найбільші конічні сосочки містяться в середній частині тіла язика, тоді як на його краях вони поступово зменшуються

у розмірі. Основа найбільших конічних сосочків становить 180–200 мкм в ширині, а довжина – 100–135 мкм. В окремих ділянках на дорзальній поверхні задньої частини тіла язика зустрічаються розщеплені на верхівці ниткоподібні сосочки (рис. 3), тому їх ще можна назвати «щіткоподібними». Ширина основи цих сосочків складає 40–50 мкм, тоді як довжина – близько 60 мкм, а їх щільність розташування – 120 на 1 мм². Другий вид сосочків слизової оболонки язика – грибоподібні, які рівномірно розподіляються між ниткоподібними (рис. 4а). Щільність грибоподібних сосочків складає 3–5 на 1 мм². Кожен із них – округла структура діаметром 98–124 мкм. На плоскій поверхні кожного сосочка розташована єдина пора смакової цибулини. Слід наголосити, що смакові пори ми виявляли також в основі цих сосочків (рис. 4б). Розподіл грибоподібних сосочків у тілі язика нерівномірний.

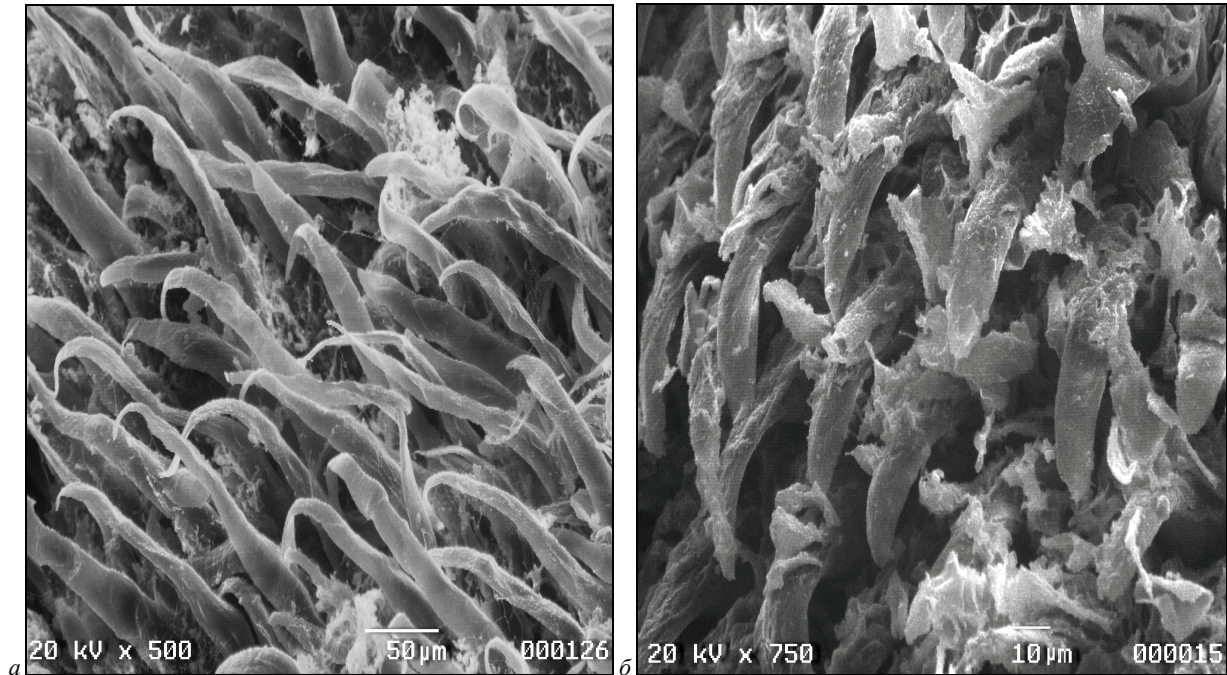


Рис. 1. Структура ниткоподібних (а) і сплюснених (б) ниткоподібних сосочків язика щура в нормі

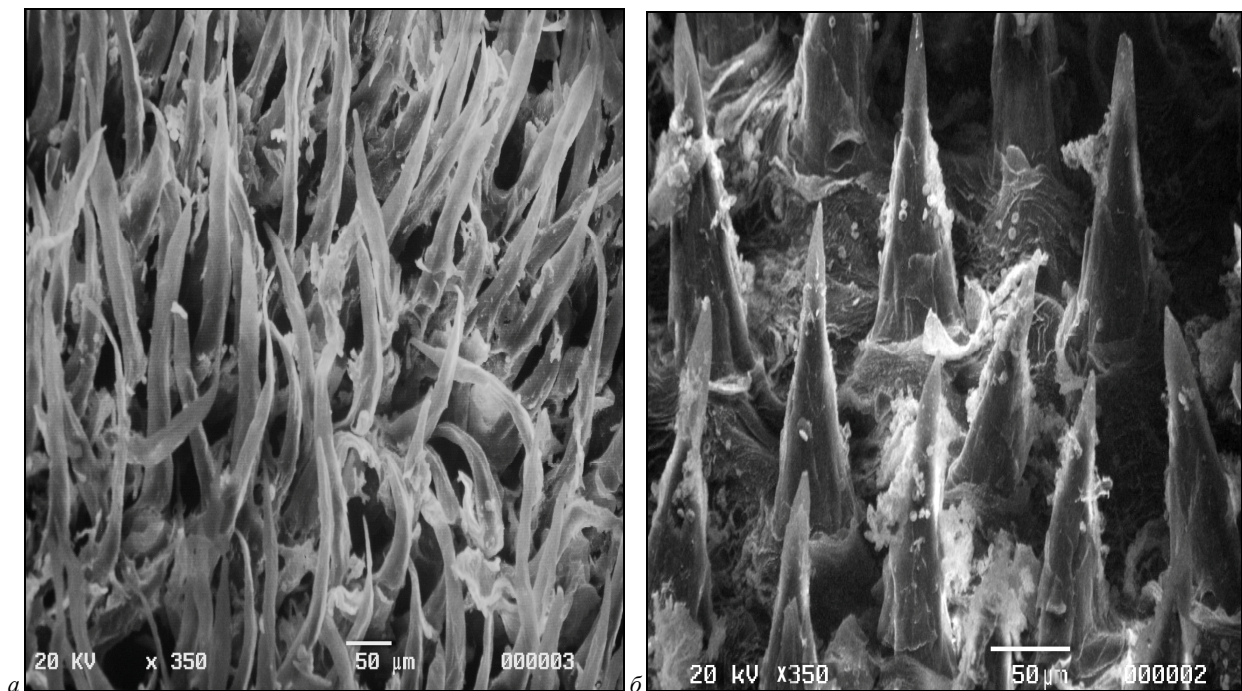


Рис. 2. Структура тонких (а) і гігантських (б) конічних сосочків язика щура в нормі

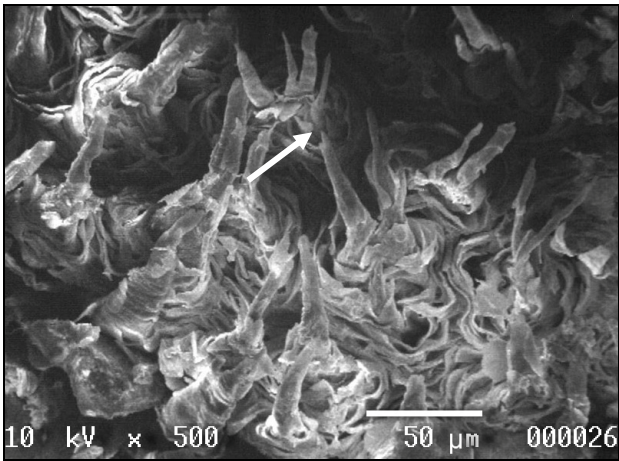


Рис. 3. Тривимірна структура розщеплених на верхівці ниткоподібних сосочків язика щура в нормі (показано стрілкою)

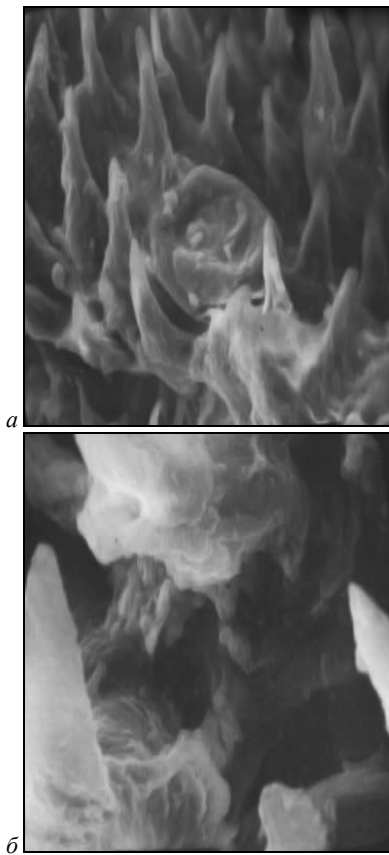


Рис. 4. Тривимірна структура грибоподібного сосочка язика у щура в нормі (а) і смакова пора (показана стрілкою) в його основі (б): сканувальна електронна мікроскопія, збільшення а – $\times 300$, б – $\times 1200$

Листкоподібні сосочки (4–5) розташовуються по краях задньої частини тіла язика (рис. 5). Ширина кожного становить 300 мкм. По серединній лінії язика на межі тіла та кореня язика розташовується єдиний валикоподібний сосочок (рис. 6). Він має циліндричну форму та оточений валиком. Їх розділяє чітка безперервна циркулярна борозна. Спереду від нього розташовані ниткоподібні, а позаду – сплюснений відділ слизової оболонки кореня язика. Діаметр валикоподібних сосочків коливається в широкому діапазоні – 240–720 мкм.

Вивчення гістологічних зрізів показало, що епітелій слизової оболонки спинки язика має чотири шари: базальний, остистий, зернистий і роговий. На гістологічних препаратах у різних

напрямах перерізу язика виявляються окремі види сосочків, побудовані за загальним планом: зовні розташована епітеліальна вистилка, що лежить на базальній мембрані. Вона має вигляд безперервної рівномірно забарвленої лінії. Під нею розташований власний сполучнотканинний шар слизової оболонки. Цей шар віддає 5–20 тонших сполучнотканинних сосочків, які вдаються в епітелій і містять значну кількість кровоносних судин. Сполучнотканинні сосочки проникають в епітеліальний шар на глибину $68,9 \pm 6,7$ мкм. У товщі сполучнотканинного сосочка та власної пластинки під сосочками у пухкій сполучній тканині міститься щільна мікрогемосудинна сітка – джерело кровопостачання СОЯ. Дані морфометричного дослідження СОЯ інтактних тварин і в різні терміни від початку моделювання ЕСЦД наведено в таблиці 1. На гістологічних препаратах власної пластинки СОЯ інтактних щурів у кожному полі зору визначаються $1,3 \pm 0,23$ тканинних базофілів, $0,9 \pm 0,15$ лімфоцитів, $1,1 \pm 0,31$ макрофагів і $0,4 \pm 0,18$ плазматичних клітин (табл. 2).

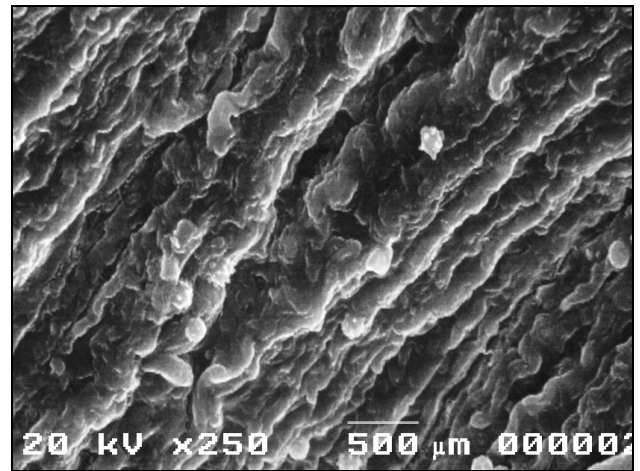


Рис. 5. Структура листкоподібних сосочків язика щура в нормі

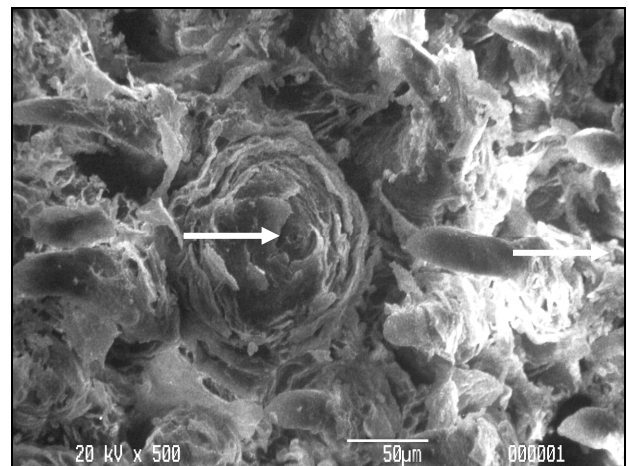


Рис. 6. Структура валикоподібних сосочків язика щура в нормі: стрілкою показана пора смакової цибулини

Гемомікроциркуляторне русло (ГМЦР) СОЯ (табл. 3) представлено артеріолами ($d = 14,8 \pm 1,12$), прекапілярами ($d = 9,6 \pm 0,82$), капілярами ($d = 5,9 \pm 0,53$), посткапілярами ($d = 11,3 \pm 0,81$) і венулами ($d = 17,3 \pm 1,25$).

Через два тижні після початку моделювання ЕСЦД визначається досить строката будова епітеліальних сосочків язика. Висота більшості з них зменшується на 10,8% ($P < 0,05$), в інших – незначно збільшується (на 3,6%) за рахунок нашарування зроговілих мас (рис. 7). У цілому, порівняно з показниками тварин КГ, абсолютна величина всіх сосочків зменшується. При цьому кількість клітин у базальному шарі зменшується на 6,3%, в остистому – на 8,8%, у зернистому шарі – на 8,0% ($P <$

0,05). Кількість клітин у роговому шарі СОЯ, навпаки, збільшується на 12,5% (табл. 1). Результати дослідження ГМЦР СОЯ показали, що середній діаметр мікросудин приносної ланки зменшується на 5,3%, обмінної – на 8,4%, тоді як просвіт об'ємної ланки вірогідно ($P < 0,05$) збільшується на 10,9% (табл. 3). У цей термін порівняно з групою інтактних тварин на 20,6% ($P < 0,05$) збільшується кількість відкритих артеріоло-венулярних анастомозів (АВА). Незважаючи на явища повнокрів'я в цей термін дослідження, кількість клітин лейкоцитарного ряду відповідає значенням групи інтактних тварин (табл. 2).

Через чотири тижні від початку моделювання ЕСЦД зберігається тенденція до зменшення висоти сосочків СОЯ, середні значення вірогідно відрізняються від показників у контрольній

і попередній експериментальній групі (табл. 1). Кількість шарів клітин базального шару порівняно з інтактними тваринами зменшується на 18,8% і на 13,3% з попереднім терміном спостереження ($P < 0,05$). В остистому шарі кількість клітин зменшується відповідно на 14,7% і 6,5%, а в зернистому – на 12,0% і 4,3% ($P < 0,05$). У роговому шарі кількість клітин збільшується відповідно на 43,8% і 27,8%. Це добре корелює зі зменшенням кровопостачання СОЯ, на що вказують результати дослідження мікрогемосудин (табл. 3). Середній діаметр просвіту гемокапілярів зменшується на 8,1%, а венул, навпаки, збільшується на 16,2% ($P < 0,05$). Таке незначне збільшення об'ємної ланки ГМЦР свідчить про зменшення, порівняно з попереднім терміном експерименту, кількості АВА.

Таблиця 1

Морфометричні показники ($x \pm SE$) слизової оболонки спинки язика щурів у нормі та у різні терміни після початку моделювання ЕСЦД

Термін	Висота епітеліальних сосочків, мкм	Кількість шарів клітин в епітелії			
		базальних	шипуватих	зернистих	рогових
Контрольна група	562,0 ± 40,2	1,62 ± 0,48	3,41 ± 0,63	2,52 ± 0,26	3,22 ± 0,52
2 тижні	501,0 ± 34,1	1,51 ± 0,33	3,17 ± 0,53	2,36 ± 0,26	3,61 ± 0,43
4 тижні	439,3 ± 30,9*	1,30 ± 0,22**	2,93 ± 0,27*	2,23 ± 0,27*	4,62 ± 0,42*
6 тижнів	333,1 ± 25,9**	1,22 ± 0,26*	2,51 ± 0,23*	2,11 ± 0,21*	4,84 ± 0,32*
8 тижнів	226,7 ± 20,3**	1,21 ± 0,23*	2,25 ± 0,23**	2,02 ± 0,24*	4,71 ± 0,33*

Примітки: * – $P < 0,05$ порівняно з контрольною групою тварин, ** – $P < 0,05$ порівняно з попереднім терміном спостереження, n = 45.

Таблиця 2

Склад лейкоцитів ($x \pm SE$) у слизовій оболонці спинки язика щурів у нормі та у різні терміни після початку моделювання ЕСЦД

Термін	Тканинні базофіли	Лімфоцити	Макрофаги	Плазмоцити
Контрольна група	1,31 ± 0,23	0,91 ± 0,15	1,11 ± 0,31	0,42 ± 0,18
2 тижні	1,32 ± 0,18	1,03 ± 0,21	1,12 ± 0,16	0,41 ± 0,21
4 тижні	1,62 ± 0,14	1,25 ± 0,19	1,44 ± 0,16*	0,51 ± 0,03
6 тижнів	2,24 ± 0,16*	1,72 ± 0,04	2,62 ± 0,02*	1,34 ± 0,02*
8 тижнів	1,22 ± 0,02*	0,64 ± 0,01	0,31 ± 0,01**	0,21 ± 0,01**

Примітки: див. табл. 1.

Таблиця 3

Морфометричні показники ($x \pm SE$) елементів гемомікроциркуляторного русла в нормі та у різні терміни після початку моделювання ЕСЦД

Термін	Середній діаметр, мкм				
	артеріола	прекапіляр	капіляр	посткапіляр	венула
Контрольна група	14,80 ± 1,12	9,64 ± 0,82	5,91 ± 0,53	11,33 ± 0,81	17,31 ± 1,25
2 тижні	14,02 ± 0,88*	9,11 ± 0,63	5,46 ± 0,38*	14,51 ± 0,97	19,22 ± 1,44*
4 тижні	13,64 ± 0,76**	8,62 ± 0,52	5,11 ± 0,33**	11,35 ± 0,81	20,17 ± 1,51**
6 тижнів	12,46 ± 0,62	8,04 ± 0,48	4,93 ± 0,23**	11,31 ± 0,81	14,12 ± 1,14*
8 тижнів	11,23 ± 0,54	7,82 ± 0,44	4,02 ± 0,16	11,37 ± 0,81	13,71 ± 1,63**

Примітки: див. табл. 1.

Проте з'являються морфологічні ознаки набряку сполучної тканини, який проявляється лише в глибоких шарах власної пластинки СОЯ. При цьому в її товщі виявляється підвищена кількість клітин лейкоцитарного ряду: на 23,1% збільшується число тканинних базофілів, на 33,3% – лімфоцитів. Приблизно однаковою мірою (в середньому на 26,1%) збільшується кількість макрофагів і плазмоцитів ($P < 0,05$).

Через шість тижнів після початку моделювання ЕСЦД висота сосочків зменшується на 59,3% (табл. 1). У цей термін порівняно з групою інтактних тварин кількість клітинних (базального, остистого та зернистого) шарів епітеліальної пластинки СОЯ зменшується відповідно на 25,0%, 26,4% і 16,0% ($P < 0,05$). При цьому на 50,0% збільшується товщина рогового шару, що проявляється накопиченням значних мас зроговілого епітелію на вершинах сосочків.

У цей термін середній діаметр артеріол і прекапілярів зменшується на 16,4%, гемокапілярів – на 16,9% ($P < 0,05$). Якщо діаметр просвіту венул у перші чотири тижні дослідження збільшується, то починаючи з шостого тижня після початку моделювання ЕСЦД він зменшується на 18,5% (табл. 3). При цьому просвіт судин об'ємної ланки ГМЦР стає нерівномірним: в одних ділянках однієї і тієї самої судини просвіт залишається дещо розширеним, в інших – виявляється запустіння, іноді до повного зникнення просвіту.

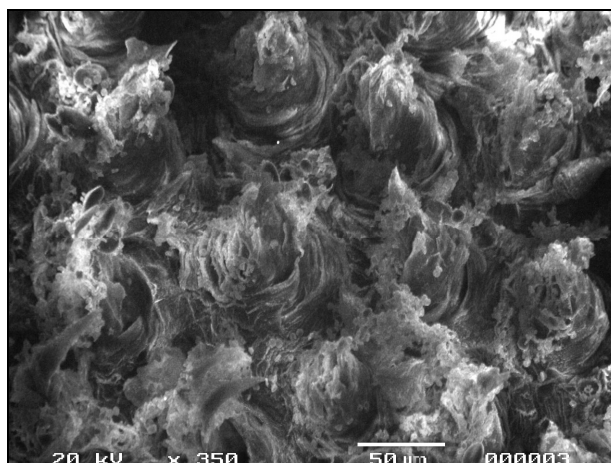


Рис. 7. Відклади кератинових мас на ниткоподібних сосочках слизової оболонки язика через два тижні після початку моделювання експериментального стрептозотозинного цукрового діабету

Через вісім тижнів після початку моделювання ЕСЦД всі вивчені показники епітеліальної пластинки СОЯ значно відріз-

няються від значень групи інтактних тварин (табл. 1). Більше ніж удвічі зменшується висота епітеліальних сосочків ($P < 0,05$). При цьому знижується мітогічна активність базальних клітин, тому базальний шар СОЯ, особливо на верхівках сполучнотканинних сосочків, різко витончений. Це підтверджується даними морфометричного аналізу (табл. 1). На 35,3% зменшується товщина шару остистих клітин. У зернистому шарі кількість клітин зменшується на 20,0%, а кількість клітин рогового шару, навпаки, збільшується в 1,5 рази ($P < 0,05$).

У цей термін визначаються морфологічні ознаки набряку сполучної тканини власної пластинки СОЯ, що проявляється зменшенням оптичної щільності сполучнотканинних сосочків на гістологічних препаратах. Однак сканувальною електронною мікроскопією визначається істотне зменшення висоти епітеліальних сосочків СОЯ, а більшість із них повністю окутані роговими масами (рис. 8), що свідчить про глибоке порушення трофіки СОЯ у цей термін дослідження.

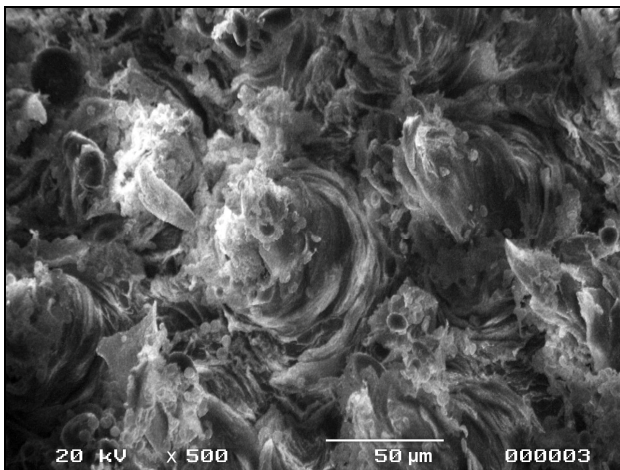


Рис. 8. Будова сосочків слизової оболонки язика щура через вісім тижнів після початку моделювання експериментального стрептозотацинового цукрового діабету

У цей термін кількість усіх вивчених імунокомпетентних клітин вірогідно ($P < 0,05$) зменшується, особливо макрофагів і плазмочитів (табл. 2). На нашу думку, це пов'язано зі склеротичними змінами стінки судин артеріальної ланки ГМЦР і звуженням їх просвіту, що підтверджується морфометричними показниками (див. табл. 3). У базальному та, найбільше, в остистому шарах майже зникають лімфоцити: їх кількість становить тільки 33,3% від початкових значень (табл. 2).

Обговорення

Результати нашого дослідження розкривають нові дані про топографію, розподіл та тривимірну мікроскопічну структуру сосочків дорзальної поверхні СОЯ у щурів. Загальні морфологічні особливості язика щурів показують значну подібність до структури язика інших представників класу гризунів, досліджених і описаних у ранніх публікаціях (Emura et al., 1999, 2000, 2001; Iwasaki, 2002). Проте результати нашого дослідження роблять можливим виділити деякі особливості тривимірної мікроскопічної структури сосочків язика щурів. Для язика щурів характерні риси – наявність чіткої середньої борозни, яка ділить язик на дві половини, і значне звуження тіла язика, яке розташоване за його верхівкою. Середина борозни на верхівці язика – характерна риса, описана у багатьох гризунів, хоча її довжина та ширина мають значну варіабельність (Iwasaki, 2002; Kilinc et al., 2010). При цьому Jackowski et al. (2005, 2014) повідомляє про відсутність такої борозни в морських свинок. Ширина тіла язика у гризунів звичайно однакова або незначно відрізняється, що не можна стверджувати відносно інших частин язика. Морфологія задньої частини тіла язика у щурів визначається наявністю високого валико-

подібного підвищення, що характерно для інших гризунів, а також для жуйних тварин, мавп і японських макак (Iwasaki, 2002; Emura et al., 2001, 2002; Goodarzi et al., 2015).

Результати мікроскопічних спостережень сосочків язика у щурів показали, що ниткоподібні сосочки найчисленніші серед усіх сосочків язика. Зображення у сканувальному електронному мікроскопі свідчать, що тривимірна структура, метричний розподіл та зміна щільності їх розташування вздовж язика дають можливість розділити ниткоподібні сосочки на окремі морфологічні підтипи. Це широко розповсюджені сосочки, які покривають усю поверхню язика за винятком його кореня. Вони разом із піднебінням залучаються до проштовхування їжі у правильному фізіологічному напрямку (Iwasaki, 2002; Kobayashi et al., 2006; Masuko et al., 2007; Kulawik et al., 2015).

Miyawaki et al. (2010) і Abumandour (2014) ниткоподібні сосочки поділяють на власне ниткоподібні та конусоподібні. Однак Toprak et al. (2016) вказує, що такі сосочки характерні для щурів у віці до одного місяця. Тому в дорослих щурів більшість авторів схильні розглядати їх як елементи реактивної перебудови, що виникає внаслідок атрофії ниткоподібних сосочків, ніж як окремий тип мікрорельєфу СОЯ (Goodarzi et al., 2015; Can et al., 2016). Треба звернути увагу також на те, що конусоподібні сосочки ніколи не розташовуються дифузно, вони згруповані, як правило, на тих ділянках СОЯ, на яких звичайно локалізовані ниткоподібні сосочки. Відомо, що топографія сосочків язика має чітку функціональну залежність (Reginato et al., 2014), тому ми схильні вважати, що конусоподібні сосочки – окремий тип сосочків СОЯ в нормі. Тим більше, власна пластинка СОЯ з пухкої сполучної тканини на межі з епітелієм формує сосочки однакової величини та форми, незалежно від ниткоподібного чи конусоподібного типу епітеліальних сосочків, які спостерігаються на поверхні СОЯ.

Характерна риса язика щурів – звичайно сплюснена група ниткоподібних сосочків по середній лінії тіла язика. Їх поверхня частково вкрита лусочками внаслідок процесів кератинізації поверхневих клітин покривного епітелію слизової оболонки язика.

Ще одна особливість – розподіл гігантських конічних і щіткоподібних сосочків на поверхні валикоподібних потовщень тіла язика. Ці результати показують різноманіття ниткоподібних сосочків у зв'язку з процесом кератинізації та узгоджуються зі спостереженнями, проведеними на інших гризунах (Doran, 1995; Emura et al., 1999, 2000; Toprak et al., 2016). Результати досліджень про такий розподіл сосочків язика близькі до даних авторів, які проводили їх вивчення в інших тварин (Benetti et al., 2009; Can et al., 2016). У миші, опосума, кроля та морської свинки поверхня валикоподібних потовщень тіла язика вкрита конічними сосочками (Okada et al., 2005; Kilinc et al., 2010; Kulawik et al., 2015). Присутність щіткоподібних сосочків також знайдена у летючих білок, кроля та kota (Ojima et al., 2000; Emura et al., 2002; Nonaka et al., 2008).

Ми вважаємо, що утворення морфологічних різновидів ниткоподібних сосочків пов'язане з особливостями розвитку язика як органа початкового відділу травного тракту, який першим контактує з різними фізико-хімічними подразниками та відіграє важливу роль у формуванні специфічних умовно-рефлекторних взаємозв'язків з іншими органами в цілому організмі (Iwasaki, 2002; Toprak et al., 2016). У зв'язку з цим окремо хочемо звернути увагу на процеси розвитку та диференціації сосочків СОЯ у гризунів протягом усього онтогенезу. Так, El-Bakry (2009) і Wolczuk (2014) у новонароджених щурів виділяють тільки три види сосочків язика (грибо-, нитко- та конусоподібні), які мають специфічну топографію. Перші два види локалізуються тільки на кінчику язика, а третій – на передній частині тіла язика. При цьому саме ниткоподібні сосочки на перших етапах постнатального онтогенезу дуже дрібні і не мають типової структури. У подальшому їх трансформація набуває найрізноманітніших форм: вони змінюються з низьких призма-

тичних до коротких, а потім високих, конусоподібних чи «дуго-подібних», а в окремих випадках – до невизначеної циліндричної форми. На нашу думку, саме такі зміни у формі ниткоподібних сосочків на різних етапах онтогенезу – причина виявлення різних підвидів цих сосочків. Подібні, але менш виражені конформаційні зміни стосуються також грибо- та конусоподібних сосочків. Беручи до уваги праці Iwasaki (2002) і Torrak et al. (2016), що стосуються досліджень нерівномірного розвитку механо- та хеморецепторного апарату язика, можна їх екстраполювати на дані, отримані нами як закономірне співдружне становлення різних морфологічних утворень, об'єднаних спільною функцією. У даному випадку, для забезпечення оптимальних умов формування та просування харчового клубка у ротовій порожнині.

Наші дані показали, що у щурів існують три види смакових сосочків, які диференціюються на основі виявлення смакових пор. Це численні грибоподібні сосочки у передній частині язика, два валики з листкоподібними сосочками, які розташовуються симетрично на краях задньої частини тіла язика, та один валикоподібний сосочок поблизу кореня язика. Такий тип смакових сосочків спостерігається також у мишей, летючої полівки та монгольської піщанки (Emura, 2002; Iwasaki, 2002). Грибоподібні сосочки у щурів розташовані на верхівці та тілі язика. Акумуляція грибоподібних сосочків на верхівці язика виявляється в японської макаки та нутрії (Emura et al., 2001, 2002; Goodarzi et al., 2015; Torrak, 2016). Порівняння щільності розташування грибоподібних сосочків на верхівці язика у щурів із результатами, одержаними Okada et al. (2005) у різних підвидів піщанок, вказує на їх значну схожість. В інших гризунів розподіл грибоподібних сосочків змінюється. Як повідомляють El-Bakry (2009) і Goodarzi et al. (2015), у морської свинки та летючої білки грибоподібні сосочки локалізуються на верхівці язика, а також на бічних краях тіла язика. Ці сосочки у представників роду сірих полівок рівномірно розподіляються на тілі та корені язика. У щурів, як і в інших гризунів, грибоподібні сосочки мають по одній смаковій порі на їх «шпаци» (Kilinc et al., 2010). Інший вид смакових сосочків у щурів, як і у полівок і мишей, представлений єдиним валикоподібним сосочком, розташованим по серединній лінії язика. Число валикоподібних сосочків, знайдених на корені язика, досить варіабельне у різних гризунів. Як повідомляється в окремих статтях (Emura et al., 1999; 2001), у нутрії є два овальні валикоподібні сосочки на корені язика, тоді як у летючої білки їх три. У морської свинки валикоподібні сосочки відсутні, на їх місці розташовані грибоподібні сосочки (Iwasaki, 2002).

Третій вид смакових сосочків язика щурів – листкоподібні сосочки, розташовані уздовж латерального краю тіла язика. Вони складаються у вигляді 4–5 валиків, відокремлених глибокими жолобками. Як розташування, так і структура цих сосочків щурів подібні до таких у сірих полівок, нутрії та мишей. Число валиків у деяких різновидів гризунів може бути ще більшим. Як повідомляє Emura et al. (2001), у летючої білки кожен листкоподібний сосочок складається більше ніж із 34 валиків.

Про затримання десквамації рогового шару з поверхні епітелію в різні терміни від початку моделювання ЕСЦД свідчать морфометричні дані про зменшення клітин глибше розташованих шарів та збільшення поверхневих клітин. Цей процес особливо активізується за ішемії та є проявом тканинної гіпоксії (O'Reilly and Long, 2008).

Підтвердження цього – результати дослідження ГМЦР СОЯ, які вказують на зменшення середнього діаметра мікросудин приносної та обмінної ланки, тоді як просвіт об'ємної ланки вірогідно ($P < 0,05$) збільшується, чим визначаються явища повнокрів'я. Такий процес можливий за умов відкриття артеріоло-венулярних анастомозів, кількість яких збільшується пропорційно до терміну експерименту та вказує на підвищений скид артеріальної крові у венозне русло поза капілярами, що посилює явища ішемії та гіпоксії СОЯ.

Установлені нами зміни просвіту венозної ланки ГМЦР із розширеного на звужений стан у термін 6 тижнів із початку

моделювання ЕСЦД супроводжуються нерівномірністю просвіту судин об'ємної ланки ГМЦР із ділянками запуснення та повного зникнення просвіту. Такі явища, на думку окремих дослідників (Umura et al., 2009), обов'язково супроводжуються підвищенням проникності судинної стінки, що пояснює гематогенне походження імунокомпетентних клітин, які у підвищеній кількості виявляються в СОЯ. Таке явище – стартовий механізм для розвитку асептичного запалення в СОЯ.

Для встановлення характеристик, які забезпечують захисну функцію слизової оболонки порожнини рота у складі епітеліальної пластинки, прийнято досліджувати кількість клітин Лангерганса, макрофагів, лімфоцитів та інших клітин лейкоцитарного ряду (O'Reilly and Long, 2008). Про їх походження в СОЯ донині в літературі немає спільної думки. Одні автори вважають їх винятково власною топографічною особливістю СОЯ (Iwasaki, 2002; Mistretta and Liu, 2006). Інші дослідники вказують на їх гематогенне походження (Doran, 1995; Scardina and Messina, 2006). Треті дотримуються комплексної теорії морфологічного забезпечення місцевої резистентності СОЯ (O'Reilly and Long, 2008; Meo, 2009).

Ми встановили, що у власній пластинці СОЯ інтактних щурів система імунного захисту представлена макрофагами, тканинними базофілами, лімфоцитами та плазматичними клітинами.

Висновки

Виявлено п'ять підтипів ниткоподібних сосочків язика у щурів (справжні ниткоподібні, сплюснені, конусоподібні, великі конічні («гігантські») та розщеплені на верхівці («щіткоподібні»), кожен з яких має власні характеристики.

За експериментального стрептозототинового цукрового діабету виникають зміни в усіх структурних компонентах слизової оболонки дорзальної поверхні язика. Реакція епітеліальної пластинки проявляється зниженням проліферативних процесів у глибоких шарах епітелію, підвищенням зроговіння поверхневого шару та затриманням зроговілих мас на поверхні епітеліальних сосочків.

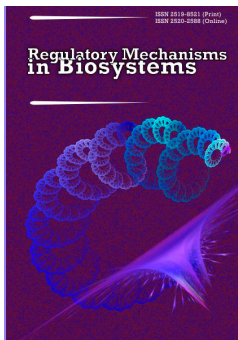
У ранні терміни у власній пластинці слизової оболонки дорзальної поверхні язика спостерігаються реактивні зміни, що проявляються збільшенням кількості клітин лейкоцитарного ряду та набряком міжклітинної речовини. В мікрогемосудинах виявляється різке звуження артеріальної ланки ГМЦР протягом усього терміну спостереження. В ранні терміни дослідження (до двох тижнів) відбувається розширення ємнісної ланки ГМЦР, яке у подальшому (на четвертий – восьмий тижні) змінюється зменшенням і запусненням просвіту більшості венул СОЯ.

У пізні терміни (шостий – восьмий тижні після початку моделювання експериментального стрептозототинового цукрового діабету) зменшується кількість імунокомпетентних клітин – морфологічного субстрату порушення місцевої резистентності СОЯ.

References

- Abdel-Reheim, E. S., Abd-Elmoneim A. A., & Hosni, A. A. (2014). Fatty-sucrosed diet/minimal dose of streptozotocin-treated rat: A novel model of gestational diabetes mellitus, metabolic and inflammatory insight. *Journal of Diabetes and Metabolism*, 5(9), 430–435.
- Abumandour, M. M. A. (2014). Morphological comparison of the filiform papillae of New Zealand white rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) as domestic mammals and Egyptian fruit bat (*Rousettus aegyptiacus*) as wild mammals using scanning electron microscopic specimens. *International Journal of Morphology*, 32, 1407–1417.
- Benetti, E. J., Picoli, L. C., Guimarães, J. P., Motoyama, A. A., Miglino, M. A., & Watanabe, L.-S. (2009). Characteristics of filiform, fungiform and vallate papillae and surface of interface epithelium-connective tissue of the maned sloth tongue mucosa (*Bradypus torquatus*, Illiger, 1811): Light and scanning electron microscopy study. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 38, 42–48.
- Can, M., Atalgın, H., Ates, S., & Takci, L. (2016). Scanning electron microscopic study on the structure of the lingual papillae of the Karacabey Merino sheep. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences*, 32, 130–130.

- Ding, Y., Yu, S., & Shao, B. (2016). Anatomical and histological characteristic of the tongue and tongue mucosa linguae in the cattle-yak (*Bos taurus* × *Bos grunniens*). *Frontiers in Biology*, 11(2), 141–148.
- Doran, G. A. (1995). Review of the evolution and phylogeny of the mammalian tongue. *Acta Anatomica*, 91, 118–129.
- El-Bakry, A. M. (2009). Study by transmission and scanning electron microscopy of the morphogenesis of three types of lingual papillae in the albino rat (*Rattus rattus*). *Zoologica (Stockholm)*, 91, 267–278.
- Emura, S. A., Tamada, D., & Hayakawa, D. (1999). SEM study on the dorsal lingual surface of *Microtus montebelli*. *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, 76, 171–177.
- Emura, S., Hayakawa, D., Chen, H., & Shoumura, S. (2002). Morphology of the dorsal lingual papillae in the Japanese macaque and Savanna monkey. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 31, 313–316.
- Emura, S., Tamada, A., & Hayakawa, D. (2000). Morphology of the dorsal lingual papillae in the black rhinoceros (*Diceros bicornis*). *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 29, 371–374.
- Emura, S., Tamada, A., & Hayakawa, D. (2001). SEM study on the dorsal lingual surface of the nutria *Myocastor coypus*. *Acta Anatomica Nipponica*, 76, 233–238.
- Emura, S., Tamada, A., & Hayakawa, D. (2002). SEM Study on the dorsal lingual surface of the large flying fox, *Pteropus vampyrus*. *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, 79(4), 113–119.
- Goodarzi, N., & Hoseini, T. S. (2015). Fine structure of lingual papillae in the markhoz goat (Iranian angora): A scanning electron microscopic study. *International Journal of Zoological Research*, 11, 160–168.
- Gouri, A., Dekaken, A., Rouabhia, S., Bentorki, A. A., & Yakhlef, A. (2013). Transaminases profile in Algerian patients with type 2 diabetes mellitus. *Immuno-Analyse and Biologie Spéciale*, 28(1), 25–29.
- Iwasaki, S. (2002). Evolution of the structure and function of the vertebrate tongue. *Journal of Anatomy*, 201, 1–13.
- Jackowiak, H., & Godynicki, S. (2005). Light and scanning electron microscopic study of the tongue in the cow. *Annals of Anatomy*, 187, 251–259.
- Jackowiak, H., & Godynicki, S. (2005). The distribution and structure of the lingual papillae on the tongue of the bank vole *Clethrionomys glareolus*. *Folia Morphologica*, 64(4), 326–333.
- Jackowiak, H., Skiersz-Szewczyk, K., Kwieciński, Z., Godynicki, S., Jackowiak, K., & Leszczyszyn, A. (2014). Light microscopy and scanning electron microscopy studies on the reduction of the tongue microstructures in the white stork (*Ciconia ciconia*, Aves). *Acta Zoologica*, 96, 436–441.
- Kilinc, M., Erdogan, S., Ketani, S., & Ketani, M. A. (2010). Morphological study by scanning electron microscopy of the lingual papillae in the Middle East blind mole rat. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 39, 509–515.
- Kulawik, M., Godynicki, S., & Frąckowiak, H. (2015). Light and scanning electron microscopic study of the filiform papillae of the tongue in adult rabbit (*Oryctolagus cuniculus* f. *domestica*, Linnaeus 1758). *Nauka Przyroda Technologie*, 9, 1–12.
- Kurtul, I., & Atalgin, S. H. (2008). Scanning electron microscopic study on the structure of the lingual papillae of the Saanen goat. *Small Ruminant Research*, 80, 52–56.
- Meo, S. A. (2009). Diabetes mellitus: Health and wealth threat. *International Journal of Diabetes Mellitus*, 1(1), 42.
- Mistretta, C. M., & Liu, H.-X. (2006). Development of fungiform papillae: Patterned lingual gustatory organs. *Archives of Histology and Cytology*, 69(4), 199–208.
- Miyawaki, Y., Yoshimura, K., Shindo, J., & Kageyama, I. (2010). Light and scanning electron microscopic study on the tongue and lingual papillae of the common raccoon, *Procyon lotor*. *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, 87, 65–73.
- Nonaka, K., Zheng, J. H., & Kobayashi, K. (2008). Comparative morphological study on the lingual papillae and their connective tissue cores in rabbits. *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, 85, 57–66.
- O'Reilly, D., & Long, R. G. (2008). Diabetes and the gastro-intestinal tract. *Digestive Diseases*, 5(1), 57–64.
- Ojima, K., Mitsuhashi, F., Nasu, M., & Suzuki, Y. (2000). Angioarchitectural form, functional distributive pattern and classification of the filiform papillae on the crossbred Japanese cat tongue anterodorsal surface in scanning electron microscopic specimens. *Annals of Anatomy – Anatomischer Anzeiger*, 182, 47–52.
- Okada, S., & Schraufnagel, D. E. (2005). Scanning electron microscopic structure of the lingual papillae of the common opossum (*Didelphis marsupialis*). *Microscopy and Microanalysis*, 11, 319–332.
- Reginato, G. de S., Bolina, C. de S., Watanabe, L., & Ciena, A. P. (2014). Three-dimensional aspects of the lingual papillae and their connective tissue cores in the tongue of rats: A scanning electron microscope study. *The Scientific World Journal*, 2014, 1–6.
- Rezki, A., Merioud, B., Delmas, D., Cyril, C., Scheiwiller, R., Leblé, R., & Valensi, P. (2016). Sequential compression/decompression by a pulsating suit increases cutaneous microcirculatory blood flow in patients with type 2 diabetes. *Diabetes and Metabolism*, 42(4), 298.
- Rukavina, M. (2016). Typ-1-diabetes – Verhältnis proinsulin/C-peptid mit pathogenese assoziiert. *Diabetologie und Stoffwechsel*, 11(6), 384–396.
- Scardina, G. A., & Messina, P. (2006). Microvascular characteristics of the human filiform papillae: A videocapillaroscopic study. *Anatomy – Anatomischer Anzeiger*, 188, 183–186.
- Toprak, B., & Yilmaz, S. (2016). Light and scanning electron microscopic investigation of postnatal development of vallate papillae in the white laboratory mice. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 11, 131–137.
- Uemura, M., Tamada, Y., & Suwa, F. (2009). Morphological study of the connective tissue papillae and the capillary loops on the lingual dorsum in the type 2 diabetes mellitus model rats. *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, 85(4), 139–149.
- Westfall, S., Lomis, N., Singh, S. P., Dai, S. Y., & Prakash, S. (2015). The gut microflora and its metabolites regulate the molecular crosstalk between diabetes and neurodegeneration. *Journal of Diabetes and Metabolism*, 6(8), 577–580.
- Wolczuk, K. (2014). Dorsal surface of the tongue of the hazel dormouse *Muscardinus avellanarius*: Scanning electron and light microscopic studies. *Zoologica Poloniae*, 59, 35–47.



In vitro* effects of some metal ions on glutathione reductase in the gills and liver of *Capoeta trutta

M. Kirici*, M. Atamanalp**, M. Kirici*, Ş. Beydemir***

*Bingöl University, Bingöl, Turkey

**Atatürk University, Erzurum, Turkey

***Anadolu University, Eskişehir, Turkey

Article info

Received 08.01.2017

Received in revised form

11.02.2017

Accepted 15.02.2017

Bingöl University,

Recep Tayyip Erdoğan, Aydınlik

Cad. No: 1, 12000, Bingöl

Merkez/Bingöl, Turkey

Tel. +90-536-891-71-50

Fax: +90-426-216-00-29

E-mail:

muammerkirici@hotmail.com

Atatürk University, Atatürk,

25030 Yakutiye/Erzurum, Turkey

Anadolu University, Yeşiltepe,

Anadolu Ünv., 26470

Tepebaşı/Eskişehir, Turkey

Kirici, M., Atamanalp, M., Kirici, M., & Beydemir, Ş. (2017). *In vitro* effects of some metal ions on glutathione reductase in the gills and liver of *Capoeta trutta*. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8(1), 66–70. doi: 10.15421/021712

Many aquatic environmental problems have arisen in consequence of contamination of water by toxic metals and organic pollutants in the present age of technology. Metals play vital roles in enzyme activities and other metabolic events due to their bioaccumulative and nonbiodegradable properties among aquatic pollutants. The aim of this study was to evaluate the inhibitory effects of some metal ions (Ag^+ , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} and Zn^{2+}) on *Capoeta trutta* gill and liver glutathione reductase (EC: 1.8.1.7; GR). For this purpose, initially, GR was purified from *C. trutta* gill and liver. Purification procedure consisted of three steps; preparation of hemolysate, ammonium sulphate precipitation and 2', 5'-ADP Sepharose 4B affinity chromatography. Using this procedure, *C. trutta* gill GR, having the specific activity of 19.111 EU/mg proteins, was purified with a yield of 38.8% and 910.05-fold; *C. trutta* liver GR, having the specific activity of 16.167 EU/mg proteins, was purified with a yield of 21.1% and 734.86-fold. The purity of the enzymes was checked on sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and each purified enzyme showed a single band on the gel. In addition, inhibitory effects of some metal ions (Ag^+ , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} and Zn^{2+}) on GR from gill and liver were investigated *in vitro*. K_i constants and IC_{50} values for metal ions which showed inhibition effects were determined by Lineweaver-Burk graphs and plotting activity % vs. [I]. In conclusion, IC_{50} values for fish gill GR were 0.000625, 0.153, 0.220, 0.247 and 0.216 mM and K_i constants for fish gill GR were 0.00045 ± 0.00008 , 0.128 ± 0.036 , 0.182 ± 0.138 , 0.482 ± 0.219 and 0.112 ± 0.047 mM for Ag^+ , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} and Zn^{2+} , respectively. IC_{50} values for fish liver GR were 0.000437, 0.217, 0.185, 0.355 and 0.349 mM and K_i constants for fish liver GR were 0.00025 ± 0.00013 , 0.532 ± 0.146 , 0.123 ± 0.066 , 0.093 ± 0.020 and 0.151 ± 0.084 mM for Ag^+ , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} and Zn^{2+} , respectively. *In vitro* inhibition rank order was determined as $\text{Ag}^+ > \text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$ for fish gill GR; $\text{Ag}^+ > \text{Cu}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Ni}^{2+}$ for fish liver GR. From these results, we showed that Ag^+ metal ion is the most potent inhibitor of GR enzyme on gill and liver tissues.

Keywords: *Capoeta trutta*; glutathione reductase; liver; gill; metal toxicity

Introduction

Glutathione reductase (Glutathione: NADP^+ oxidoreductase, E.C.1.8.1.7; GR), a key enzyme in glutathione metabolism, is a member of the pyridine-nucleotide disulfide oxidoreductase family of flavoenzymes (Kondo et al., 1980). This flavin enzyme is essential for reduction of glutathione disulfide (GSSG) to the reduced form (GSH), necessary for protection of cells against oxidative stress as an antioxidant (Cooper and Kristal, 1997). GSH has an important role in the synthesis and degradation of proteins, regulation of enzymes, formation of the deoxyribonucleotid precursors of DNA, and protection of cells against free radicals and reactive oxygen species such as H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot -}$ and $\cdot\text{OH}$ (Gul et al., 2000; Isik et al., 2015). Decreased GSH levels have been reported in several diseases, such as acquired immune deficiency syndrome (AIDS) (Akerlund et al., 1997), adult respiratory distress syndrome (Pacht et al., 1991), Parkinson's disease (Jenner and Olanow, 1998), and diabetes (Yoshida et al., 1995). In addition, recent results suggest that GSH is essential for cell proliferation (Poot et al., 1995), and plays a role in the regulation of apoptosis (Van den Dobbelen et al., 1996).

Metals are natural trace components of the aquatic environment, but their levels have increased due to industrial, agricultural and mining activities. All metals are potentially harmful to aquatic organisms at a certain level of exposure and absorption (Kalay and Canli, 2000). This situation may be hazardous for living systems, especially aquatic living systems, including specific enzymes. It is well-known that enzymes catalyze almost all chemical reactions in the metabolisms of living systems. These chemical substances, including pollutants, pesticides, drugs and metal ions, influence metabolisms at low concentrations by decreasing or increasing enzyme activities (Ekinci et al., 2007). Fish are widely used to evaluate the health of aquatic ecosystems because pollutants build up in the food chain. Because of this, in recent years numerous metal toxicity studies have been performed on fish by many scientists worldwide (Kalyoncu et al., 2011; Yi and Zhang, 2012; Yousafzai et al., 2012; Squadrona et al., 2013). There is no report available on the purification of GR enzyme from the gills and liver of *C. trutta*. Therefore, the aim of this study was to purify GR enzyme, the metabolic importance of which has long been acknowledged, from the gills and liver of *C. trutta* and to examine the *in vitro* effects of certain metals upon enzyme activity.

Materials and methods

Chemicals. NADPH, GSSG, protein assay reagents and chemicals for electrophoresis were obtained from Sigma Aldrich Chem. Comp. 2',5'-ADP Sepharose-4B was obtained from Pharmacia. AgNO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, ZnCl_2 and all other chemicals used were analytical grade and obtained from either Sigma-Aldrich or Merck.

Preparation of the hemolysate. Fish samples ($n = 10$; 190 ± 20 g) were caught from Murat River (Bingöl, Turkey). The fish were decapitated and their gills and livers were extracted. 8 g gill and liver samples were washed three times with 0.9% sodium chloride solution. Then, using a scalpel, the gill and liver samples were cut into small pieces. These pieces were homogenized with the aid of liquid nitrogen and suspended in a 50 mM KH_2PO_4 (pH 7.4) buffer that includes 1 mM PMSF, 1 mM EDTA and 1 mM DTT. The suspension was primarily centrifuged at 13,500 rpm for 2 h, and the precipitate was thrown away. Supernatant was used in further studies (Le Trang et al., 1983).

Enzyme assay. GR activity was measured spectrophotometrically at 25 °C by the modified method of Carlberg and Mannervik (Carlberg and Mannervik, 1975). The assay system contained 50 mM Tris-HCl buffer pH 8.0, containing 1 mM EDTA, 1 mM GSSG and 0.1 mM NADPH. One enzyme unit was defined as the amount that oxidizes 1 μmol NADPH per min under the assay conditions.

Ammonium sulfate fractionation and dialysis. The hemolysate was subjected to precipitation with ammonium sulfate (liver: between 30% and 70%; gill: between 20% and 70%). Enzyme activity was determined both in the supernatant and in the precipitate for each respective precipitation. The precipitate was dissolved in phosphate buffer (50 mM, pH 7.0). The resultant solution was clear, and contained partially purified enzyme. This solution was dialyzed at 4 °C in 1 mM EDTA + 10 mM K-phosphate buffer (pH 7.5) for 2 h with two changes of buffer (Akkemik et al., 2011). Partially purified enzyme solution was kept at 4 °C.

2', 5'-ADP sepharose 4B affinity chromatography. 2 g of dry 2',5'-ADP Sepharose 4B was used for a column (1×10 cm) of 10 mL bed volume. The gel was washed with 300 mL of distilled water to remove foreign bodies and air, suspended in 0.1 M K-acetate + 0.1 M K-phosphate buffer (pH 6.0), and packed in the column. After settling of the gel, the column was equilibrated with 50 mM K-phosphate buffer including 1 mM EDTA pH 6.0 with a peristaltic pump. The flow rates for washing and to equilibration were adjusted 20 mL/h. The previously obtained dialyzed sample was loaded onto the 2',5'-ADP Sepharose 4B affinity column and the column was washed with 25 mL of 0.1 M K-acetate + 0.1 M K-phosphate, pH 6.0 and 25 mL of 0.1 M K-acetate + 0.1 M K-phosphate, pH 7.85. Washing was continued with 50 mM K-phosphate buffer including 1 mM EDTA, pH 7.5, until the final difference in the absorbance reached 0.05 at 280 nm. The enzyme was eluted with a gradient mixture of 0 to 0.5 mM GSH + 1 mM NADPH in 50 mM K-phosphate, containing 1 mM EDTA (pH 7.5). Active fractions were collected and dialyzed with equilibration buffer. All procedures were performed at 4 °C (Le Trang et al., 1983).

Protein determination. Protein concentration was determined at 595 nm according to the method of Bradford (Bradford, 1976), using bovine serum albumin as a standard.

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). To determine the enzyme's purity, SDS-PAGE was performed according to Laemmli's method (Laemmli, 1970). The acrylamide concentration of the stacking and separating gels was 3% and 8%, respectively, and 1% SDS was also added to the gel solution. The gel was stained for 2 h in 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250 containing 50% methanol, 10% acetic acid and 40% distilled water. Then the gel was washed with many changes of the same solvent without dye. The cleared protein bands were photographed (Fig. 1).

In vitro effects of metal ions. In order to determine the effects of the metal ions on fish liver and gill GR, different concentrations of metal ions were added to the reaction medium. The enzyme

activity was measured and an experiment in the absence of inhibitor was used as control (100% activity). The IC_{50} values were obtained from activity (%) vs. metal ion concentration plots. In order to determine K_i constants in the media with inhibitor, the substrate (GSSG) concentrations were 0.3, 0.8, 1.4, 2.0 and 3.0 mM. Inhibitor solutions (metal salts) were added to the reaction medium, resulting in 3 different fixed concentrations of inhibitors in 1 mL of total reaction volume. Lineweaver-Burk graphs were drawn by using $1/V$ vs. $1/[S]$ values and K_i constant were calculated from these graphs. Regression analysis graphs were drawn for IC_{50} using inhibition % values by a statistical package (SPSS-for Windows; version 17.0) on a computer (Student t-test; $n = 3$).

Results

In this study, *C. trutta* gill and liver GR enzyme were first isolated. Purification procedure was carried out by the preparation of hemolysate, ammonium sulfate precipitation and 2',5'-ADP Sepharose 4B affinity chromatography. As a result of the three consecutive steps, *C. trutta* gill GR, having the specific activity of 19.111 EU/mg proteins, was purified with a yield of 38.8% and 910.05-fold (Table 1); *C. trutta* liver GR, having the specific activity of 16.167 EU/mg proteins, was purified with a yield of 21.07% and 734.86-fold (Table 2). Purity of the enzyme was determined by SDS-PAGE and showed a single band on the gel (Fig. 1). Fig. 1 exhibits the results of SDS-PAGE which was performed for determination of the purity and molecular weight of the enzyme. Rf values were calculated for both standard proteins and GR; Rf-Log MW graph was obtained according to Laemmli's (Laemmli, 1970) procedure, and the molecular mass of *C. trutta* gill and liver GR was nearly 50 and 55 kDa.

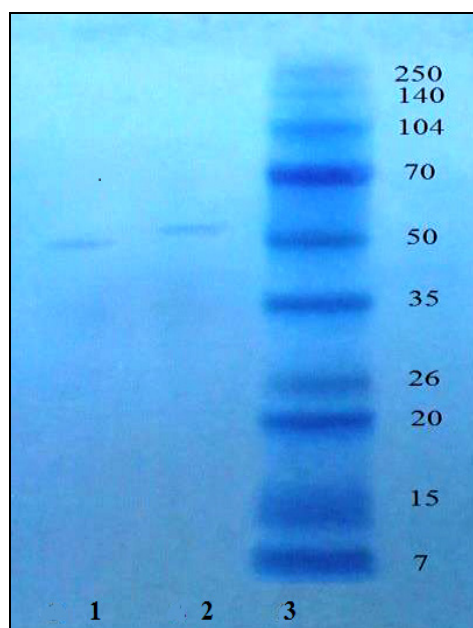


Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified GR: Lane 1: *C. trutta* gill GR; Lane 2: *C. trutta* liver GR; Lane 3: standard proteins

In this study we investigated the *in vitro* effects of Ag^+ , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} and Zn^{2+} on fish gill and liver GR activity. As shown in Table 3, IC_{50} values for fish gill GR were 0.000625, 0.153, 0.220, 0.247 and 0.216 mM and K_i constants for fish gill GR were 0.00045 ± 0.00008 , 0.128 ± 0.036 , 0.182 ± 0.138 , 0.482 ± 0.219 and 0.112 ± 0.047 mM for Ag^+ , Co^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} and Zn^{2+} , respectively (Fig. 2). As shown in Table 4, IC_{50} values for fish liver GR were 0.000437, 0.217, 0.185, 0.355 and 0.349 mM and K_i constants for fish liver GR were 0.00025 ± 0.00013 , 0.532 ± 0.146 , 0.123 ± 0.066 , 0.093 ± 0.020 and 0.151 ± 0.084 mM for Ag^+ , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} and Pb^{2+} , respectively (Fig. 3). It is clear that Ag^+ is the most potent inhibitor for *C. trutta* gill and liver GR enzymes.

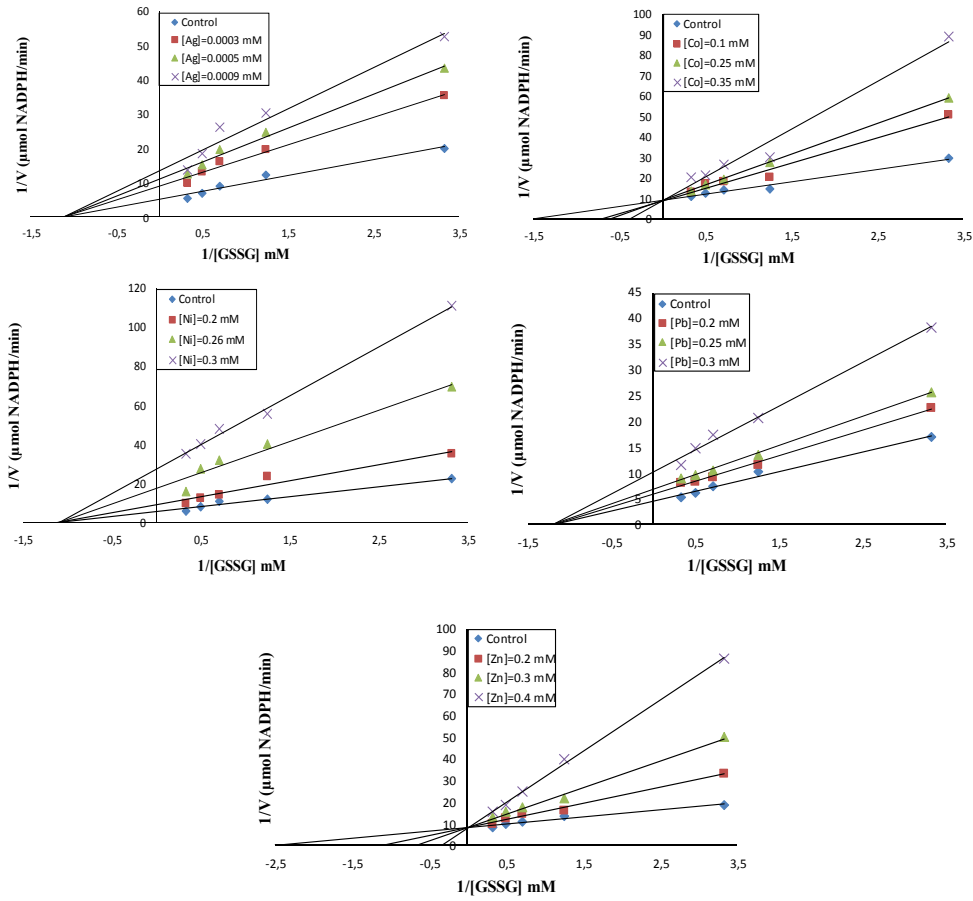


Fig. 2. Activity%-[Metal] regression analysis graphs for *C. trutta* gill GR in the presence of three different metal concentrations

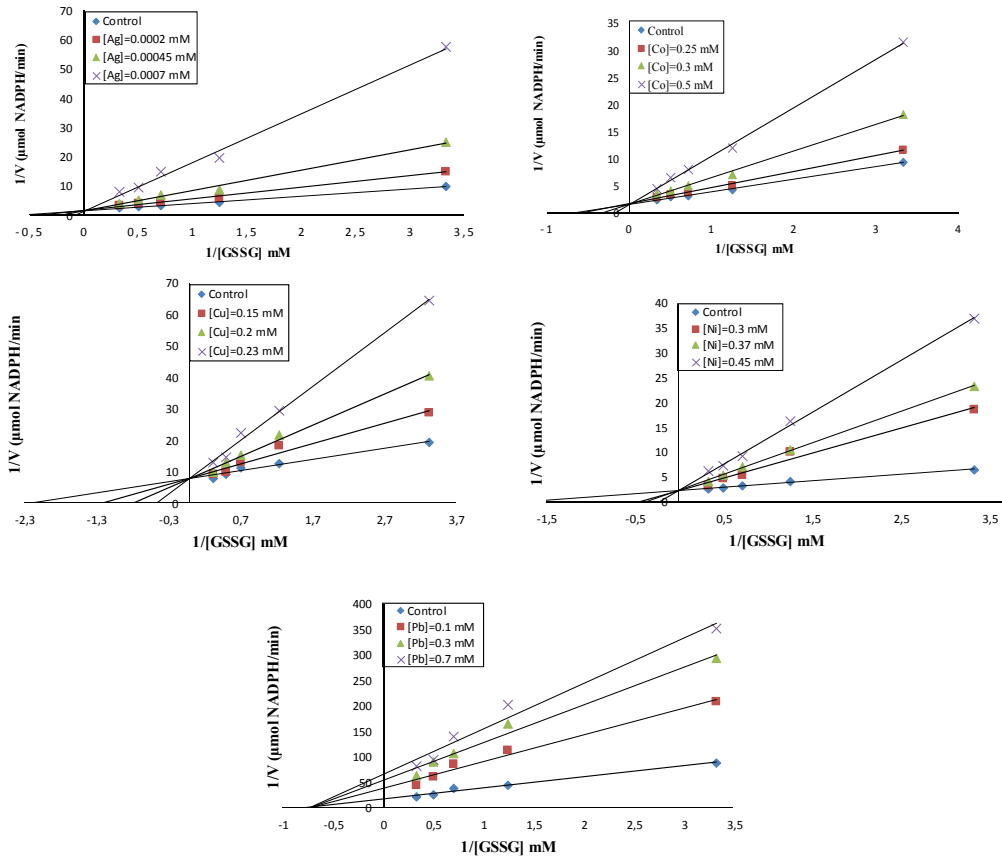


Fig. 3. Activity%-[Metal] regression analysis graphs for *C. trutta* liver GR in the presence of three different metal concentrations

Table 1Purification scheme of GR from *C. trutta* gill

Purification step	Activity, U/mL	Protein, mg/mL	Total volume, ml	Total activity, U	Total protein, mg	Specific activity, U/mg	Purification factor	Yield, %
Hemolysate	0.197	9.250	27.0	5.319	249.750	0.021	1.00	100.00
Ammonium sulfate precipitation (20–70%)	0.329	5.730	6.5	2.139	37.245	0.057	2.73	40.21
2', 5'-ADP Sepharose 4B affinity chromatography	0.516	0.027	4.0	2.064	0.108	19.111	910.05	38.80

Table 2Purification scheme of GR from *C. trutta* liver

Purification step	Activity, U/mL	Protein, mg/mL	Total volume, ml	Total activity, U	Total protein, mg	Specific activity, U/mg	Purification factor	Yield, %
Hemolysate	0.317	14.250	30.5	9.669	434.630	0.022	1.00	100.00
Ammonium sulfate precipitation (30–70%)	0.423	9.730	8.5	3.595	82.705	0.043	1.95	37.18
2', 5'-ADP Sepharose 4B affinity chromatography	0.679	0.042	3.0	2.037	0.126	16.167	734.86	21.07

Table 3K_i and IC₅₀ values obtained from regression analysis graphs for fish gill GR in the presence of different metal ion concentrations

Metal ions	IC ₅₀ , mM	K _i , mM	Inhibition type
Ag ⁺	0.000625	0.00045 ± 0.00008	non-competitive
Co ²⁺	0.153	0.128 ± 0.036	competitive
Ni ²⁺	0.220	0.182 ± 0.138	non-competitive
Pb ²⁺	0.247	0.482 ± 0.219	non-competitive
Zn ²⁺	0.216	0.112 ± 0.047	competitive

Table 4K_i and IC₅₀ values obtained from regression analysis graphs for fish liver GR in the presence of different metal ion concentrations

Metal ions	IC ₅₀ , mM	K _i , mM	Inhibition type
Ag ⁺	0.000437	0.00025 ± 0.00013	competitive
Co ²⁺	0.217	0.532 ± 0.146	competitive
Cu ²⁺	0.185	0.123 ± 0.066	competitive
Ni ²⁺	0.355	0.093 ± 0.020	competitive
Pb ²⁺	0.349	0.151 ± 0.084	non-competitive

Discussion

In the developing world, heavy metal pollution is a significant environmental problem. Almost all living things are affected negatively by toxic substances, including heavy metals (Raspanti et al., 2009). In general, heavy metals produce their toxicity by forming complexes with organic compounds. For example metal complexes of sulfur, oxygen and nitrogen are the most common groups. If the metals are bound to these groups, they may become inactive enzyme forms because, metals bond with SH groups of the cysteine residues and thus, mercaptans are formed. Enzymes are the bio-catalysts in nature which regulate the rate and direction of biochemical reactions. Inhibition of enzyme activities by toxic compounds such as metal, drugs, pesticides and gases may cause a hazardous situation for living organisms. Therefore, the number of toxicology studies on the effects of metals on enzyme activities have increased in recent years (Alim et al., 2014). Fish as the most important aquatic food source are indicator organisms for heavy metal pollution of their environment and as such they are a potential risk for human consumption (Farkas et al., 2001).

For this reason, we investigated the effects of Ag⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Pb²⁺ and Zn²⁺ on gill and liver GR enzyme activity of the fish species *C. trutta*. GR was purified from *C. trutta* gill and liver by using preparation of hemolysate, ammonium sulfate precipitation and 2',5'-ADP Sepharose 4B affinity chromatography. GR has been purified from many different sources (Calberg and Mannervik, 1981; Le Trang et al., 1983; Akkemik et al., 2011; Taser and Ciftci, 2012; Yadav et al., 2013) using various purification procedures. All reported purification procedures involve several chromatographic steps, such as, DEAE-Sephadex, Sephadex G-100, hydroxyapatite (Calberg and Mannervik, 1981), 2',5'-ADP Sepharose 4B (Madamanchi et al., 1992), Sephadex G-75, CM-Cellulose, Sephacryl S-200 (Calberg et al., 1981), Reactive Red-120-Agarose,

Sephacryl S-300 (Garcia-Alfonso et al., 1993), fast protein liquid chromatography (FPLC)-anion Exchange and FPLC-hydrophobic interaction chromatography (Madamanchi et al., 1992).

Figure 1 exhibits the results of SDS-PAGE which was performed for determination of the purity and molecular weight of the enzyme. The molecular mass of *C. trutta* gill and liver GR was nearly 50 and 55 kDa. GRs of different origins have similar molecular masses as follows; rat liver GR is 60 kDa (Calberg and Mannervik, 1975), bovine brain GR is 55 kDa (Gutterer et al., 1999), turtle liver GR is 55 kDa (Willmore and Storey, 2007), rainbow trout liver GR is 53 kDa (Tekman et al., 2008), turkey liver GR is 65 kDa (Taser and Ciftci, 2012).

Recently, many studies have been conducted on the relationship between metals and toxicity. Fresh water and marine fish are affected by metal contamination. It is reported that metal toxicity causes irregular metallothionein protein synthesis, renal damage and disruption of bone structure in humans and wildlife (Sato and Kondoh, 2002; Lavery et al., 2009). Due to the fact that metals cause leakage of phosphates, calcium, glycogen and proteins (proteinuria) from the kidney, renal damage can be fatal in mammals (Lavery et al., 2009). Indeed, some metals are known to be extremely toxic to mammals, fish, and other fauna and flora. For instance, mercury is a toxic element which causes environmental problems. Some metals can be found in the form of the free metal ion such as Cd²⁺ (Hisar et al., 2009). Due to the important above-mentioned approaches in this subject, in the present study we investigated the *in vitro* effects of Ag⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Pb²⁺ and Zn²⁺ on fish gill and liver GR activity. K_i and IC₅₀ parameters of these metals were determined (Table 3 and 4).

Metals ions inhibited enzyme activity at low concentrations. K_i constants and IC₅₀ values are the most suitable parameters for seeing inhibitory effects. As shown in Table 3, IC₅₀ values for fish gill GR were 0.000625, 0.153, 0.220, 0.247 and 0.216 mM and K_i constants for fish gill GR were 0.00045 ± 0.00008, 0.128 ± 0.036, 0.182 ± 0.138, 0.482 ± 0.219 and 0.112 ± 0.047 mM for Ag⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Pb²⁺ and Zn²⁺, respectively (Fig. 2). As shown in Table 4, IC₅₀ values for fish liver GR were 0.000437, 0.217, 0.185, 0.355 and 0.349 mM and K_i constants for fish liver GR were 0.00025 ± 0.00013, 0.532 ± 0.146, 0.123 ± 0.066, 0.093 ± 0.020 and 0.151 ± 0.084 mM for Ag⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺ and Pb²⁺, respectively (Fig. 3). It is clear that Ag⁺ is the most potent inhibitor for *C. trutta* gill and liver GR enzymes.

Our results agree well with other reports in the literature. For example, Alim et al. (2014) examined the effects of some metal ions (Ag⁺, Cu²⁺, Pb²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺ and Co²⁺) on the carbonic anhydrase activity of Tuna gill. Their results showed that all metal ions inhibited the enzyme and that Ag⁺ is the most potent inhibitor of carbonic anhydrase enzyme. In another study, Kaya et al. (2013) examined the effects of Ag⁺, Ni²⁺, Cd²⁺ and Cu²⁺ on the carbonic anhydrase of gilthead sea bream liver. Their result showed that Ag⁺ had the highest inhibition rate. The inhibition order of the metals was Ag⁺ > Ni²⁺ > Cd²⁺ > Cu²⁺. These results confirm our present study. Additionally, in a different study Soyut et al. (2008) investigated the effects of Ag⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺ and Co²⁺ on the carbonic anhydrase activity of rainbow trout brain

in vitro. They found that *in vitro* inhibition rank order was determined as $\text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ag}^+$. In another study, Akkemik et al. (2012) investigated the effects of Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} and Hg^{2+} on turkey liver glutathione S-transferase activity. *In vitro* studies showed that the enzyme activity was inhibited by Ag^+ , Cu^{2+} and Hg^{2+} . They found that *in vitro* inhibition rank order was determined as $\text{Cu}^{2+} > \text{Hg}^{2+} > \text{Ag}^+$.

Conclusion

Today, metal pollution levels are increasing in the aquatic environment. This is a highly significant risk factor for all living organisms including fish and humans. Fish in fresh water and the sea have been consumed by man as an important food source until now and will continue to be consumed in the future. Fish provide one of the most valuable food sources in terms of protein and omega-3 fatty acid for humans. In this study, we purified GR from *C. trutta* gill and liver for the first time. In addition, inhibitory effects of some metal ions (Ag^+ , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} and Zn^{2+}) on enzyme activity were reported. The most effective metal ion is Ag^+ . Ag^+ inhibits the enzyme at very low doses. GR enzyme assay may be considered as a biomarker for the identification of pollution in aquatic environments.

References

Akerlund, B., Tynell, E., Bratt, G., Bielenstein, M., & Lidman, C. (1997). N-acetylcysteine treatment and the risk of toxic reactions to trimethoprim-sulphamethoxazole in primary *Pneumocystis carinii* prophylaxis in HIV-infected patients. *Journal of Infection*, 35, 143–147.

Akkemik, E., Senturk, M., Ozgeris, F. B., Taser, P., & Ciftci, M. (2011). *In vitro* effects of some drugs on human erythrocyte glutathione reductase. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 41, 235–241.

Akkemik, E., Taser, P., Bayindir, A., Budak, H., & Ciftci, M. (2012). Purification and characterization of glutathione s-transferase from turkey liver and inhibition effects of some metal ions on enzyme activity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34, 888–894.

Alim, Z., Camur, B., Beydemir, S., & Kufrevioglu, O. I. (2014). The correlation between some metal concentrations and carbonic anhydrase activity in Tuna (*Thunnus thynnus* Linnaeus, 1758) gill. *Haceteppe Journal of Biology and Chemistry*, 42, 219–224.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.

Carlberg, I., & Mannervik, B. (1975). Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, 250, 5475–5480.

Carlberg, I., & Mannervik, B. (1981). Purification and characterization of glutathione reductase from calf liver. An Improved procedure for affinity chromatography on 2',5'-ADP Sepharose 4B. *Analytical Biochemistry*, 116, 531–536.

Cooper, A. J. L., & Kristal, B. S. (1997). Multiple roles of glutathione in the central nervous system. *Biological Chemistry*, 378, 793–802.

Ekinci, D., Beydemir, S., & Kufrevioglu, O. I. (2007). *In vitro* inhibitory effects of some heavy metals on human erythrocyte carbonic anhydrases. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 22, 745–750.

Farkas, A., Salanki, J., Specziar, A., & Varanka, I. (2001). Metal pollution as health indicator of lake ecosystems. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 14, 163–170.

Garcia-Alfonso, C., Martinez-Galisteo, E., Llobell, A., Barcena, J. A., & Lopez-Barea, J. (1993). Horse liver glutathione reductase: Purification and characterization. *International Journal of Biochemistry*, 25, 61–68.

Gul, M., Kutay, F. Z., Temocin, S., & Hanninen, O. (2000). Cellular and clinical implications of glutathione. *Indian Journal of Experimental Biology*, 38, 625–634.

Gutterer, J., Dringen, R., Hirrlinger, J., & Hamprecht, B. (1999). Purification of glutathione reductase from bovine brain, generation of an antiserum, and immunocytochemical localization of the enzyme in neural cells. *Journal of Neurochemistry*, 73, 1422–1430.

Hisar, O., Sonmez, A. Y., Beydemir, S., Hisar, S. A., Yanik, T., & Cronin, T. (2009). Kinetic behaviour of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in different tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to non-lethal concentrations of cadmium. *Acta Veterinaria Brno*, 78, 179–185.

Isik, M., Demir, Y., Kirici, M., Demir, R., Simsek F., & Beydemir, S. (2015). Changes in the anti-oxidant system in adult epilepsy patients receiving anti-epileptic drugs. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 121, 97–102.

Jenner, P., & Olanow, C. W. (1998). Understanding cell death in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 44, 72–84.

Kalay, M., & Canli, M. (2000). Elimination of essential (Cu, Zn) and nonessential (Cd, Pb) metals from tissues of a freshwater fish *Tilapia zillii* following an uptake protocol. *Turkish Journal of Zoology*, 24, 429–436.

Kalyoncu, L., Kalyoncu, H., & Arslan, G. (2011). Determination of heavy metals and metals levels in five fish species from Işıkli Dam Lake and Karacaören Dam Lake (Turkey). *Environmental Monitoring and Assessment*, 184, 2231–2235.

Kaya, E. D., Soyut, H., & Beydemir, S. (2013). Carbonic anhydrase activity from the gilthead seabream (*Sparus aurata*) liver: The toxicological effects of heavy metals. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36, 514–521.

Kondo, T., Dale, G. L., & Beutler, E. (1980). Glutathione transport by inside-out vesicles from human erythrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77, 6359–6362.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–683.

Lavery, T. J., Kemper, C. M., Sanderson, K., Schultz, C. G., Coyle, P., Mitchell, J. G., & Seuront, L. (2009). Heavy metal toxicity of kidney and bone tissues in South Australian adult bottlenose dolphins (*Tursiops aduncus*). *Marine Environmental Research*, 67, 1–7.

Le Trang, N., Bhargava, K. K., & Cerami, A. (1983). Purification of glutathione reductase from gerbil liver in two steps. *Analytical Biochemistry*, 133, 94–99.

Madamanchi, N. R., Anderson, J. V., Alscher, R. G., Cramer, C. L., & Hess, J. L. (1992). Purification of multiple forms of glutathione reductase from pea (*Pisum sativum* L.) seedlings and enzyme levels in ozone-fumigated pea leaves. *Plant Physiology*, 100, 138–145.

Pacht, E. R., Timerman, A. P., Lykens, M. G., & Merola, A. J. (1991). Deficiency of alveolar fluid glutathione in patients with sepsis and the adult respiratory distress syndrome. *Chest*, 100, 1397–1403.

Poot, M., Teubert, H., Rabinovitch, P. S., & Kavanagh, T. J. (1995). *De novo* synthesis of glutathione is required for both entry into and progression through the cell cycle. *Journal of Cellular Physiology*, 163, 555–560.

Raspanti, E., Cacciola, S. O., Gotor, C., Romero, L. C., & Garcia, I. (2009). Implications of cysteine metabolism in the heavy metal response in *Trichoderma harzianum* and in three *Fusarium* species. *Chemosphere*, 76, 48–54.

Sato, M., & Kondoh, M. (2002). Recent studies on metallothionein: Protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 196, 9–22.

Soyut, H., Beydemir, S., & Hisar, O. (2008). Effects of some metals on carbonic anhydrase from brains of rainbow trout. *Biological Trace Element Research*, 123, 179–190.

Squadrone, S., Prearo, M., Brizio, P., Gavinelli, S., Pellegrino, M., Scanzio, T., Guarise, S., Benedetto, A., & Abete, M. C. (2013). Heavy metals distribution in muscle, liver, kidney and gill of european catfish (*Silurus glanis*) from Italian Rivers. *Chemosphere*, 90, 358–365.

Taser, P., & Ciftci, M. (2012). Purification and characterization of glutathione reductase from turkey liver. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 36, 546–553.

Tekman, B., Ozdemir, H., Senturk, M., & Ciftci, M. (2008). Purification and characterization of glutathione reductase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and inhibition effects of metal ions on enzyme activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 148, 117–121.

Van den Dobbelen, D. J., Nobel, C. S. I., Schlegel, J., Cotgreave, I. A., Orrenius, S., & Slater, A. F. (1996). Rapid and specific efflux of reduced glutathione during apoptosis induced by Anti-Fas/APO-1 antibody. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 15420–15427.

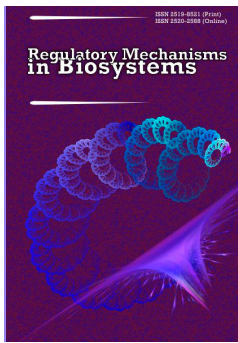
Willmore, W. G., & Storey, K. B. (2007). Purification and properties of glutathione reductase from liver of the anoxia-tolerant turtle, *Trachemys scripta elegans*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 297, 139–149.

Yadav, S. S., Srikanth, E., Singh, N., & Rathaur, S. (2013). Identification of glutathione reductase and TrxR systems in *Setaria cervi*: Purification and characterization of glutathione reductase. *Parasitology International*, 62, 193–198.

Yi, Y. J., & Zhang, S. H. (2012). Heavy metal (Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn) concentrations in seven fish species in relation to fish size and location along the Yangtze River. *Environmental Science and Pollution Research*, 19, 3989–3996.

Yoshida, K., Hirokawa, J., Tagami, S., Kawakami, Y., Urata, Y., & Kondo, T. (1995). Weakened cellular scavenging activity against oxidative stress in diabetes mellitus: Regulation of glutathione synthesis and efflux. *Diabetologia*, 38, 201–210.

Yousafzai, A. M., Siraj, M., Ahmad, H., & Chivers, D. P. (2012). Bioaccumulation of heavy metals in common carp: Implications for human health. *Pakistan Journal of Zoology*, 44, 489–494.



Features of gas exchange and use of reserve substances in pumpkin seedlings in conditions of skoto- and photomorphogenesis under the influence of gibberellin and chlormequat-chloride

I. V. Poprotska, V. G. Kuryata

Vinnitsya State Pedagogical University named after Mykhailo Kotsyubynsky, Vinnitsya, Ukraine

Article info

Received 11.01.2017

Received in revised form

13.02.2017

Accepted 15.02.2017

*Vinnitsya State Pedagogical University named after Mykhailo Kotsyubynsky, Ostroz'kogo Str., 32, Vinnitsya, 21000, Ukraine
Tel.: +38-067-261-98-97
E-mail: i_poprotska@ukr.net*

Poprotska, I. V., & Kuryata, V. G. (2017). Features of gas exchange and use of reserve substances in pumpkin seedlings in conditions of skoto- and photomorphogenesis under the influence of gibberellin and chlormequat-chloride. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8(1), 71–76. doi: 10.15421/021713

We investigated the effect of gibberellin and the antigibberellic agent chlormequat-chloride on gas exchange and use of reserve substances in pumpkin seedlings during germination in the light and in the dark. We established that an artificial strengthening or growth inhibition of pumpkin seedlings in conditions of skotomorphogenesis caused an increase in of respiration intensity. Gibberellin treatment increased the proportion of assimilation processes in carbon dioxide gas exchange of seedlings, and growth inhibition by retardant caused an increase in respiratory costs when the nutrition type switches in the light from heterotrophic to autotrophic. The formation by seedlings of the demand for reserve assimilates from cotyledons was largely determined by change of activity of subapical meristems, which is manifested in the acceleration of seed germination, enhancing of histogenesis for the actions of gibberellin and in the weakening of these processes under the influence of retardants. Reserve substances used both oil and nitrogen-containing compounds. The content of protein nitrogen in pumpkin cotyledons decreased more in the light than in the dark, moreover growth inhibition by the retardant slowed down and growth increase by gibberellin accelerated this process both in conditions of photomorphogenesis and skotomorphogenesis.

Keywords: *Cucurbita pepo* L.; source-sink system; retardants; hormonal regulation; seed germination

Introduction

In modern plant physiology the regulation of "source-sink" relations is seen as the highest level in the hierarchy of processes for the operation of a plant as a whole system. Regulation of these relations, as a system of redistribution of assimilates between organs and tissues of plants during ontogenesis, may be carried out at all levels of organization of a plant organism with the participation of different regulatory mechanisms (Ljung et al., 2015; Savage et al., 2015; Sugiura et al., 2015; Bonelli et al., 2016). The term assimilates means the different compounds of carbon assimilated by the plant during photosynthesis, especially transport and reserve form of carbohydrates, which are the basis of energy and metabolic processes and the "building material" in the growth and development processes (Kiriziy et al., 2014). The issue of recycling and redistribution of substances of other origin (lipids and nitrogen-containing compounds), that are temporarily deposited in reserve organs on germination of seeds and formation of seedling tissues under conditions of the varying tension of "source-sink" relations and of the effect of light and darkness to these processes have been much less studied.

The basic law of "donor – acceptor" relations (the concept of "source-sink") as a system of redistribution of assimilates between organs and tissues of plants during ontogenesis has been studied mainly in the analysis of the ratio of growth and photosynthesis intensity where the growth acts as the main acceptor, and photosynthesis as a donor of assimilates (Rogach and Rogach, 2015; Yu et al., 2015; Kuryata et al., 2016; Rogach et al., 2016). However, the

role of interim deposition of plastic materials, features of utilization of reserve compounds of different chemical nature in the heterotrophic growth period (germination), the initial stages of the photosynthetic apparatus formation and switching connections in the "source-sink" system have been insufficiently studied (Kuryata and Kiriziy, 2008). For the study of the features of assimilate redistribution in plants, a treatment of organs by exogenous hormones is widely applied, which allows one to simulate varying degrees of tension in the "source-sink" system. However, the drawback of this approach is obvious, because the treatment of a plant by any phytohormone leads to changes in synthesis and metabolism of all the others, which can cause changes in morphological and physiological programmes. In this connection, research on such a plan should be supplemented with a reverse approach – the treatment of plants by inhibitors of action of a separate phytohormone followed by comparison of the effect of action of the hormone and its inhibitors.

Light as one of the main environmental factors not only provides autotrophic nutrition but also activates the photomorphogenesis programme through the photoreceptor system (Kutschera and Briggs, 2013; Wu, 2014; De Wit and Pierik, 2016; VanHook, 2016). It provides the deetiolation, the differentiation of chloroplasts, the formation of leaf plates and as a result – the transition to autotrophic nutrition.

It is known that the development of plants in the light (photomorphogenesis) and in the dark (skotomorphogenesis) is characterized by differences in the rate of growth of various organs, which means that under these conditions a different request is formed for deposited assimilates and changes the intensity of their outflows

from storage organs, so varying degrees of a tension of "source-sink" system in plants are created. On the other hand, we know that phytohormones are included into the system of photic signal transduction (Hornitschek et al., 2012; Humplik et al., 2015). In particular, the action of light changes metabolism and sensitivity to gibberellins in plants (Golovatskaya and Karnachuk, 2007; Zhang et al., 2014). It is known that the speed of stem growth depends on the meristematic activity of the subapical zone, which is largely controlled by gibberellins (Minguet et al., 2014; Hedden and Thomas, 2016).

Modern plant physiology has the means of "exclusion" of gibberellin from this process, in particular by treatment with retardants – the gibberellic antagonists that either block the synthesis of this group of phytohormones or block the formation of the hormone-receptor complex, which is the functioning of the synthesized gibberellin (Kuryata, 2009; Sang-Kuk and Hak-Yoon, 2014). Thus, although retardants lead to significant morphological changes in the ontogeny of plants (Ramburan and Greenfield, 2007; Kumar et al., 2012; Matysiak and Kaczmarek, 2013; Wang et al., 2016), features of their impact on skoto- and photomorphogenesis in plants remain almost unexplored. Thus, an important aspect of theoretical study of the functioning of the system "assimilates depot – growth" is the comparison of the effects of gibberellin and various groups of retardants in the light and in the dark as factors that act in opposite ways on the growth processes, and therefore on the attractive potential of acceptor.

Changes in the nature of the "source-sink" relations during the transition from the heterotrophic to autotrophic nutrition phase of a plant are best studied using the cotyledon leaves of plants, because the source (cotyledon) and sink (cotyledon leaf) are represented by one organ and separated only in time. It should be noted that the ratio of photosynthesis and respiration under the influence of gibberellin and retardants during germination have been insufficiently studied. It is also known that the different types of reserve substances act as a buffer between the photosynthesis as a "source" of assimilates and growth of a structural substance of the vegetative, storing and reproductive organs as a "sink" of assimilates, which determines some independence of growth processes from the photosynthesis, particularly during germination (Kuryata and Kiriziy, 2008). At the same time, the effect of light and gibberellins on the specifics of recycling of plastic substances which are deposited in cotyledons, remains practically unexplored.

In this connection, the aim of our study was to investigate anatomical and histological changes of seedlings, features of gas exchange and use of reserve compounds in pumpkin cotyledons during exit from dormancy in conditions of photo- and skotomorphogenesis influenced by gibberellin and the antigibberellic agent chlormequat-chloride.

Materials and methods

Pumpkin seeds of the variety Mozoliyivskyy 15 in different variants of the experiment were soaked in solutions of preparations – gibberellic acid (GA_3 , 150 mg/l) and chlormequat-chloride (0.25% aquatic solution) during the day and then were planted in a cuvette filled with wet sand. The control option was germinated in distilled water. The seeds were germinated in diffused light and in the dark at room temperature. Biological replication was fivefold.

On the 12th day of germination after straightening of the hypocotyl loop, greening and disclosure of cotyledonary leaves, we determined the utilization coefficient of reserve substances in seeds as the ratio of total dry weight of hypocotyls and roots to the dry matter weight of the whole plant. Analytical replication was fivefold.

For anatomical studies, the pumpkin seedlings were fixed in a mixture of equal parts of ethanol, glycerine and water with addition of 1% of formalin. The anatomical structure of the pumpkin hypocotyls was explored in cross sections of their middle part. The linear dimensions of the cells was measured under a microscope by using the eyepiece micrometer MOV-1-15. Analytical

replication of anatomical research was twentyfold. The intensity of carbon dioxide gas exchange in the pumpkin seedlings was measured by using an infrared optical-acoustic gas analyzer HYAM-5M. For this purpose, the cuvette with seedlings was placed in a sealed desiccator which was purged with air at a speed of 2 l/min. In determining the darkness respiration the desiccator was covered with black cloth, and for measuring the intensity of photosynthesis in seedlings which were grown in the light the desiccator was lightened an incandescent lamp CG-2000 through a water filter. Radiant flux density was 200 w/m², the chamber temperature 25 °C. Analytical replication was fivefold.

The dry milled material of cotyledonary leaves and dry seeds were extracted in the Soxhlet apparatus to determine the oil content. The residue after extraction was analyzed for the content of total, protein and non-protein nitrogen by the Kjeldahl method (Bala et al., 2013). Analytical replication was fivefold.

The research results were processed statistically using the programme Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA). The tables and illustrations contain the arithmetic mean values and their standard errors.

Results

It is known that light controls not only the process of photosynthesis (the donor function), but also the morphophysiological parameters of plants with a definite hierarchical structure of acceptors (Franklin, 2016). Light changes the realization of plants' development programmes, which can be traced in changes in the speed and duration of plants' growth both on the level of the plant as a whole and on the level of their separate parts (root, epicotyl, hypocotyl, leaf). These changes are realized through the restructuring of the hormonal complex. Phytohormones are included in the light signal transduction because many of the development reactions of plants which are controlled by light also react to the action on plants by hormones (Golovatskaya and Karnachuk, 2007). Results of genetic analysis of mutations of gibberellins and phytochromes indicate an interaction between these signaling systems under certain physiological conditions.

Our results show that plants that grew in the dark developed on the skotomorphogenesis model. They are characterized by longer hypocotyls, the presence of a hypocotyl loop and the yellow colour of the cotyledonary leaves. In the light, plants developed on the photomorphogenesis model: the hypocotyls were shorter, the hypocotyl loop straightened, the cotyledonary leaves grew and acquired an intense green colour (Figure 1).

We have previously found that the growth of pumpkin seedlings was suppressed in the light, but the treatment of seedlings by gibberellic acid eliminated the effect caused by light. The growth inhibitory effect of light intensified in conditions of reduction of gibberellin synthesis under the action of the retardant, this indicates that gibberellins are the active modifiers of the photoreceptor system in plants (Kuryata and Kiriziy, 2008). Similar conclusions have been made by other authors studying the interaction of light at different wavelengths and phytohormones in the processes of skoto- and photomorphogenesis of bean plants (Golovatskaya and Karnachuk, 2007).

An important role in forming a "request" for assimilates is played by the processes of organ- and histogenesis because differentiation of various tissues of the developing organ requires the different costs of reserve metabolites. Analysis of the anatomical structure of pumpkin seedlings shows that in both conditions of skoto- and photomorphogenesis the number of fibrovascular bundles in seedlings is almost unchanged. However, all the anatomical elements of structure differed in their larger dimensions with seedlings developed in the dark (Table 1). This applies to linear dimensions of epidermal cells, collenchyma (in a cross section), the diameter and length of parenchyma cells. Thus, in conditions of skotomorphogenesis the increasing of growth intensity accompanied by formation of larger anatomical elements of the primary structure and the use of gibberellin increased plant growth in the dark and eliminated the growth inhibiting effect of light in conditions of photomorphogenesis.

Our results indicate the significant effect of the gibberellin and retardant on germination and intensity of use of reserve compounds in the pumpkin seeds' cotyledons. Determination of the utilization coefficient of reserve substances of seeds (the ratio of the total dry weight of hypocotyls and root to dry weight of the whole plant) in seedlings that grew in the light showed that at the moment of full disclosure of cotyledonary leaves (the 12th day of germination) the greatest value of this indicator was influenced by GA₃ – 22.2%, and the action of the chlormequat-chloride decreased it to 13.9% compared to the control, where it was 18.3%. In seedlings that grew in the dark, use of the reserve substances proceeded more rapidly. Thus, application of chlormequat-chloride caused a decrease in the utilization coefficient of reserve substances in seeds compared to the control and gibberellin. Similar results for use of the reserve compounds of cotyledons during germination of bean seeds in the light and in the dark have also been obtained by other authors (Golovatskaya and Karnachuk, 2007). It is common knowledge that

one of the most important functions of gibberellins in the stimulation of the seed germination process in cereals is the ability to stimulate an allocation the α -amylase from the germ to the endosperm, which leads to splitting of starch grains. It should be noted that the features of regulation by retardants and gibberellins of germination of seeds containing as the main reserve substance not starch but other compounds (lipids, proteins and other polysaccharides) have been poorly studied.

The results indicate that application of gibberellin and chlormequat-chloride greatly influenced the character of use of the cotyledon's reserve substances. Germination characterized by intensive use of oil as the main reserve substance, and the light and used preparations influenced this process. In dry seeds the oil content was $52.7 \pm 0.28\%$. On the 12th day of germination the largest reserve of oil remained in the cotyledonary leaves of the photomorphogenic plants under the action of chlormequat-chloride, which is clearly correlated with the least intense pace of seedling growth in this variant both in the light and in the dark (Table 2).

Table 1

Effect of gibberellin and retardants on the anatomical structure of pumpkin hypocotyls, variety Mozoliyivskyy 15, in conditions of skoto- and photomorphogenesis (n = 20)

Index	Light			Dark		
	GA ₃	control	chlormequat-chloride	GA ₃	control	chlormequat-chloride
Length of the epidermal cells, μm	$17.3 \pm 1.2^*$	10.2 ± 0.4	11.7 ± 0.8	$19.6 \pm 1.6^*$	15.7 ± 0.4	$12.6 \pm 1.1^*$
Width of the epidermal cells, μm	$11.6 \pm 1.1^*$	8.4 ± 0.9	7.8 ± 0.9	9.6 ± 0.7	9.5 ± 1.2	8.9 ± 0.9
Diameter of the parenchyma cells, μm	$64.7 \pm 1.6^*$	54.5 ± 1.3	$45.5 \pm 1.5^*$	$84.0 \pm 1.8^*$	75.9 ± 2.1	$58.4 \pm 1.8^*$
Height of the parenchyma cells, μm	$430.5 \pm 26.7^*$	262.9 ± 13.4	$186.9 \pm 14.1^*$	543.4 ± 22.6	484.8 ± 21.4	$182.4 \pm 13.3^*$
Volume of the parenchyma cells, thousands μm^3	$1414.7 \pm 74.1^*$	594.6 ± 32.3	$265.8 \pm 24.7^*$	$3\ 009.9 \pm 64.8^*$	$2\ 198.2 \pm 49.7$	$363.8 \pm 24.9^*$
Length of the collenchyma cells, μm	$29.7 \pm 1.1^*$	24.2 ± 1.2	26.4 ± 0.9	$29.0 \pm 0.8^*$	25.9 ± 0.8	$22.1 \pm 1.0^*$
Width of the collenchyma cells, μm	$18.3 \pm 0.8^*$	15.0 ± 0.8	13.4 ± 0.8	$24.3 \pm 0.5^*$	21.3 ± 0.6	22.4 ± 0.5
Number of the fibrovascular bundles	10.5 ± 0.2	10.8 ± 0.4	11.3 ± 0.6	10.7 ± 0.4	9.5 ± 0.5	10.4 ± 0.7

Notes: the 12h day of germination; GA₃ – 150 mg/l; chlormequat-chloride – 0.25%; * – significant difference at $P < 0.05$.

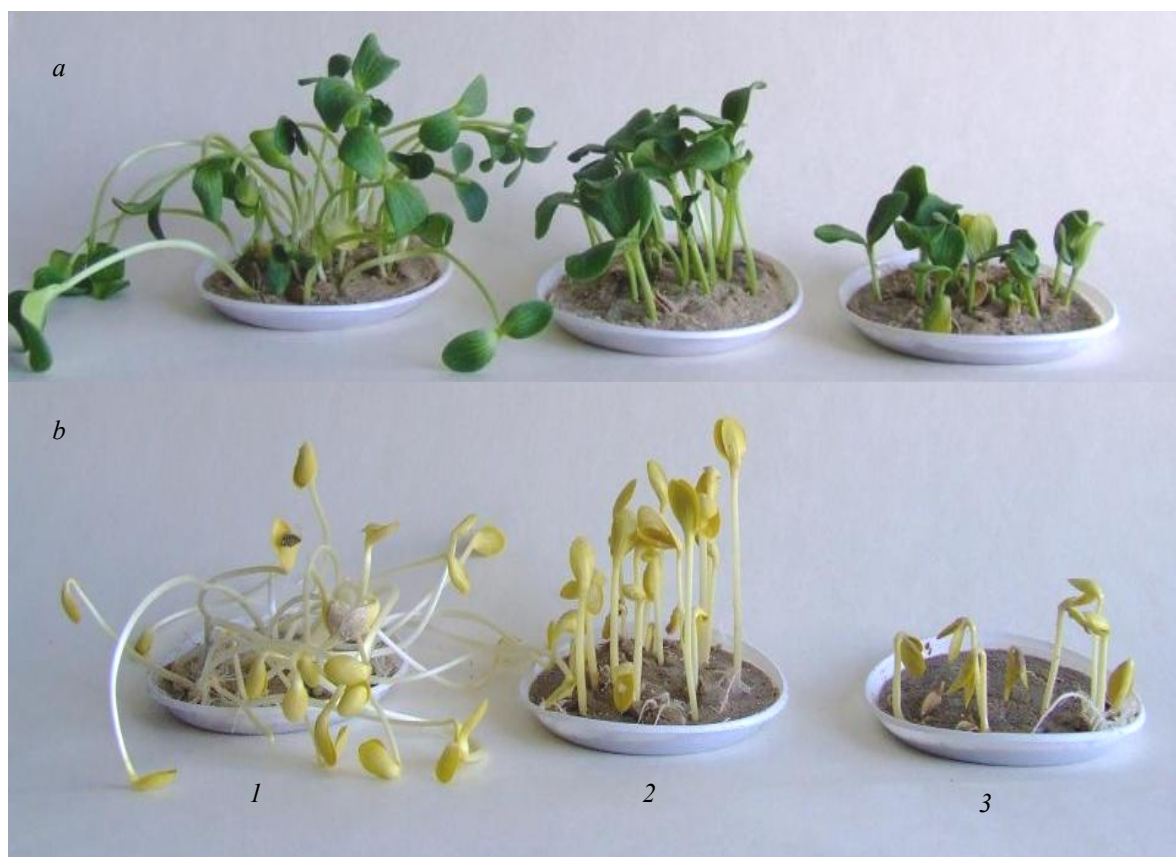


Figure 1. The action of gibberellin and chlormequate-chloride on the germination of pumpkin seeds, variety Mozoliyivskyy 15, in the light (a) and in the dark (b): 1 – GA₃ (150 mg/l); 2 – control; 3 – chlormequate-chloride (0.25%); the 12h day of germination

We have previously found that in conditions of skoto- and photomorphogenesis there are certain changes in the HFA ratio in the oil of cotyledonary leaves (Kutyata and Kiriziy, 2008). In particular, in the light in all variants of the experiment the content of stearic acid increased as compared to the oil of dry seeds, and in the dark such an increase was noted only in the variant with GA₃, in the control and in the variant with retardants the content of this acid did not differ from the oil of dry seeds. In conditions of skotomorphogenesis the content of the unsaturated HFA (oleic and linoleic) increased especially significantly. However, the increased growth of seedlings under the influence of gibberellin (GA₃) was not accompanied by a more intensive use of oil, its content in this variant was higher than in the control. In our view, this indicates that under the action of phytohormones increased growth is determined not only by fast utilization of lipids, but also by possible intensified hydrolysis of other reserve substances of cotyledons – the nitrogen-containing compounds.

Table 2

The oil content in germinating pumpkin seeds cotyledons, variety Mozoliyivskyy 15, under the influence of gibberellin and chlormequat-chloride in conditions of photo- and skotomorphogenesis (% per weight of dry matter, n = 5)

Variant of experiment	Photomorphogenesis	Skotomorphogenesis
Control	8.8 ± 0.2	7.6 ± 0.1
GA ₃	12.2 ± 0.3*	11.6 ± 0.2*
Chlormequat-chloride	22.4 ± 0.3*	15.5 ± 0.4*

Notes: the 12h day of germination; GA₃ – 150 mg/l; chlormequat-chloride – 0.25%; * – significant difference at P < 0.05.

The integrity of a plant organism is based on interaction of the organs and active exchange of organic and mineral substances between them. However, the nature of income and redistribution of nitrogen-containing compounds between plant organs with changes in the source-sink relations during heterotrophic development in general and under the influence of gibberellin and retardants in particular remains largely unexplored. Since retardants are the modifiers of hormonal and inhibitory balance in plants, here the question arises of changes in the income and redistribution between organs of plant nitrogen compounds under the influence of this group of preparations. In our opinion, for the better understanding of the nature of changes in source-sink relations under the influence of retardants, it was expedient to analyze the dynamics of content of different forms of nitrogen and their proportion in different stages of growth and development with an artificial change of the acceptor activity for the actions of gibberellin and its antagonist (Table 3). The use of cotyledonary leaves as a research model to study the question of utilization of reserve nitrogenous compounds allows one to analyze the translocation of only reserve forms of nitrogenous compounds and exclude the "new" nitrogen, which comes from the root system by mineral nutrition.

The analysis of our data indicates that under conditions of photo- and skotomorphogenesis there was a significant outflow of nitrogen from cotyledons to seedlings, and the content of total and protein nitrogen in defatted material of cotyledonary leaves was significantly different, in particular it was lower during the development of seedlings in the light (Table 3). In our view, this indicates a more intensive use of cotyledon protein for growth processes during formation of seedling structures in conditions of photomorphogenesis.

Table 4

Intensity of gas exchange of pumpkin seedling, variety Mozoliyivskyy 15, under the influence of gibberellin (GA₃, 150 mg/l) and chlormequat-chloride (0.25% solution) under photo- and skotomorphogenesis (mg CO₂/g of dry matter • h, the 12h day of germination, n = 5)

Variant of experiment	Photomorphogenesis				Skotomorphogenesis		
	utilization coefficient of reserve substances of seeds, %	intensity of respiration (R)	apparent photosynthesis	true photosynthesis (Pg)	R/Pg	utilization coefficient of reserve substances of seeds, %	intensity of respiration (R)
Control	18.30 ± 0.64	1.70 ± 0.07	0.95 ± 0.02	2.65 ± 0.09	0.59	35.9 ± 0.85	2.03 ± 0.08
GA ₃	22.20 ± 0.35*	1.14 ± 0.03*	0.81 ± 0.03*	1.95 ± 0.06*	0.64	38.4 ± 0.32*	3.00 ± 0.12*
Chlormequat-chloride	13.87 ± 0.56*	2.57 ± 0.08*	0.32 ± 0.01*	2.89 ± 0.09	0.89	22.9 ± 0.18*	2.94 ± 0.10*

Note: * – significant difference at P < 0.05.

The different rates of growth processes under action of gibberellin and retardant were accompanied by a different intensity of outflow of nitrogen-containing compounds from the cotyledons. In particular, in the light the least protein nitrogen remained in the variant of gibberellin, and the mostly – in the variant with the use of its antagonist chlormequat-chloride. Upon germination in the dark for actions of the retardant the protein nitrogen was used less intensively. In the control variant and in the variant with application of gibberellin the intensity of use of protein nitrogen was the same, but the decrease of total nitrogen in cotyledons influenced by the phytohormone occurred more intensively at the expense of the non-protein fraction.

Table 3

The content of different forms of nitrogen in germinating pumpkin seeds cotyledons, variety Mozoliyivskyy 15, under the influence of gibberellin and chlormequat-chloride in conditions of photo- and skotomorphogenesis (% per weight of dry matter, n = 5)

Variant of experiment	Total nitrogen	Protein nitrogen	Non-protein nitrogen
Dry seeds	11.08 ± 0.02	10.40 ± 0.01	0.68 ± 0.01
Photomorphogenesis			
Control	6.05 ± 0.01	4.04 ± 0.01	2.01 ± 0.04
GA ₃	5.99 ± 0.02*	3.68 ± 0.01*	2.31 ± 0.03*
Chlormequat-chloride	7.13 ± 0.02*	4.94 ± 0.04*	2.19 ± 0.02*
Skotomorphogenesis			
Control	6.91 ± 0.01	4.75 ± 0.01	2.16 ± 0.05
GA ₃	6.73 ± 0.03*	4.76 ± 0.01	1.97 ± 0.02*
Chlormequat-chloride	7.16 ± 0.01*	5.09 ± 0.02*	2.07 ± 0.01

Notes: see Table 2.

The results obtained also show that the use of gibberellin and the antigibberellic agent chlormequat-chloride under conditions of photo- and skotomorphogenesis influenced significantly the gas exchange of seedlings (Table 4). At present, respiration is seen as a powerful metabolic acceptor of carbon, and the total respiratory costs may reach 60% of the carbon assimilated in photosynthesis (Kuryata, 2009). The ratio of respiration/photosynthesis largely characterizes the tension of source-sink relations in plants, but the scale of respiratory costs compared with the true photosynthesis during the transition to other levels of source-sink relations has not been completely clarified.

Under conditions of skotomorphogenesis, the control variant was marked by the lowest intensity of dark respiration, and under the action of gibberellin and its antagonist chlormequat-chloride the intensity of respiration increased. In the seedlings that grew in the light, the highest intensity of respiration was observed in the variant with chlormequat-chloride, and the lowest – in the variant with gibberellin. Generally, in all variants of the experiment the dark respiration intensity was lower in seedlings which passed on the light from heterotrophic to autotrophic nutrition than in seedlings, grown in the dark (Table 4). Thus, a modification of regulatory relations in the source-sink system "depot of assimilates – growth" in the early development of seedlings by using exogenous gibberellin and retardant chlormequat-chloride leads to changes in morphogenesis and growth rate, which affects the intensity of reserve compounds' use, respiration and photosynthesis during the transition to autotrophic nutrition. In the dark and using gibberellin the request for reserve substance increases, while in the light and with treatment by retardants the acceptor activity of seedlings decreases.

Discussion

It is known that there is a close relationship between the changes in growth characteristics with the action of retardants and the activity of gibberellins. In particular, under the influence of paclobutrazol, chlormequat-chloride and dekstrel a significant decrease was noted in the activity of free gibberellins in raspberry shoots in conditions of growing and field experiments, while the introduction of exogenous gibberellic acid raised significantly their activity in the tissues of the stem (Kuryata, 2009). Our results indicate that gibberellin increased and chlormequat-chloride decreased the linear dimensions and volume of cells of the main parenchyma, but the use of preparations had no effect on the number of fibrovascular bundles in the stem. Thus, gibberellins and the absence of light increase growth processes, and therefore attractive activity in seedlings at the heterotrophic nutrition stage. The use of retardants and the effect of light in this period acts in the opposite way – reduces the intensity of the growth process and therefore the attractive activity of seedlings. Consequently, the formation by seedlings of "a request" for the reserve assimilates from cotyledons is largely determined by changes in subapical meristem activity, which is manifested in the acceleration of seed germination, amplification of histogenesis for the action of gibberellin and weakening of these processes under the influence of the retardant.

Since the growth amplified and the activity of seedlings' meristems intensified under GA_3 compared with the action of retardants, it is important to analyze the features of redistribution of reserve substances in the acceptor zone (seedling) in the variants of the experiment in connection with formation of a different request for reserve metabolites. The results obtained for determining the content of different forms of nitrogen and oil in the cotyledons indicate that gibberellins are an important link of the unique regulatory mechanism of mobilization of reserve substances in germinating seeds, regardless of their chemical nature. The level of utilization of nitrogenous compounds from cotyledons was higher with the action of gibberellin. Previously, it was also found that the process of pumpkin seed germination was accompanied not only by use of typical reserve substances of oil crops – reserve oil and nitrogen-containing compounds, but also by a significant restructuring of polysaccharide complex of cell walls. The pentosans of cell walls use as a reserve substance and there is a change of conformation and a partial increase in the molecular weight of pectins. These processes were amplified in conditions of skotomorphogenesis as a result of intensive growth of seedlings in the absence of autotrophic nutrition and, consequently, a deeper utilization of the reserves of the donor plastic substances – the cotyledons (Poprotska, 2014).

Intensity of plant respiration is closely related to the growth processes, usually intensity of respiration is amplified with intensification of growth. The application of retardants allows one to explain clearly the significance of respiration components with the artificial change of donor and acceptor (source and sink) activity because it is possible to simulate this type of disbalance of the donor and acceptor activity in which a request to assimilates of the main acceptor (developing seedlings) is reduced due to inhibition its meristem activity. It must be emphasized that depending on the methodological approaches and the degree of research detail both the separate plant structures (organs, tissues, cells and organelles) and the processes (photosynthesis, respiration, storing, transportation) can act as a donor and as an acceptor. In this, the application of "donor and acceptor" concepts to particular organs or processes is not absolute and depends on the development phase of the separate organ or the whole plant (Kiriziy et al., 2014).

The results obtained permit one to draw the conclusion that gibberellin and its antagonists have opposite effects on respiratory components: stimulation of growth under the action of GA_3 is accompanied by increased growth respiration, and support of cell homeostasis under the action of the growth inhibiting preparation chlormequat-chloride provided by increase of maintenance respiration (Kuryata, 2009). In our view, the decrease in the intensity of true photosynthesis per unit weight of dry matter influenced by GA_3 com-

pared to control can be explained by the lower proportion of the cotyledons' weight compared to the whole plant in this version. At the same time, the respiratory costs (R/Pg) greatly increased in the variant using chlormequat-chloride. We have previously been suggested that respiration plays the role of "safety valve" by removing the excess of assimilates in the form of CO_2 (Kuryata and Kiriziy, 2008). Thus the donor function of cotyledonary leaves of photomorphic plants is limited by the increase of respiratory costs, therefore it decreases the proportion of assimilates that are directed to the needs of organogenesis. The combined use of light, gibberellin and retardants for artificial regulation of tension of source-sink relations in plants can be an effective methodological approach to study of the role of phytohormones and to clarify the features of use of plant reserve compounds in experimental researches of the germination processes.

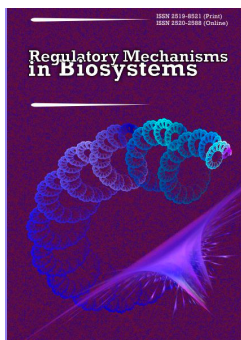
Conclusions

In conditions of skotomorphogenesis of pumpkin seedlings an inhibition or intensification of growth caused increase in respiration intensity. When nutrition type in the light was switched from heterotrophic to autotrophic, gibberellin treatment increased the proportion of assimilation processes in carbon dioxide gas exchange of pumpkin seedlings and growth inhibition by the retardant caused an increase in respiratory costs. The formation of a "request" to the reserve assimilates from cotyledons by seedlings is largely determined by changes in activity of subapical meristems, which are manifested in acceleration of seed germination, enhancement of histogenesis for the actions of gibberellin and the weakening of these processes under the influence of retardants. Both oil and nitrogen-containing compounds were used as reserve substances. The content of protein nitrogen in pumpkin cotyledons decreased more in the light than in the dark, and growth inhibition by the retardant slowed down and increasing by gibberellin accelerated this process both in conditions of photo- and skotomorphogenesis.

References

- Bala, M., Gupta, S., Gupta, N. K., & Sangha, M. K. (2013). Practical in plant physiology and biochemistry. Scientific Publisher, Jodhpur.
- Bonelli, L. E., Monzon, J. P., Cerrudo, A., Rizzalli, R. H., & Andrade, F. H. (2016). Maize grain yield components and source-sink relationship as affected by the delay in sowing date. *Field Crops Research*, 198, 215–225.
- De Wit, M., & Pierik, R. (2016). Photomorphogenesis and photoreceptors. *Canopy Photosynthesis: From Basics to Applications*, 42, 171–186.
- Franklin, K. A. (2016). Photomorphogenesis: Plants feel blue in the shade. *Current Biology*, 26(24), R1275–R1276.
- Golovatskaya, I. F., & Karnachuk, R. A. (2007). Dinamika rosta rastenij i sodержanie endogennyh fitogormonov v processe skoto- i fotomorfogeneza fasoli [Dynamics of growth and the content of endogenous phytohormones during kidney bean scoto- and photomorphogenesis]. *Fiziologija rastenij*, 54(3), 461–468 (in Russian).
- Hedden, P., & Thomas, S. G. (2016). The gibberellins. *Annual Plant Reviews*, 49. John Wiley & Sons.
- Hornitschek, P., Kohnen, M. V., Lorrain, S., Rougemont, J., Ljung, K., López-Vidriero, I., Franco-Zorrilla, J. M., Solano, R., Trevisan, M., Pradervand, S., Xenarios, I., & Fankhauser, C. (2012). Phytochrome interacting factors 4 and 5 control seedling growth in changing light conditions by directly controlling auxin signaling. *The Plant Journal*, 71(5), 699–711.
- Humlík, J. F., Turečková, V., Fellner, M., & Bergounoux, V. (2015). Spatio-temporal changes in endogenous abscisic acid contents during etiolated growth and photomorphogenesis in tomato seedlings. *Plant Signaling and Behavior*, 10(8), e1039213.
- Kiriziy, D. A., Stasyk, O. O., Pryadkina, G. A., & Shadchyna, T. M. (2014). Fotosintez. T. 2. Assimilyatsiya CO_2 i mehanizmy jejno regulyatsii. Logos, Kiev (in Russian).
- Kumar, S., Ghatty, S., Satyanarayana, J., Guha, A., Chaitanya, B., & Reddy, A. R. (2012). Paclobutrazol treatment as a potential strategy for higher seed and oil yield in field-grown *Camelina sativa* L. *Crantz. BMC Research Notes*, 5, 137.
- Kuriata, V. G., Rohach, V. V., Rohach, T. I., & Khranovska, T. V. (2016). The use of antigibberellins with different mechanisms of action on morphogenesis and production process regulation in the plant *Solanum*

- melongena* (Solanaceae). Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Ecology, 24(1), 230–234.
- Kuryata, V. G. (2009). Retardanty – modyfikatory hormonalnogo statusu roslin. Fiziologija roslin: Problemy ta perspektyvy rozvytku. T. 1. Logos, Kyiv (in Ukrainian).
- Kuryata, I. V., & Kiriziy, D. A. (2008). Regulyatsiya donomo-akseptomyh vidnosyn u systemi depo asimilyativ- rist u prorostkiv garbuza pid vplyvom gibberelinu i hlormekvathlorydu za umov skoto- i fotomorfogenezu [Regulation of source-sink relations in the system reserve assimilates-growth in cucurbit (*Cucurbita pepo* L.) under the effect of gibberellin and chlormequate chloride in scoto- and photomorphogenesis conditions]. Fiziologija i biohimiya kul'turnih rastenij, 40(5), 448–457 (in Ukrainian).
- Kutschera, U., & Briggs, W. R. (2013). Seedling development in buckwheat and the discovery of the photomorphogenic shade-avoidance response. Plant Biology, 15(6), 931–940.
- Ljung, K., Nemhauser, J. L., & Perata, P. (2015). New mechanistic links between sugar and hormone signalling networks. Current Opinion in Plant Biology, 25, 130–137.
- Matysiak, K., & Kaczmarek, S. (2013). Effect of chlorocholine chloride and triazoles – tebuconazole and flusilazole on winter oilseed rape (*Brassica napus* var. *oleifera* L.) in response to the application term and sowing density. Journal of Plant Protection Research, 53(1), 79–88.
- Minguet, E. G., Alabadi, D., & Blázquez, M. A. (2014). Gibberellin implication in plant growth and stress responses. Phytohormones: A Window to Metabolism, Signaling and Biotechnological Applications, 119–161.
- Poprotska, I. V. (2014). Zminy v polisaharydnomu kompleksu klitynyh stinok sim'yadolej prorostkiv garbuza za riznoyi napruzhenosti donomo-akseptomyh vidnosyn v protsesi prorostannya [Changes in polysaccharide complex of cell walls of the pumpkin seedlings cotyledons under different level of source-sink relations during germination]. Fiziologija i Biohimiya Kulturnykh Rastenij, 46(3), 190–195 (in Ukrainian).
- Ramburan, S., & Greenfield, P. L. (2007). Use of ethephon and chlormequat chloride to manage plant height and lodging of irrigated barley (cv. Puma) when high rates of N-fertiliser are applied. South African Journal of Plant and Soil, 24(4), 181–187.
- Rogach, V. V., & Rogach, T. I. (2015). Vplyv syntetychnykh stymulyatoriv rostu na morfofiziologichni harakterystyky ta biologichnu produktyvnist' kul'tury kartopli [Influence of synthetic growth stimulators on morphological and physiological characteristics and biological productivity of potato culture]. Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Ecology, 23(2), 221–224 (in Ukrainian).
- Rogach, V. V., Poprotska, I. V., & Kuryata, V. G. (2016). Diya gibberelinu ta retardantiv na morfogenez, fotosyntetychnyj aparat i produktyvnist' kartopli [Effect of gibberellin and retardants on morphogenesis, photosynthetic apparatus and productivity of the potato]. Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Ecology, 24(2), 416–419 (in Ukrainian).
- Sang-Kuk, K., & Hak-Yoon, K. (2014). Effects of gibberellin biosynthetic inhibitors on oil, secoisolarosonolodiglucoiside, seed yield and endogenous gibberellin content in flax. Korean Journal of Plant Resources, 27(3), 229–235.
- Savage, J. A., Haines, D. F., & Holbrook, N. M. (2015). The making of giant pumpkins: How selective breeding changed the phloem of *Cucurbita maxima* from source to sink. Plant, Cell and Environment, 38(8), 1543–1554.
- Sugiura, D., Sawakami, K., Kojima, M., Sakakibara, H., Terashima, I., & Tateno, M. (2014). Roles of gibberellins and cytokinins in regulation of morphological and physiological traits in *Polygonum cuspidatum* responding to light and nitrogen availabilities. Functional Plant Biology, 42(4), 397–409.
- VanHook, A. M. (2016). Rapidly inhibiting ethylene signaling with light. Science Signaling, 9(458), 294.
- Wang, Y., Gu, W., Xie, T., Li, L., Sun, Y., Zhang, H., Li, J., & Wei, S. (2016). Mixed compound of DCPTA and CCC increases maize yield by improving plant morphology and upregulating photosynthetic capacity and antioxidants. PLoS One, 11(2), e0149404.
- Wu, S.-H. (2014). Gene expression regulation in photomorphogenesis from the perspective of the central dogma. Annual Review of Plant Biology, 65, 311–333.
- Yu, S. M., Lo, S. F., & Ho, T. D. (2015). Source – sink communication: Regulated by hormone, nutrient, and stress cross-signaling. Trends in Plant Science, 20(12), 844–857.
- Zhang, D., Jing, Y., Jiang, Z., & Lin, R. (2014). The chromatin-remodeling factor PICKLE integrates brassinosteroid and gibberellin signaling during skotomorphogenic growth in *Arabidopsis*. The Plant Cell, 26(6), 2472–2485.



Condition of the prooxidant-antioxidant system of some strains of Basidiomycetes

O. V. Fedotov

Donetsk National Medical University, Kramatorsk, Ukraine

Article info

Received 06.01.2017

Received in revised form
14.02.2017

Accepted 17.02.2017

Donetsk National
Medical University,
Boulevard of Mechanical
Engineers, 39,
Kramatorsk, 84331, Ukraine
Tel.: +38-068-717-87-87
E-mail: bio.graff@ukr.net

Fedotov, O. V. (2017). Condition of the prooxidant-antioxidant system of some strains of Basidiomycetes. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(1), 77–83. doi: 10.15421/021714

The article deals with the calculation and comparison indications of the condition of the prooxidant-antioxidant system (PAS) of strains of Basidiomycetes under periodic surface cultivation on a glucose-peptone medium. The research material consisted of the mycelium and culture filtrate (CF) from 57 strains, 52 of them belonging to 7 species of the order Agaricales and 5 belonging to 5 species of the order Polyporales. The intensity of the processes of lipid peroxidation was determined by a modified spectrophotometric method for contents of active products to thiobarbituric acid. Total antioxidant activity (AOA) of the mycological material was evaluated by intensity of inhibition from accumulated products of lipid peroxide oxidation (LPO) in a model reaction of oxidation by Twin-80 oxygen of the air. From the data obtained, indicators of prooxidant activity (POA), indicators of reserve of substrate peroxidation (SPO) and the balance coefficient of the prooxidant-antioxidant system (CbPAS) were calculated. It was established that strains of Basidiomycetes are characterized by significant predominance of prooxidant activity characteristic of PAS in the culture filtrate in comparison with the mycelium indicator. The highest values of POA in the Culture Filtrate were observed on the 12-th day of cultivation for the strain P-089 genus *Pleurotus* and strain G1-2 genus *Ganoderma*, and for the mycelium on the 9-th day of cultivation for the strains P-citr, P-089, P-er and P-082 of the genus *Pleurotus*. There is a direct dependence between the indicators of POA in the CF and mycelium for each strain, this dependence and level of indication do not reflect their systematic placement. We distinguished a more significant prevalence of indicators of reserve of substrates peroxidation of mycelium for most strains, than for such indicators with CF. The highest value of reserve SPO of mycelium was recorded for strains P-447, P-998, P-039, P-94, P-2175, P-citr, P-er, D-140 of the genus *Pleurotus* and strains F-107, F-610 of the genus *Flammulina*. For the majority of the strains there was a clear prevalence of the values of the balance coefficients for PAS of mycelium over those of CF. Maximum values of the balance coefficient PAS of mycelium on the 9-th day were recorded for strains T-10 (*F. fomentarius*) and D-140, P-035, P-01, P-105 (*P. ostreatus*) and on the 12-th day for strains Sc-10 (*S. commune*), P-kl, P-14 (*P. ostreatus*), P-er (*P. eryngii*) i 960 (*A. cylindracea*). The abovementioned strains are distinguished by the with high level of AOA in the mycelium on certain days of cultivation and can be recommended as producers of antioxidants of fungal origin.

Keywords: prooxidant activity; antioxidant activity; mushrooms; surface cultivation; glucose-peptone medium

Стан прооксидантно-антиоксидантної системи деяких штамів базидіомікозових грибів

О. В. Федотов

Донецький національний медичний університет, Краматорськ, Україна

Робота присвячена розрахунку та порівнянню показників стану прооксидантно-антиоксидантної системи (ПАС) штамів базидіомікозових грибів за їх поверхневого періодичного культивування на глюкозо-пептонному середовищі. Матеріал дослідження – міцелій та культуральний фільтрат (КФ) 57 штамів: 52 із них належать до 7 видів порядку Agaricales та 5 – до 5 видів порядку Polyporales. Інтенсивність процесів ліпідної пероксидації визначали модифікованим спектрофотометричним методом за вмістом продуктів ПОЛ, активних до тіобарбітурової кислоти. Загальну антиоксидантну активність (АОА) мікологічного матеріалу оцінювали за інтенсивністю гальмування накопичення продуктів ПОЛ у модельній реакції окиснення Твін-80 киснем повітря. За отриманими даними розраховували показник прооксидантної активності (ПОА), показник резерву субстратів перекисного окиснення (СПО) та коефіцієнт рівноваги прооксидантно-антиоксидантної системи (КРПАС). Для штамів базидіомікозових грибів характерне переважання активності прооксидантної складової ПАС у культуральному фільтраті порівняно з цим показником міцелію. Найвищі значення ПОА КФ відмічаються на 12-ту добу культивування штаму P-089 роду *Pleurotus* і штаму G1-2 роду *Ganoderma*, а міцелію – на 9-ту добу культивування штамів P-citr, P-089, P-er та P-082 роду *Pleurotus*. Зарєстровано пряму залежність між показниками ПОА КФ і міцелію кожного штаму, ця залежність та рівень показника не відображають їх систематичного положення. Виявлено суттєву перевагу показників резерву субстратів перекисного окиснення міцелію більшості штамів над таким показником КФ. Найвищі значення резерву СПО міцелію зафіксовані для штамів P-447,

P-998, P-039, P-94, P-2175, P-citr, P-er, D-140 роду *Pleurotus* та штамів F-107, F-610 роду *Flammulina*. Для переважної більшості штамів характерне переважання значень коефіцієнтів рівноваги ПАС міцелію над такими КФ. Максимальні значення коефіцієнтів рівноваги ПАС 9-добового міцелію зафіксовані для штамів T-10 (*F. fomentarius*) і D-140, P-035, P-01, P-105 (*P. ostreatus*) та 12-добового – штамів Sc-10 (*S. commune*), P-кл, P-14 (*P. ostreatus*), P-er (*P. eryngii*) і 960 (*A. cylindracea*). Названі штами вирізняються високим рівнем АОА міцелію на встановлену добу культивування та можуть бути рекомендовані як продуценти антиоксидантів грибного походження.

Ключові слова: прооксидантна активність; антиоксидантна активність; поверхнєве культивування; глюкозо-пептонне середовище

Вступ

Прооксидантно-антиоксидантна система (ПАС) живого організму включає два взаємопротилежні процеси: генерацію активних форм кисню (АФК), що ініціюють вільнорадикальне перекисне окиснення (ВРПО) та сповільнення чи припинення процесу окиснення комплексом речовин антиоксидантного захисту (АОЗ) (Halliwell, 2006; Winquist, 2008; Egorova et al., 2015). Увага до зміни показників ПАС пояснюється їх вирішальним значенням у функціонуванні організму на клітинному та організменому рівнях. У численних дослідженнях, які проводяться в галузі вільнорадикальної біології, показано, що розвиток дисбалансу ПАС супроводжується порушенням функціонування систем організму (Droge, 2002; Fruehauf et al., 2007). Зміщення рівноваги ПАС зумовлює зниження його резистентності до несприятливих екзогенних і ендогенних факторів і є однією із ключових ланок розвитку патогенетичних явищ (Syrchin et al., 2015; Fedotov, 2016). Окисний стрес, що супроводжується переважанням прооксидантного процесу над антиоксидантним, характеризується посиленням неконтрольованих реакцій вільнорадикального окиснення (ВРО), у тому числі перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) з одночасним виснаженням антиоксидантної системи (АОС) (Fruehauf et al., 2007). Кореляція окисного стресу та розвитку патогенетичних явищ можлива посиленням біосинтезу власних чи внесенням додаткових про- та антиоксидантів (Cherubini et al., 2008; Syrchin et al., 2015).

Тривале використання синтетичних лікарських препаратів, у тому числі антиоксидантів обмежене через їх потенційну токсичну дію. Це підвищує актуальність пошуку високопродуктивних природних продуцентів біологічно активних речовин (БАР) (Halliwell, 2006; Pham-Huy et al., 2008; Wasser, 2011). Одні з перспективних організмів-продуцентів БАР профілактично-лікувальної дії – базидіомікотові гриби (Asatiani et al., 2010; Wasser, 2010, 2011; Syrchin et al., 2015). Ці організми як у природних умовах, так і за їх штучного вирощування здатні до синтезу та накопичення повноцінного протеїну та численних БАР. Приміром, їх складні ензимні комплекси прооксидантно-антиоксидантної системи задіяні у біотрансформації складних та хімічно стійких біополімерів, що має промислове (Chang, 2001; Winquist, 2008; Kapich, 2010) та екологічне значення (Eriksson et al., 1990; Fedotov, 2007; Chayka et al., 2014). Як наслідок, інтенсивно розробляються способи культивування істивних та лікарських видів базидіомікотових та виділення їх метаболітів (Voloshko et al., 2011; Fedotov et al., 2012; Bisko et al., 2016). Це поліцукри та ензими, поліфеноли та терпени, полікетиди та стероїди, вітаміни та вітаміноподібні речовини тощо (Wasser, 2011; Voloshko et al., 2011; Velygodska et al., 2016). Їх терапевтична дія, у першу чергу, зумовлена антиоксидантною активністю – здатністю до поглинання (scavenging) вільних радикалів, модуляції активності ензимів шляхом хелатування металів та пригнічення процесу окиснення ліпідів (Asatiani et al., 2010; Kapich, 2011; Syrchin et al., 2015). Дослідження показали, що грибні метаболіти, у тому числі антиоксиданти, мають високий рівень біодоступності, здатні швидко метаболізуватися в організмі. Вживання грибів та інших продуктів із високою концентрацією антиоксидантів зумовлює появу у плазмі крові біоактивних метаболітів, що, у свою чергу, підвищує її антиоксидантну активність (Cherubini et al., 2008; Bitto et al., 2010; Syrchin et al., 2015).

Мета цього дослідження – встановити та порівняти показників прооксидантно-антиоксидантної системи у динаміці росту штамів базидіомікотових грибів за їх поверхнєвого періодичного культивування на глюкозо-пептонному середовищі.

Матеріал і методи досліджень

Об'єкти дослідження – 57 штамів 12 видів грибів відділу Basidiomycota (Fedotov et al., 2012). Серед них до порядку Agaricales належать штами 167, 218, 960 *Agrocybe cylindracea* (DC.) Gillet., штамп Fh-08 *Fistulina hepatica* Schff. ex Fr., штами F-03, F-06, F-073, F-1, F-10, F-102, F-104, F-107, F-112, F-2, F-202, F-204, F-vv, F-610 *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Sing., штамп P-citr *Pleurotus citrinopileatus* Singer., штамп P-er *Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) Quél., штами D-140, Hk-35, P-004, P-01, P-035, P-039, P-081, P-082, P-083, P-087, P-088, P-089, P-105, P-107, P-12к, P-191, P-192, P-203, P-206, P-208, P-209, P-210, P-6v, P-кл, P-14, P-4к, P-91, P-94, P-998, P-447, P-2175 *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) P. Kumm. та штамп Sc-10 *Schizophyllum commune* Fr.: Fr.. До порядку Polyporales належать штамп Dq-08 *Daedalea quercina* Fr., штамп T-10 *Fomes fomentarius* (L. ex Fr.) Gill., штамп Gl-2 *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst., штамп Il-4k *Irpex lacteus* Fr. та штамп Ls-08 *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. Систематичне положення видів досліджуваних штамів з'ясоване згідно із сучасними літературними джерелами (Kirk, 2008).

Із метою встановлення показників стану прооксидантно-антиоксидантної системи дослідні штами культивували періодично поверхнєво за $27,5 \pm 0,02$ °C протягом 12 діб у колбах Ерленмеєра ємністю 250 мл, що містили 50 мл живильного середовища. Використовували стандартне глюкозо-пептонне середовище (ГПС, рН $6,5 \pm 0,2$): глюкоза – $10,0$ г/дм³, пептон – $3,0$ г/дм³, KH_2PO_4 – $0,6$ г/дм³, K_2HPO_4 – $0,4$ г/дм³, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – $0,5$ г/дм³, CaCl_2 – $0,05$ г/дм³, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – $0,001$ г/дм³. Інокулюмом ($0,5 \pm 0,01$ г/дм³) слугували 10-добові міцеліальні культури штамів на сусло-агарі (СА). Режим ферментації зумовлений економічною та технологічною недоцільністю довгострокового культивування та тривалістю фази експоненціального росту штамів (Wasser, 2011; Fedotov, 2012).

Досліджували міцелії і культуральний фільтрат (КФ), які готували таким чином. Після закінчення терміну культивування штамів міцелії відділяли від культуральної рідини за температури 5 ± 1 °C шляхом фільтрування. Отриманий міцелій промивали дистильованою водою, підсушували на фільтрувальному папері та гомогенізували шляхом розтирання в охолодженій до $1 \pm 0,5$ °C фарфоровій ступці. Міцеліальний гомогенат (МГ) використовували для приготування водної витяжки та разом із КФ – для визначення показників ПАС. Рештки міцелію переносили у відкалібровані бюкси, зважували та висушували за $+104 \pm 2$ °C до постійної маси. Далі розраховували вологість і абсолютно суху біомасу (АСБ) міцелію (Dudka et al., 2003; Voloshko et al., 2011; Chayka et al., 2014).

Із метою встановлення рівня самочинної інтенсивності (A_2) процесів ПОЛ, до $1,5$ мл водної витяжки міцелію або $0,5$ мл КФ (контроль – дистильована вода) додавали розчини трихлороцтової кислоти (ТХО) та тіобарбітурової кислоти (ТБК) до кінцевих концентрацій у реакційній суміші $0,61$ та $0,37$ моль/дм³, відповідно. Суміш кип'ятили на водяній бані протягом 15 хв, після чого швидко охолоджували до $+20$ °C. Отриманий розчин центрифугували 15 хв за 1700 г. Із метою визначення рівня індукованої (A_1) інтенсивності процесів ПОЛ до вказаних об'ємів водної витяжки міцелію або КФ (контроль – дистильована вода) додавали $1 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³ розчин сірчано-кислого заліза і $1 \cdot 10^{-2}$ моль/дм³ аскорбінової кислоти. Суміш витримували за $+40$ °C на водяній бані протягом 90 хв. Далі на спектрофотометрі за довжини хвилі 532 і 590 нм вимірювали екстинкцію супернатантів дослідних проб проти контрольних. Самочинну та індуковану інтенсивність ПОЛ міцелію чи КФ

розраховували за формулою (Chayka et al., 2014; Fedotov, 2016):

$$A_c(A_i) = \frac{(E_{532} - E_{590}) \cdot 10^6 \cdot V \cdot K}{1,56 \cdot 10^5 \cdot P}$$

де E_{532} і E_{590} – показники екстинкції, V – об'єм реакційної суміші (мл), K – коефіцієнт перерахунку на АСБ міцелію, 10^6 – фактор розмірностей, $1,56 \cdot 10^5$ – молярний коефіцієнт екстинкції, P – наважка сирого міцелію (г) або об'єм КФ (мл). Кількість у мікологічному матеріалі продуктів ПОЛ, активних до ТБК (ТБК-АП) виражали у нмоль/г АСБ або нмоль/мл КФ.

За отриманими значеннями A_c і A_i розраховували показник прооксидантної активності (ПОА – характеризує активність прооксидантної складової прооксидантно-антиоксидантної системи) та показник резерву субстратів перекисного окиснення (СПО, який вказує на можливість індукції ПОЛ за дії факторів середовища) за формулами (Chayka et al., 2014; Fedotov, 2016):

$$ПОА = \frac{A_c}{A_i}, \quad СПО = \frac{A_i - A_c}{A_i} \cdot 100 \% .$$

На останньому етапі розраховували коефіцієнт рівноваги прооксидантно-антиоксидантної системи (КРПАС) за формулою (Chayka et al., 2014; Fedotov, 2016):

$$K_{РПАС} = \frac{АОА}{ПОА} .$$

Культивування штамів проводили у триразовій повторності. Статистичну обробку експериментальних даних проводили з використанням пакета програм для проведення статистичної обробки результатів біологічних експериментів. Різницю між даними вважали достовірною за $P < 0,05$ (Prisedskiy, 1999).

Результати

Прооксидантна активність. Показники прооксидантної активності міцелію (рис. 1) та культурального фільтрату (рис. 2) досліджених штамів мають індивідуальні значення та характеризуються такими ознаками.

ПОА міцелію переважної більшості штамів на 9-ту та 12-ту добу культивування перебуває в межах від 0,15 (штам F-610, 9 ДК) до 0,51 (штам Dq-08, 12 ДК). Виняток – штам P-citr, P-089, P-er та P-082 роду *Pleurotus*, активність прооксидантної складової ПАС міцелію на 9-ту добу культивування яких має найвищі значення $0,96 \pm 0,21$, $0,71 \pm 0,14$, $0,61 \pm 0,16$ та $0,58 \pm 0,23$, відповідно. Цікаво відмітити в цій групі штам P-447, ПОА міцелію якого на 12-ту добу перевищує цей показник на 9-ту добу культивування та дорівнює $0,55 \pm 0,19$.

Активність прооксидантної складової прооксидантно-антиоксидантної системи в культуральному фільтраті вища за цей показник у міцелії. За найвищими значеннями на 12-ту добу культивування виділяються штамми P-089 ($0,99 \pm 0,17$) роду *Pleurotus* і Gl-2 ($0,97 \pm 0,14$) роду *Ganoderma*. Далі, в порядку зменшення ПОА КФ ідуть штамми F-107, P-035, 960. Найнижчі значення ПОА КФ зафіксовані на 12-ту добу культивування штаму F-104 ($0,26 \pm 0,19$) роду *Flammulina*.

Узагальнюючи отримані експериментальні дані, треба відмітити, що для всіх досліджених штамів базидіоміцетів характерне значне переважання активності прооксидантної складової ПАС у культуральному фільтраті порівняно з цим показником міцелію. Найвищі значення ПОА КФ відмічаються на 12-ту добу культивування штаму P-089 роду *Pleurotus* і штаму Gl-2 роду *Ganoderma*, а міцелію – на 9-ту добу культивування штамів P-citr, P-089, P-er та P-082 роду *Pleurotus*. Зареєстровано пряму залежність між показниками ПОА і КФ міцелію кожного штаму, ця залежність та рівень показника не відображають їх систематичного положення.

Резерв субстратів перекисного окиснення. На наступному етапі розраховували резерв субстратів перекисного окиснення (СПО), до яких переважно входять ліпідні сполуки, зокрема поліненасичені жирні кислоти. Його рівень вказує на можливість індукції процесу ПОЛ за дії різних факторів. За рівнем СПО міцелію (рис. 3) досліджені штамми умовно поділяються на три групи. До першої належать п'ять штамів (P-087, P-082, P-081, P-12k, P-192) роду *Pleurotus* із низькими значеннями резерву СПО. Тобто для міцелію цих штамів характерна висока інтенсивність процесів ПОЛ із залученням більшості доступних субстратів. До другої групи можна віднести чотири штамми (F-112, F-2, F-204, F-vv) роду *Flammulina* та три штамми P-01, P-105, P-107 роду *Pleurotus* із помірними значеннями показника резерву СПО. Міцелій цих штамів вирізняється помірною інтенсивністю процесів ПОЛ у застосованих умовах культивування. Переважна більшість (45 штамів) складає третю групу та характеризується високими значеннями показника резерву СПО. Для міцелію цих штамів характерна низька інтенсивність процесів ПОЛ із залученням незначної кількості доступних субстратів та, ймовірно, високим вмістом АО. Найвищі значення резерву СПО міцелію зафіксовані у восьми штамів (P-447, P-998, P-039, P-94, P-2175, P-citr, P-er, D-140) роду *Pleurotus* та двох штамів (F-107, F-610) роду *Flammulina*.

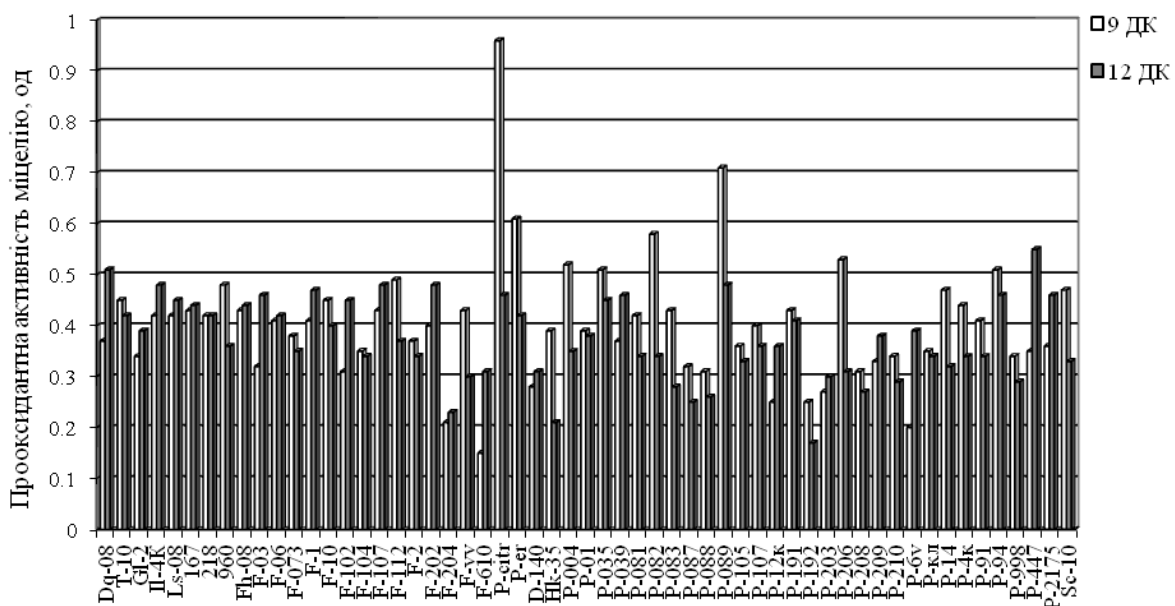


Рис. 1. Прооксидантна активність міцелію штамів на 9-ту (9 ДК) та 12-ту (12 ДК) добу культивування ($n = 3$)

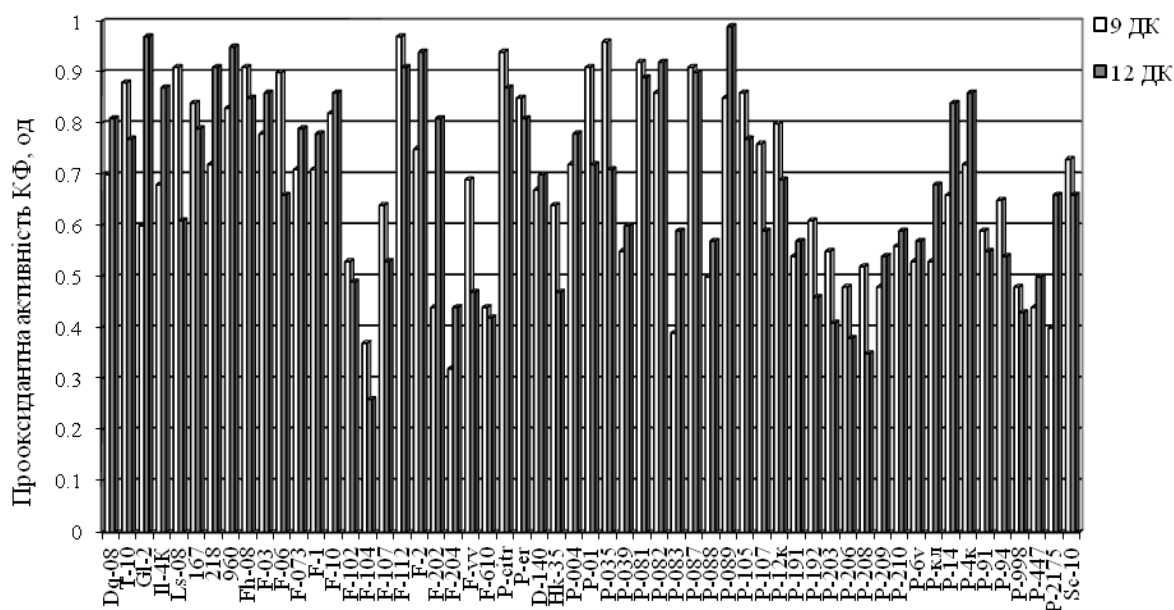


Рис. 2. Прооксидантна активність культурального фільтрату штамів на 9-ту (9 ДК) та 12-ту (12 ДК) добу культивування (n = 3)

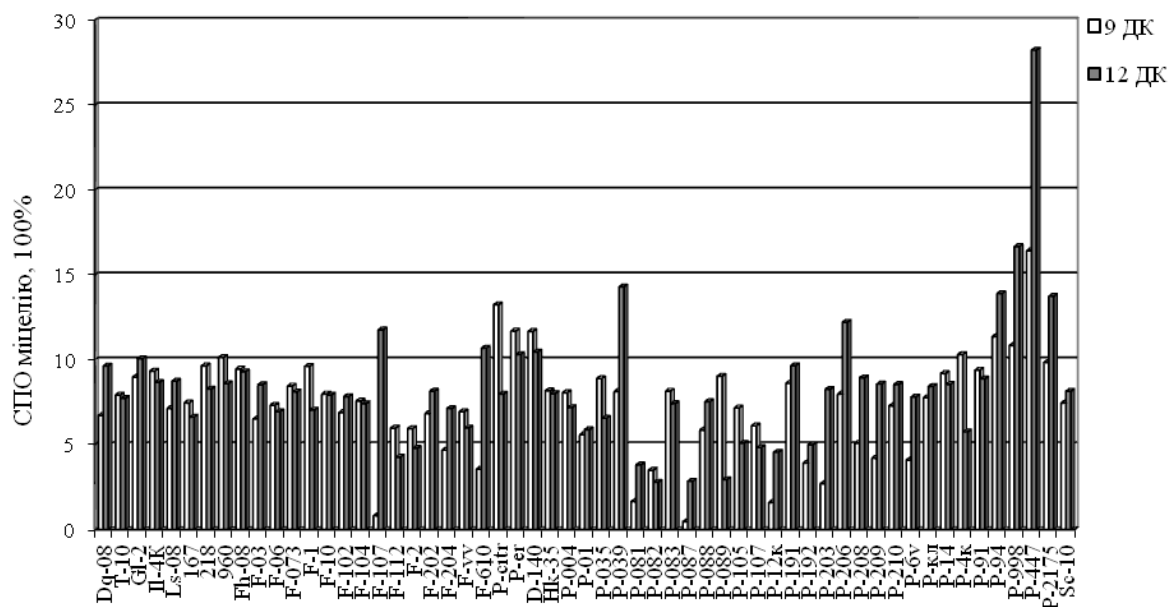


Рис. 3. Показник резерву субстратів перекисного окиснення міцелію штамів на 9-ту (9 ДК) та 12-ту (12 ДК) добу культивування (n = 3)

Резерв субстратів перекисного окиснення КФ (рис. 4) значно нижчий за цей показник міцелію. Отримані результати СПО культурального фільтрату можна поділити на дві групи. До першої, зі значеннями показника резерву СПО до 50%, належать 46 штамів. Найнижчі показники СПО зафіксовано для КФ штамів F-112, P-087, P-082 та P-081. У другу, поліморфну, групу можемо віднести 11 штамів із високими значеннями показника резерву СПО (F-104, F-204, P-208, P-206, P-2175, P-203, F-610, P-998, F-202, F-vv, Нк-35). Для КФ цих штамів властива низька інтенсивність процесів ПОЛ і порівняно висока антиоксидантна активність (АОА).

Підсумовуючи отримані на цьому етапі дані, зазначимо виявлену для переважної більшості штамів суттєву перевагу показників резерву субстратів перекисного окиснення міцелію над таким показником КФ. Найвищі значення резерву СПО міцелію зафіксовані для 8 штамів (P-447, P-998, P-039, P-94, P-2175, P-citr, P-er, D-140) роду *Pleurotus* та двох штамів (F-107, F-610) *Flammulina*. Названі штами перспективні для застосування в індикації певних біотехнологічних процесів чи екологічному тестуванні.

Коефіцієнт рівноваги прооксидантно-антиоксидантної системи. Цей показник відображає співвідношення значень активності антиоксидантної та прооксидантної систем. За переважання останньої (під час посилення неконтрольованих реакцій вільнорадикального окиснення) значення КРПАС мають тенденцію до зниження. У разі зростання активності захисних систем (у тому числі антиоксидантної) показники КРПАС зростають до порівняно високих значень.

Зіставлення коефіцієнтів рівноваги ПАС міцелію та КФ досліджених штамів базидіоміцетів на 9-ту добу культивування (рис. 5) дозволяє поділити їх на три групи. До першої входять п'ять штамів (F-202, F-204, P-083, P-12k, P-206) з однаковими в межах штаму значеннями КРПАС міцелію та КФ. До другої – п'ять штамів роду *Pleurotus* (P-081, P-082, P-087, P-203, P-209) із вірогідно вищими значеннями КРПАС КФ. Найбільша, третя група, об'єднує 47 штамів із вірогідно вищими значеннями КРПАС 9-добового міцелію. Максимальні значення коефіцієнтів рівноваги ПАС міцелію в цій групі зафіксовані для п'яти штамів: T-10 (*F. fomentarius*) та D-140, P-035, P-01 та P-105 (*P. ostreatus*). Ці штами вирізняються ви-

соким рівнем АОА міцелію на 9-ту добу культивування та можуть бути рекомендовані як продуценти антиокисних речовин.

Подовження терміну культивування до 12 діб (рис. 6) підтверджує виявлену для переважної більшості штамів тенденцію до переважання значень коефіцієнтів рівноваги ПАС міцелію над такими КФ. Із цієї групи, що складається з 54 штамів, треба відзначити п'ять: Sc-10 (*S. commune*), P-кл, P-14 (*P. ostreatus*), P-er (*P. eryngii*) та 960 (*A. cylindracea*). Названі штами вирізняються найвищими серед зафіксованих значеннями коефіцієнтів рівноваги ПАС 12-добового міцелію. Вони доповнюють групу штамів із високим рівнем АОА міцелію на 9-ту добу культивування, а також можуть бути рекомендовані як продуценти антиокисних речовин. Треба зауважити, що групи з однаковими та переважаю-

чими у КФ значеннями КРПАС на 12-ту добу культивування зменшилися до одного штаму F-102 та двох F-1, F-104 (*F. velutipes*), відповідно. Узагальнюючи результати розрахунків цього етапу досліджень, зазначимо, що для переважної більшості штамів характерне переважання коефіцієнтів рівноваги ПАС міцелію над такими КФ. Максимальні коефіцієнти рівноваги ПАС 9-добового міцелію зафіксовані для штамів T-10 (*F. fomentarius*) і D-140, P-035, P-01, P-105 (*P. ostreatus*), 12-добового – для штамів Sc-10 (*S. commune*), P-кл, P-14 (*P. ostreatus*), P-er (*P. eryngii*) і 960 (*A. cylindracea*). Названі штами вирізняються високими значеннями КРПАС і рівнем АОА міцелію на встановлену добу культивування та можуть бути рекомендовані як продуценти антиокисних речовин.

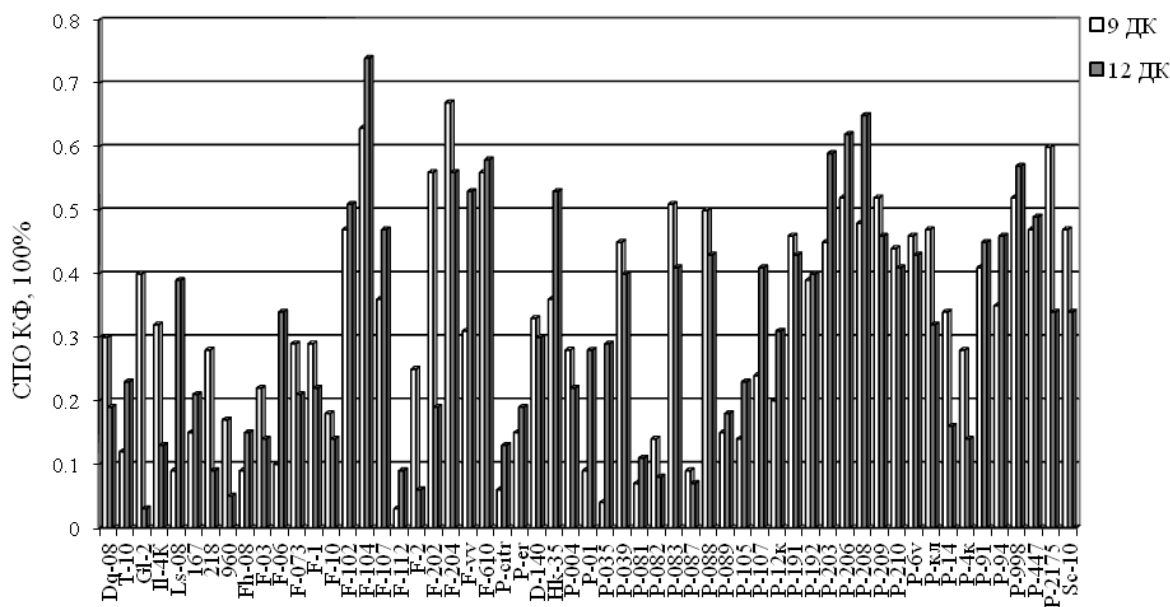


Рис. 4. Показник резерву субстратів перекисного окиснення КФ штамів на 9-ту (9 ДК) та 12-ту (12 ДК) добу культивування (n = 3)

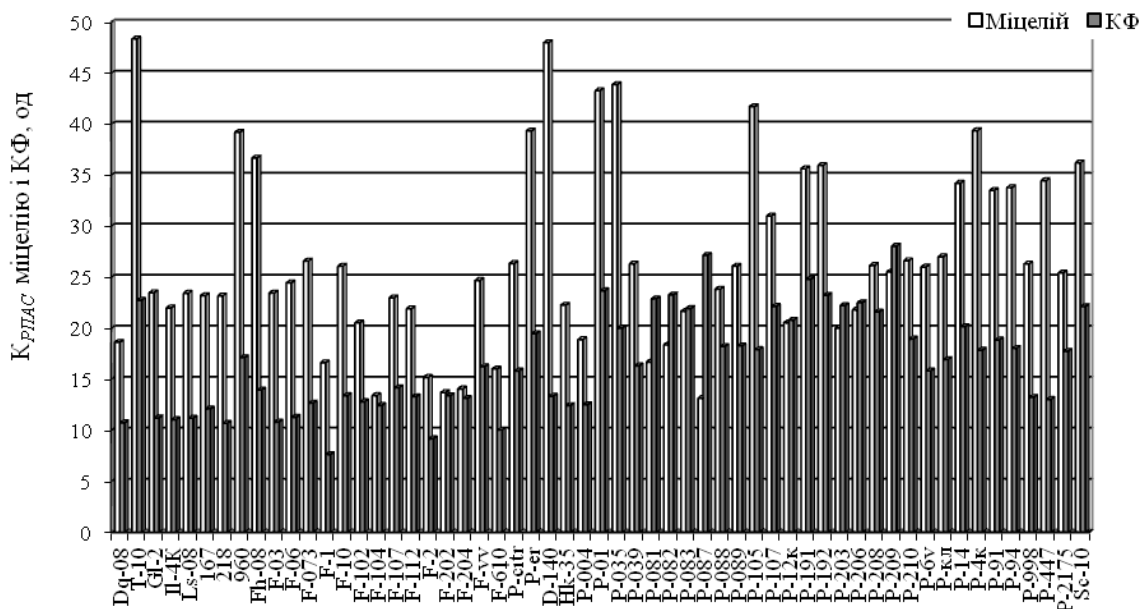


Рис. 5. Коефіцієнт рівноваги прооксидантно-антиоксидантної системи міцелію та КФ штамів на 9-ту добу культивування (n = 3)

Обговорення

У попередніх дослідженнях (Voloshko et al., 2011; Velygodska et al., 2016) встановлено динаміку зростання, загальної антиоксидантної активності, рівня самочинної та індукованої інтенсивності процесів перекисного окиснення ліпідів 57 штамів базидіомікотових грибів за їх поверхневого періодичного куль-

тивування на глюкозо-пептонному середовищі (Fedotov, 2016). Отримані дані лягли в основу розрахунку та порівняння показників стану прооксидантно-антиоксидантної системи в динаміці росту цих штамів, дозволили виявити певні закономірності реєстрованих показників і з'ясувати перспективи використання досліджених культур. Значне переважання активності прооксидантної складової ПАС у культуральному фільтраті порівняно з

цим показником міцелію на 12-ту добу культивування штаму P-089 роду *Pleurotus* і штаму Gl-2 роду *Ganoderma*, а міцелію – на 9-ту добу культивування штамів P-citr, P-089, P-er та P-082

роду *Pleurotus* може бути використане під час оцінювання придатності складу живильних середовищ, розроблення способів деструкції хімічно стійких сполук, моніторингу довкілля.

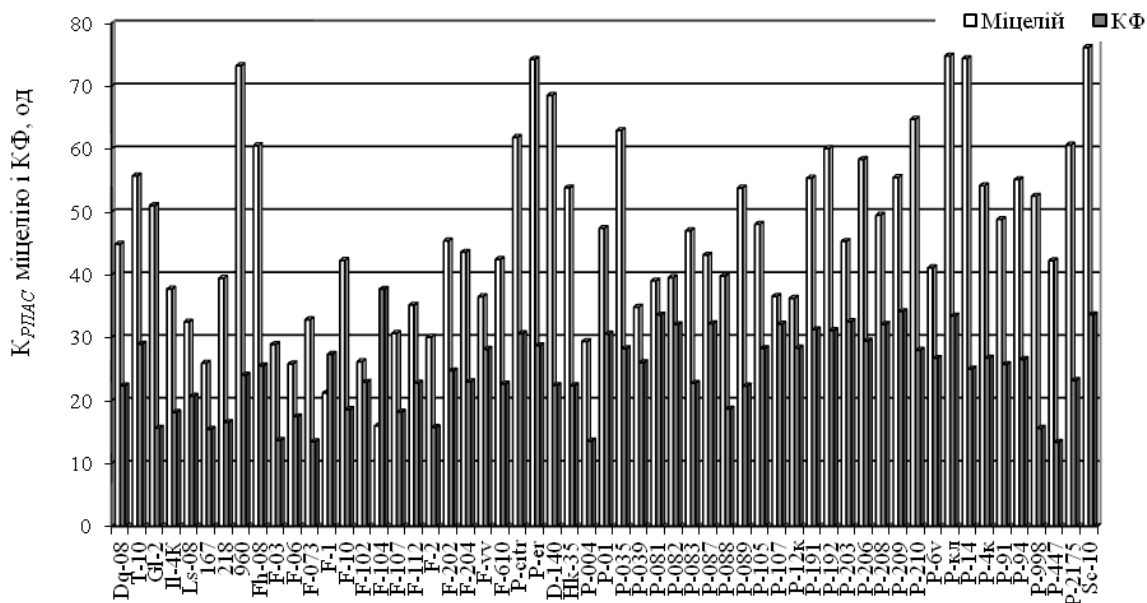


Рис. 6. Коефіцієнт рівноваги прооксидантно-антиоксидантної системи міцелію і КФ штамів на 12-ту добу культивування

Перспективні для застосування в індикації певних біотехнологічних процесів чи екологічному тестуванні штами P-447, P-998, P-039, P-94, P-2175, P-citr, P-er, D-140 роду *Pleurotus* та штами F-107, F-610 роду *Flammulina*, для яких зафіксовані найвищі значення резерву субстратів перекисного окиснення міцелію. На біосинтетичні перспективи використання поодиноких штамів (Gl-2, P-er, P-039, F-610) вказують результати окремих скринінгових досліджень (Voloshko et al., 2011; Chayka et al., 2014; Velyhodska et al., 2016).

Висновки

Для штамів властиве переважання активності прооксидантної складової ПАС у культуральному фільтраті порівняно з цим показником міцелію. Найвищі значення прооксидантної активності КФ відмічено на 12-ту добу культивування штаму P-089 роду *Pleurotus* і штаму Gl-2 роду *Ganoderma*, а міцелію – на 9-ту добу культивування штамів P-citr, P-089, P-er та P-082 роду *Pleurotus*. Наявна пряма залежність між показниками ПОА КФ і міцелію кожного штаму. Ця залежність та рівень показника не відображають їх систематичного положення.

Виявлено суттєву перевагу показників резерву субстратів перекисного окиснення міцелію більшості штамів над таким показником КФ. Найвищі значення резерву СПО міцелію зафіксовані для штамів P-447, P-998, P-039, P-94, P-2175, P-citr, P-er, D-140 роду *Pleurotus* та штамів F-107, F-610 роду *Flammulina*.

Для переважної більшості штамів характерне переважання коефіцієнтів рівноваги ПАС міцелію над такими КФ. Максимальні значення коефіцієнтів рівноваги ПАС 9-добового міцелію зафіксовано для штамів T-10 (*F. fomentarius*) і D-140, P-035, P-01, P-105 (*P. ostreatus*), а 12-добового – для штамів Sc-10 (*S. commune*), P-кл, P-14 (*P. ostreatus*), P-er (*P. eryngii*) і 960 (*A. cylindracea*). Названі штами вирізняються високим рівнем АОА міцелію на певну добу культивування та можуть бути рекомендовані як продуценти антиоксидантів грибного походження.

Подяки

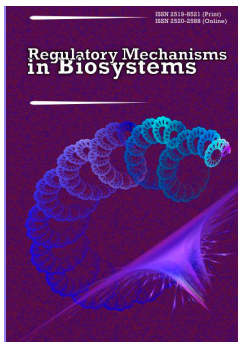
Висловлюємо щирі подяки науковим співробітникам відділу мікології Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України за співпрацю, надані матеріали Колекції культур

шапинкових грибів (ІВК), що має статус Національного надбання України.

References

- Al-Maali, G. A., Bisko, N. A., & Ostapchuk, A. M. (2016). The effect of citrate and sulfate of copper on the biomass composition of the medicinal mushroom *Trametes versicolor* (Polyporales, Polyporaceae). *Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Ecology*, 24(1), 119–123.
- Asatiani, M. D., Elisashvili, V., Songulashvil, G., Reznick, A. Z., & Wasser, S. P. (2010). Higher basidiomycetes mushrooms as a source of antioxidants. In: M. Rai, G. Kövics (Eds). *Progress in Mycology*. P. 311–326.
- Bitto, A., Sell, C., Crowe, E., Lorenzini, A., Malaguti, M., Hrelia, S., & Torres, C. (2010). Stress-induced senescence in human and rodent astrocytes. *Experimental Cell Research*, 316, 2961–2968.
- Chang, S. T. (2001). A 40-year journey through bioconversion of lignocellulosic wastes to mushrooms and dietary supplements. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 3, 299–310.
- Chayka, O. V., & Fedotov, O. V. (2014). Otsinka ekolohichnoho stanu dovkillya z vykorystannam prooksydantno-antyoksydantnoyi aktyvnosti kul'tur bazydiomitsetiv [The ecology estimation of environment state using prooxidant-antioxidant activity of Basidiomycetes cultures]. *Bioresursy i Pryrodokorystuvannya*, 6, 5–11 (in Ukrainian).
- Cherubini, A., Ruggiero, C., Morand, C., Lattanzio, F., Dell'aquila, G., Zuliani, G., Di Iorio, A., & Andres-Lacueva, C. (2008). Dietary antioxidants as potential pharmacological agents for ischemic stroke. *Current Medicinal Chemistry*, 15, 1236–1248.
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82, 47–95.
- Dudka, Y. A., Wasser, S. P., & Ellanskaya, Y. A. (2003). *Metody eksperimental'noy mikologii* [Methods of experimental mycology]. Naukova Dumka, Kyiv (in Russian).
- Egorova, A. S., Gessler, N. N., Ryazanova, L. P., Kulakovskaya, T. V., & Belozerskaya, T. A. (2015). Stress resistance mechanisms in the indicator fungi from highly radioactive Chernobyl Zone sites. *Mikrobiologiya*, 84(2), 152–158.
- Eriksson, K. E. L., Blanchette, R. A., & Ander, P. (1990). *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*. Springer-Verlag, Berlin.
- Fedotov, O. V. (2016). The lipid peroxidation intensity of fungi strains from the orders Agaricales and Polyporales. *Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Ecology*, 24(2), 317–323.
- Fedotov, O. V. (2016). Total antioxidant activity of some Basidiomycetes strains in growth dynamic. *Biological Bulletin of Bogdan Chmelnytskyi Melitopol State Pedagogical University*, 6(2), 158–165.
- Fedotov, O. V., Chayka, O. V., Voloshko, T. E., & Velyhodska, A. K. (2012). Kolektsiya kul'tur shapynkovykh hrybiv – osnova mikolohichnykh doslidzhen' ta stratehiyi zberezhennya bioriznomanityta bazydiomitsetiv

- [Culture Collection of mushrooms – the basis of mycological research and biodiversity conservation strategies Basidiomycetes]. *Visnyk Donets'koho Universytetu*, 1, 209–213 (in Ukrainian).
- Fruehauf, J. P., & Meyskens, F. L. (2007). Reactive oxygen species: A breath of life or death? *Clinical Cancer Research*, 13(1), 789–794.
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141, 312–322.
- Kapich, A. N. (2010). Oxidizability of unsaturated fatty acids and of a non-phenolic lignin structure in the manganese peroxidase-dependent lipid peroxidation system. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(2), 136–140.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W., & Stalpers, J. A. (2008). *Dictionary of the fungi*. CABI, Wallingford.
- Leonowicz, A., Matuszewska, A., & Luterek, J. (1999). Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 27, 175–185.
- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huyc, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*, 4, 89–96.
- Prisedskiy, Y. G. (1999). Statystychna obrobka rezul'tativ biolohichnykh eksperymentiv [Statistical processing of biological experiments results]. Kassiopoya, Donetsk (in Ukrainian).
- Syrchin, S. A., & Grodzinskaya, A. A. (2015). Evaluation of antioxidant activity of some wild macromycetes. *Ukrainian Botanical Journal*, 72(3), 257–260 (in Ukrainian).
- Velygodska, A. K., & Fedotov, O. V. (2016). The production and analysis of carotenoid preparations from some strains of xylotrophic Basidiomycetes. *Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Ecology*, 24(2), 290–294.
- Voloshko, T. E., & Fedotov, O. V. (2011). Skrynih shtamiv bazydomitsetiv za aktyvnisty antyoksydantnykh oksydoreduktaz [Screening of basidiomycetes strains on the antioxidant activity of oxidoreductases]. *Microbiology and Biotechnology*, 16, 69–81 (in Ukrainian).
- Wasser, S. P. (2010). Medicinal mushroom science: History, current status, future trends, and unsolved problems. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 12(1), 1–16.
- Wasser, S. P. (2011). Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89, 1323–1332.
- Winquist, E., Moilanen, U., & Mettala, A. (2008). Production of lignin modifying enzymes on industrial waste material by solid-state cultivation of fungi. *Biochemical Engineering Journal*, 42, 128–132.



Mutual influence of intensity of pain syndrome and borderline mental disorders in patients with coxarthrosis

I. D. Spirina, E. S. Fedenko, S. V. Rokutov, V. Y. Kazakov, A. V. Shornikov

Dnipropetrovsk Medical Academy of Health Ministry of Ukraine, Dnipro, Ukraine

Article info

Received 12.12.2016

Received in revised form
02.02.2017

Accepted 15.02.2017

*Dnipropetrovsk Medical
Academy of Health Ministry
of Ukraine, V. Vernadskyi Str., 9,
Dnipro, 49044, Ukraine
Tel.: +38-067-104-43-69
E-mail: psychiatry@dma.dp.ua*

Spirina, I. D., Fedenko, E. S., Rokutov, S. V., Kazakov, V. Y., & Shornikov, A. V. (2017). Mutual influence of intensity of pain syndrome and borderline mental disorders in patients with coxarthrosis. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8(1), 84–90. doi: 10.15421/021715

The objective of this study is to evaluate the mutual influence of pain syndrome and borderline psychiatric disorders depending on its intensity and tolerability in patients with coxarthrosis who need endoprosthetics. 76 patients with coxarthrosis aged from 25 to 68 who were hospitalized in the Department of Endoprosthetics at Mechnikov Regional Clinical Hospital in Dnipro City in the period from November 2015 to September 2016 were observed. For diagnosis of psychopathological disorders, and for evaluation of the effectiveness of therapeutic interventions, the following methods were used in our research: clinical and psychopathological (technique SCL-90-R), Taylor anxiety scale, study of the type of attitude to the disease (LOBI), Dembo-Rubinstein self-esteem scale, Leonhard-Schmieschek questionnaire for assessment of accentuation of personality traits, the Luscher 8-colour test and the Toronto alexithymia scale (TAS). Severity of pain syndrome was assessed using a visual analogue scale of pain (VAS). Forms of borderline mental disorders were diagnosed in 51 patients with coxarthrosis, such as depressive disorder (F 32) – 19 (24.8%), neurasthenia (F 48) – 12 (16.2%), anxiety and phobic disorders (F 40–41) – 14 (18.1%), and personality disorders (F 60.5, F 60.6, F 60.7) – 6 (7.6%). In 25 (33.3%) patients clinically-defined forms of mental disorders were identified. Leading syndromes in these disorders were depression – 19 (24.8%) patients, anxiety and phobic – 15 (20.0%), asthenic – 10 (12.4%), hypochondriacal – 7 (9.5%) patients. According to the results of the correlation analysis, a close correlation between the severity of pain syndrome and borderline mental disorders ($r = 0.779$) was established for patients in the preoperative stage. The average level of pain syndrome on the VAS scale in patients with borderline mental disorders was twice as high as in patients without these disorders (63.4 vs. 32.4 points), but it does not depend on the main psychopathological syndrome. The average level of pain on the VAS scale in patients with borderline mental disorders at the preoperative stage was twice as high as in patients without these disorders (63.4 vs 32.4 points), and after surgical intervention the level decreased only by 5.9 points or 9.3%. In patients with coxarthrosis with detected borderline mental disorders (51 people) the therapy had a complex character and was conducted both at the hospital stage for one month, and in the outpatient stage as "maintenance" therapy for 3 months or more. Therapy of the neurotic state with decompensation lasted on average 6 months. Treatment included psycho-educational and therapeutic arrangements (conversations, lectures, autotraining) and psychopharmatherapy (tranquilizers, antidepressants, antipsychotics in small and medium therapeutic doses). The conducting of simultaneous corrective measures for identified borderline mental disorders in patients of the main groups contributed to a significant reduction in the severity of pain within the six-month period of observation and moved them towards the level of the patients in the control group. Borderline mental disorders that take place in patients with chronic somatic diseases, which include, in particular, coxarthrosis, significantly amplify the severity of the condition, reduce the possibility of adaptation, and thus aggravate the course and the outcome of the main disease.

Keywords: pain; nonpsychotic mental disorders; coxarthrosis; psychopathological disturbances

Взаємовплив інтенсивності больового синдрому та граничних психічних розладів у хворих на коксартроз

І. Д. Спіріна, Є. С. Феденко, С. В. Рокутов, В. Є. Казаков, А. В. Шорніков

Державний заклад «Дніпропетровська медична академія» МОЗ України, Дніпро, Україна

Оцінено взаємовплив больового синдрому та граничних психічних розладів залежно від його інтенсивності та переносимості у хворих на коксартроз, які потребують ендопротезування тазостегнового суглоба. Спостерігали 76 хворих на коксартроз віком 25–68 років, які перебували на стаціонарному лікуванні у відділенні ендопротезування обласної клінічної лікарні ім. І. І. Мечникова м. Дніпро у період із листопада 2015 по вересень 2016 року. Для діагностики психопатологічних розладів і оцінювання ефективності лікувальних заходів у

роботі застосовано такі методи: клініко-психопатологічний (методика SCL-90-R), шкала тривоги Тейлора, дослідження типу ставлення до хвороби (ЛЮБИ), шкала самооцінки Дембо – Рубінштейн, опитувальник Леонгарда – Шмішека, 8-колірний тест Люшера, Торонтська алекситимічна шкала (TAS). Вираженість больового синдрому оцінювалась за допомогою візуально-аналогової шкали болю (ВАШ). Під час дослідження у 51 хворого на коксартроз діагностовано такі форми граничних психічних розладів як депресивний розлад (F 32) – 19 (24,8%), неврастенія (F 48) – 12 (16,2%), тривожні та фобічні розлади (F 40–41) – 14 (18,1%), розлади особистості (F 60.5, F 60.6, F 60.7) – 6 (7,6%). У 25 (33,3%) пацієнтів клінічно окреслених форм психічних розладів не виявлено. Провідні синдроми при цих розладах: депресивний – 19 хворих (24,8%), тривожно-фобічний – 15 (20,0%), астенічний – 10 (12,4%), іпохондричний – 7 пацієнтів (9,5%). За результатами кореляційного аналізу встановлено тісну кореляцію вираженості больового синдрому з наявністю граничних психічних розладів ($r = 0,779$) на передопераційному етапі. Середній рівень больового синдрому за ВАШ у хворих із граничними психічними розладами вдвічі вищий, ніж у пацієнтів без цих порушень (63,4 проти 32,4 бала), але не залежав від провідного психопатологічного синдрому. Середній рівень інтенсивності болю за ВАШ у хворих із виявленими граничними психічними розладами на передопераційному етапі був удвічі вищий, ніж у пацієнтів без цих порушень (63,4 проти 32,4 бала), а після оперативного втручання показник зменшився лише на 5,9 бала, або 9,3%. Одночасне проведення корекційних заходів щодо виявлених граничних психічних розладів у хворих основної групи дозволило вже до шестимісячного строку спостереження суттєво зменшити вираженість больового синдрому та наблизити їх до рівнів пацієнтів контрольної групи. Граничні психічні порушення у хворих із тривалими соматичними захворюваннями, до яких, зокрема, належить коксартроз, суттєво посилюють тяжкість стану, знижують адаптаційні можливості, обтяжуючи перебіг і результат основного захворювання.

Ключові слова: біль; психічні розлади; коксартроз; психопатологічні розлади

Вступ

Тазостегновий суглоб – найважливіший елемент опори та пересування людини у просторі, що має широкі функціональні можливості, випробує значні статичні та динамічні навантаження та забезпечує гармонійність рухів людини (Loskutov, 2010). Дегенеративно-дистрофічні захворювання суглобів (остеоартроз, артроз, остеоартрит) належать до найпоширеніших форм ураження опорно-рухового апарату у дорослого населення багатьох країн, включно з Україною (Loskutov, 2010; Nasonova et al., 2011; Zagorodniy, 2011; Ackerman et al., 2017). Остеоартроз посідає провідну позицію серед усіх ревматичних захворювань (60–70%), а його клінічні симптоми спостерігаються у 10–20% дорослого населення (Poulsen et al., 2012; Cho et al., 2015).

Найбільш доказовими факторами ризику розвитку та прогресування остеоартрозу вважають вік, жіночу стать, надлишкову масу тіла, обтяжену спадковість (Tukker et al., 2008; Lawrence et al., 2008; Nasonova et al., 2011; Hardcastle et al., 2014; Ke et al., 2015). Серед хворих на остеоартроз у молодому віці переважають чоловіки, у похилому – жінки. Захворювання зазвичай маніфестує в осіб віком понад 40 років та виявляється у 30–40% осіб віком до 65 років і у 50–90% – понад 65 років (Makolkina et al., 2007; Sharma and Berenbaum, 2007). Останні роки характеризуються тенденцією до зростання захворюваності на остеоартроз як у результаті загального постаріння населення, так і за рахунок розвитку захворювання в осіб молодше 45 років.

Значне поширення дегенеративно-дистрофічних захворювань серед дорослого населення та їх прогресуючий перебіг спричиняють втрату працездатності, а також передчасну інвалідність, що перетворює медичну реабілітацію таких хворих на важливу проблему охорони здоров'я (Loskutov, 2010). Соціальна значущість остеоартрозу зумовлена такими характеристиками захворювання: хронічним прогресуючим перебігом, рецидивуючим больовим синдромом, наростаючим обмеженням рухової функції та свободи пересування, необхідністю проведення тривалого (нерідко довічного) високовартісного лікування (Loskutov, 2010; Nasonova et al., 2011; Mújica Mota, 2013). Причому соціальні аспекти захворювання з розвитком цивілізації, урбанізації й технічним прогресом усе більше зростають, а групи ризику серед населення збільшуються, чому сприяє хронічний стрес, погіршення екології, аутоімунні реакції, гіподинамія тощо. За даними американських дослідників, очікується, що в наступні два десятиліття захворюваність на остеоартроз збільшиться більше ніж удвічі (Lawrence et al., 2008). Прогнозоване до 2020 року збільшення тривалості життя населення Землі висуває остеоартроз на четверте місце серед провідних причин втрати працездатності населення (Zagorodniy, 2011).

Коксартроз (КА) – хронічне прогресуюче захворювання тазостегнового суглоба – визнаний найважчою формою остеоартрозу та серйозною медико-соціальною проблемою у зв'язку зі значним поширенням хвороби серед осіб працездатного віку, втратою професійних і соціальних навичок, значною

інвалідизацією хворих, неминучим зниженням якості життя (Loskutov, 2010; Zagorodniy, 2011). За даними вітчизняної та зарубіжної літератури, КА посідає перше місце серед аналогічних захворювань інших великих суглобів (Loskutov, 2010). На захворювання даної локалізації страждають 30–50% хворих остеоартрозом (Zagorodniy, 2011), 3–5% усього населення (Zagorodniy, 2011; Cho et al., 2015), а інвалідність становить 7,0–37,6% кількості всіх інвалідів з ураженнями опорно-рухової системи (Duffy et al., 2005). В Україні серед хворих, що вперше звернулись до медико-соціальної експертної комісії (МСЕК) для встановлення групи інвалідності у зв'язку з патологією опорно-рухового апарату, пацієнти з КА складають близько 35% (Chaban and Khaustova, 2010).

Біль виступає першим і основним симптомом захворювання, входить до діагностичних критеріїв остеоартрозу основних локалізацій – кисті, тазостегнового та колінного суглобів (Chong et al., 2013; Rahman et al., 2016). Міжнародна асоціація з вивчення болю (IASP) визначає його як «неприємне сенсорне й емоційне переживання, пов'язане з істинним або потенційним пошкодженням тканини або описуване у термінах такого пошкодження» (Rebrov et al., 2011). Це свідчить, що відчуття болю може виникати навіть за відсутності будь-якого пошкодження, але описуватися пацієнтом як відчуття пошкодження. Тобто біль завжди суб'єктивний, що вказує на важливу роль психічних чинників у формуванні та підтриманні болю. Саморегуляція болю та його вплив на організм багато в чому залежать від того, як саме люди справляються з болем, адаптуються до нього та мінімізують стрес, зумовлений болем, тобто від їх стратегій психофізіологічної адаптації (Bair et al., 2008; Muncie and Stewart, 2007).

Гострий і хронічний біль потрібно розглядати як найактуальнішу проблему охорони здоров'я. Гострий біль звичайно вказує на конкретну проблему чи загрозу для життя, у той час як хронічний біль є в усіх випадках патологічним станом, який викликає дезадаптацію та зниження якості життя пацієнта (Danilov et al., 2010). Загальновизнані факти, що виражені психопатологічні зміни часто супроводжують хронічний больовий синдром. Доведено також участь цих змін у патогенезі больового синдрому та їх негативний вплив на ефективність лікування (Chaban and Khaustova, 2010; Rebrov et al., 2011). Для хронічного болю характерні зміни симпатичної активності й розвиток стійких вегетативних симптомів, у тому числі зниження апетиту, загальне нездужання, розлади сну, роздратованість, а його психологічні складові часто характеризуються депресією, страхом та іншими афективними розладами (Muncie and Stewart, 2007; Rebrov et al., 2011).

Найпоширенішими психічними розладами, що часто поєднуються із соматичними хворобами, вважають тривогу та депресію (Strine et al., 2008; Beltman et al., 2010; O'Connor et al., 2015; Bokma et al., 2017). Зокрема, серед хворих на остеоартроз похилого віку (старше 60 років) поширеність депресивних синдромів дуже висока (82,4%) (Sale et al., 2008; Hawker et al.,

2011; Matcham et al., 2014; Rodic et al., 2015). При цьому можливі як соматопсихічні, так і психосоматичні взаємовідносини між цими захворюваннями. Маючи спільні ланки патогенезу на тлі зниженого індивідуального адаптаційного бар'єру до впливу різноманітних психогенних факторів, соматичне захворювання може бути безпосередньою причиною тривожно-депресивних розладів або прискорювати їх розвиток. Так само як і високий рівень тривожності та депресія супроводжуються вираженими порушеннями функції органів та систем організму, негативно впливають на перебіг соматичної хвороби, порушуючи суб'єктивне сприйняття хворим її динаміки та знижуючи ефективність лікувально-реабілітаційних заходів (Riediger et al., 2010; Sharma et al., 2016).

За даними численних досліджень, депресія поєднується із хронічним болем у 11–50% випадків і супроводжується посиленням болю, зниженням якості життя, підвищенням інвалідності та вартості лікування (Munce and Stewart, 2007; Bair et al., 2008; Calvo-Lobo et al., 2017). При цьому як депресія, так і хронічний біль у жінок спостерігаються частіше, ніж у чоловіків (Bair et al., 2008; Tonelli et al., 2011). Субклінічні прояви депресії у хворих із хронічним болем зумовили відповідну термінологію: «прихована», «маскована», «ларвована», «атипова», «алекситимічна» тощо. Деякі автори вважають, що в усіх випадках хронічного больового синдрому має місце депресія. Вони ґрунтуються на тому факті, що біль завжди супроводжується негативно-емоційними переживаннями та блокує можливість людини одержувати радість і задоволення (Chaban and Khaustova, 2010). Найбільші суперечки викликає не сам факт співіснування хронічного болю з депресією, а причинно-наслідкові відносини між ними. Тривалий біль обмежує професійні й особистісні можливості людини, примушує її відмовлятися від звичних життєвих стереотипів, порушує її життєві плани тощо. У свою чергу, зниження якості життя сприяє формуванню вторинної депресії. Встановлено, що у пацієнтів із хронічним болем і депресією біль має більшу інтенсивність і зберігається довше після операції з ендопротезування ураженого суглоба. Такі хворі частіше використовують пасивні стратегії подолання болю, мають низьку самооцінку та нижчу якість життя (Bair et al., 2008).

Діагностика психопатологічних порушень у пацієнтів із соматичними захворюваннями, включно з тими, що супроводжуються хронічним больовим синдромом, у наш час базується на використанні біопсихосоціальної моделі. На відміну від біомедицинської моделі, яка робить акцент тільки на захворюванні, біопсихосоціальна модель фокусується і на захворюванні, і на розладі, на комплексній взаємодії біологічних, психологічних і соціальних змінних (Chaban and Khaustova, 2010; Rebrov et al., 2011). Біологічні чинники можуть ініціювати, підтримувати та модулювати фізичні порушення, тоді як психологічні змінні впливають на оцінку та сприйняття внутрішніх фізіологічних ознак, а соціальні чинники формують поведінкові реакції пацієнтів на переживання фізичних порушень. На різних стадіях прогресування захворювання або розладу відносна важливість фізичних, психологічних і соціальних чинників може змінюватися. Проте жоден окремо взятий чинник не може вважатися винятковою причиною глибокої особистісної декомпенсації. Лише їх спільна дія зумовлює злам біологічної, індивідуально-психологічної та соціальної ланок адаптації (Bair et al., 2008), що стає причиною психічного розладу.

Мета дослідження – оцінка взаємовпливу больового синдрому та граничних психічних розладів залежно від його інтенсивності та переносимості у хворих на коксартроз, які потребують ендопротезування тазостегнового суглоба.

Матеріал і методи досліджень

Ми спостерігали 76 хворих на коксартроз (КА) у віці 25–68 років, які перебували на стаціонарному лікуванні у відділенні ендопротезування обласної клінічної лікарні ім. І. І. Меч-

никова м. Дніпро у період із листопада 2015 по вересень 2016 року. Серед обстежених 27 (36,2%) чоловіків і 49 (63,8%) жінок, середній вік – 51,3 року (табл. 1).

Критерії включення пацієнтів у дослідження: хворі на КА віком від 18 років, яким проведено ендопротезування тазостегнового суглоба, інформована згода на участь у дослідженні. Критерії виключення пацієнтів із дослідження: наявність психічних розладів, залежність від психоактивних речовин, онкологічні та дегенеративні захворювання.

Усі пацієнти страждали на КА, що підтверджено відповідними медичними документами. Всім хворим виконано оперативне втручання – ендопротезування тазостегнового суглоба.

Клініко-психопатологічний метод базувався на загальноприйнятих підходах до психіатричного обстеження пацієнтів і включав складові частини дослідження: опитування, зовнішній огляд, спостереження за поведінкою, аналіз об'єктивних ознак розладів або особливостей психічного стану. Відомості, отримані від пацієнта, об'єктивізувалися іншими даними, зокрема інформацією з медичної документації. Установлення діагнозу та верифікація клінічної форми психічного розладу проводились відповідно до критеріїв МКХ-10.

Таблиця 1
Демографічна характеристика пацієнтів із коксартрозом (n = 76)

Показники	Кількість пацієнтів		
	абс.	Р, %	
Стать	чоловіча	27	36,2
	жіноча	49	63,8
Вік, роки	до 40	9	11,4
	41–50	18	23,8
	51–60	30	39,1
	понад 60	19	25,7
	середній, M ± SE	51,3 ± 0,9	

Для діагностики психопатологічних розладів і оцінювання ефективності лікувальних заходів у дослідженні використано симптоматичний опитувальник Symptomatic Check List 90 Revised (SCL-90-R), шкалу тривоги Гейлора, дослідження типу ставлення до хвороби (ЛЮБІ), шкалу самооцінки Дембо – Рубінштейн, опитувальник Леонгарда – Шмішека для оцінювання особистісної акцентуації, 8-колірний тест Люшера, Торонтську алекситимічну шкалу (TAS). Вираженість больового синдрому оцінювали за допомогою візуально-аналогової шкали болю (ВАШ) (0 – біль відсутній, 100 балів – нестерпний біль). Наявність больового синдрому об'єктивізували соматовегетативними проявами, такими як коливання артеріального тиску, прискорене серцебиття, підвищена пітливість.

Результати

За результатами клініко-психопатологічного дослідження та критеріями МКХ-10 у 51 (66,7%) хворого на КА діагностували такі форми граничних психічних розладів (ГПР): депресивний розлад (F 32) – 19 (24,8%), неврастенія (F 48) – 12 (16,2%), тривожні та фобічні розлади (F 40–41) – 14 (18,1%), розлади особистості (F 60.5, F 60.6, F 60.7) – 6 (7,6%). У 25 (33,3%) пацієнтів клінічно окреслених форм психічних розладів не виявили. Провідні синдроми за цих розладів: депресивний – 19 хворих (24,8%), тривожно-фобічний – 15 (20,0%), астенічний – 10 (12,4%), іпохондричний – 7 пацієнтів (9,5%). Провідною клінічною характеристикою у хворих на КА був біль, вираженість якого до оперативного втручання оцінювали в 53,0 ± 1,7 балів за візуально-аналоговою шкалою (ВАШ). Протягом дослідження не виявлено суттєвих зв'язків (P > 0,05) показника ВАШ як із соціально-демографічними характеристиками (стать, вік, освіта, сімейний стан, соціальний статус), так і з основними клінічними характеристиками КА (тривалість захворювання, характер ураження суглоба тощо) в цілому. Деякі відмінності відмічені у віковій групі до 40 років (43,1 ± 4,5 проти 54,3 ± 1,8 бала у решті груп; P < 0,05) (рис. 1а).

За результатами кореляційного аналізу встановили тісну кореляцію між вираженістю больового синдрому та наявністю ГПР ($r = 0,779$; $P < 0,001$) на передопераційному етапі. Середній рівень больового синдрому за шкалою ВАШ у хворих із ГПР удвічі вищий, ніж у пацієнтів без цих порушень ($63,4 \pm 1,3$ проти $32,4 \pm 1,5$ бала; $P < 0,001$), але він не залежить від провідного психопатологічного синдрому. Коливання середнього балу болу склали від $62,0 \pm 2,1$ бала за депресивного синдрому до $65,3 \pm 2,4$ бала за тривожно-фобічного синдрому ($P > 0,40$ для всіх порівнянь між групами за критерієм Дункана) (рис. 1б). Розвиток захворювання може утворити порочне коло:

негативні емоції, пов'язані з болем, збільшують ступінь мимовільної м'язової напруги, що, у свою чергу, посилює больові відчуття. У результаті дослідження встановили, що больовий синдром суттєво посилювався ($P < 0,001$) за підвищеної тривожності ($r = 0,471$), вираженості депресивної симптоматики ($r = 0,529$), астеничних проявів ($r = 0,652$), наявності особистісної акцентуації ($r = 0,611$), переважання неврастенічного ($r = 0,473$), іпохондричного ($r = 0,359$) і тривожного ($r = 0,348$) типів ставлення до хвороби, вираженості алекситимічного радикала ($r = 0,382$), за зниженої самооцінки рівня здоров'я ($r = -0,514$) та соціального функціонування ($r = -0,259$; $P < 0,01$) (рис. 2).

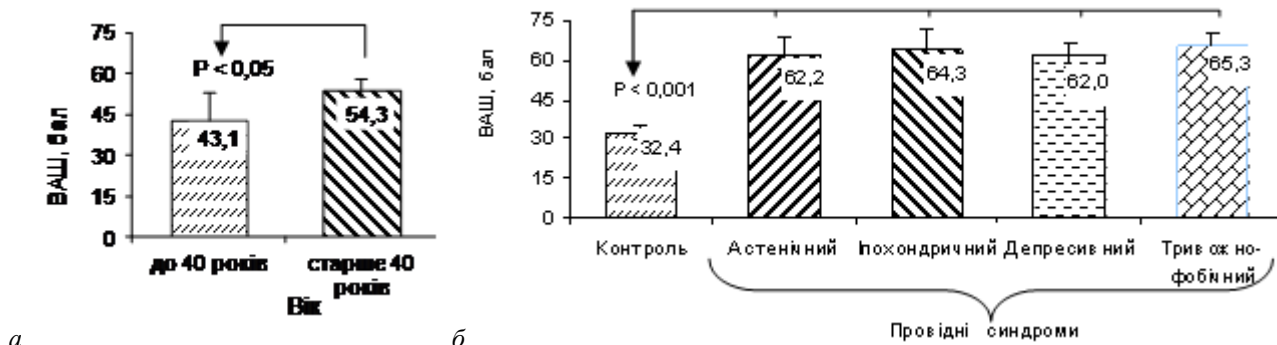


Рис. 1. Середній рівень проявів больового синдрому за ВАШ залежно від віку (а) та вираженості психопатологічної синдроматики (б): P – за критерієм Даннета (n = 76)

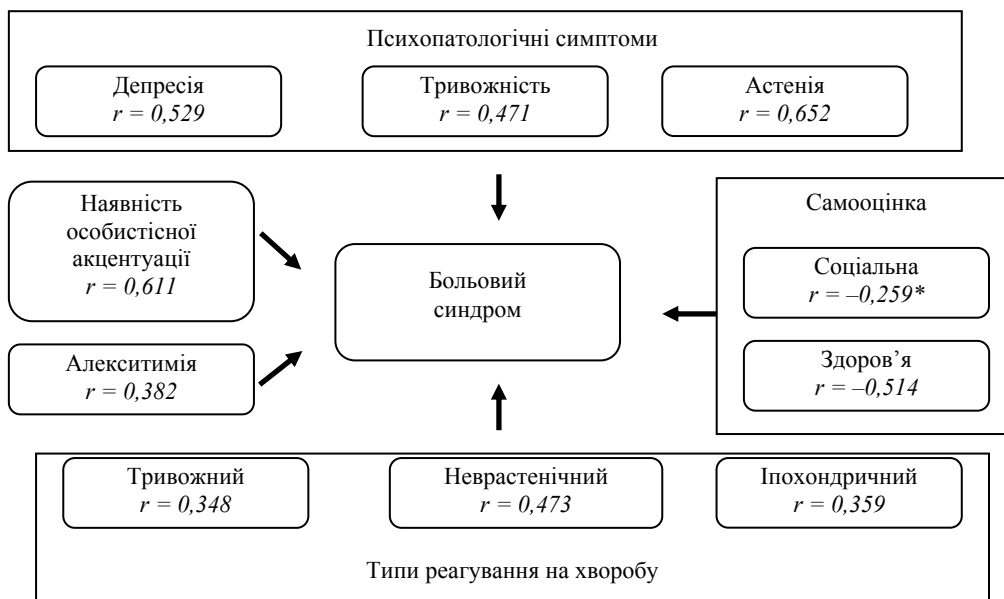


Рис. 2. Кореляційний взаємозв'язок вираженості больового синдрому з окремими клінічними та психологічними чинниками у хворих на коксартроз: r – коефіцієнт кореляції Спірмена; * – $P < 0,01$, в інших випадках – $P < 0,001$

Аналіз структури та генезису ГПР у хворих на КА свідчить про складність взаємодії соматичних, психогенних і конституційних особливостей хворих. Із цього приводу в кожному конкретному випадку необхідно оцінювати питомих значення всіх факторів у структурі хвороби для адекватного застосування психофармакологічних та психотерапевтичних засобів лікування. До основних вимог до психофармакотерапії психосоматичних розладів належать: широкий спектр психотропної активності: ефективний вплив на тривожні, депресивні, іпохондричні, астеничні та алгічні розлади; мінімальна негативна дія на соматичні функції; виражені соматотропні (терапевтичний вплив на супутню соматичну патологію) та соматовегетативні ефекти; мінімальна поведінкова токсичність (незначна вираженість або відсутність седативних ефектів – сонливості в денний час, порушення уваги тощо). Виходячи із принципів терапії ГПР, які застосовуються в сучасній психіатрії, ком-

плексна терапія невротичних розладів набуває великого значення при співвідношенні біологічних (лікарських) і соціотерапевтичних (в основному психотерапевтичних) методів. Тому лікування включало психоосвітні та психотерапевтичні заходи (бесіда, лекція, аутотренінг), а також психофармакотерапію (транквілізатори, антидепресанти, нейролептики в малих і середніх терапевтичних дозах).

У хворих на КА з виявленими граничними психічними розладами (51 особа) терапія мала комплексний характер і проводилась як на госпітальному етапі протягом одного місяця, так і на амбулаторному етапі у вигляді «підтримувальної» терапії упродовж трьох місяців та більше. Терапія невротичного стану з декомпенсацією триваліша, у середньому 6 місяців.

Динаміку вираженості клініко-психопатологічної симптоматики у хворих на КА з виявленими ГПР за впливу комплексної психотерапевтичної та психофармакологічної терапії

оцінювали за даними психіатричного обстеження з використанням стандартизованого опитувальника скарг і психопатологічних симптомів, а також вимірювання вираженості больового синдрому за ВАШ і оцінювання рівня тривожності за особистісною шкалою проявів тривоги Тейлора. У найближчому періоді після оперативного втручання та призначення симптоматичної психофармакотерапії оцінювання динаміки проводили індивідуально з кожним пацієнтом протягом перших 2–8 тижнів лікування. Дослідження у віддаленому періоді проводили через 3 і 6 місяців після початку терапії. Для порівняння аналогічні дослідження проводили серед хворих на КА без психічних порушень (контрольна група – 25 пацієнтів).

Враховуючи провідну роль больового синдрому у хворих на КА в цілому і його тісний зв'язок із наявністю ГПР, простежили чітку динаміку цього показника, оціненого за ВАШ, у пацієнтів основної та контрольної груп. Середній рівень інтенсивності болю за ВАШ у хворих із ГПР на передопераційному етапі був удвічі вищий, ніж у пацієнтів без цих порушень ($63,4 \pm 1,3$ проти $32,4 \pm 1,5$ бала; $P < 0,001$), а після оперативного втручання показник зменшився лише на 5,9 бала, або 9,3%. У подальшому відмічено високі темпи редукції середнього показника інтенсивності болю в обох групах (від 43,5% до 84,4%). Це закономірний результат проведеного оперативного втручання з ендпротезування тазостегнового суглоба й ортопедичних реабілітаційних заходів. Одночасне проведення корекційних заходів щодо виявлених ГПР у хворих основної групи дозволило вже до шести-місячного строку спостереження суттєво зменшити вираженість больового синдрому та наблизити їх до рівнів пацієнтів контрольної групи. Зокрема, через три місяці після початку терапії інтенсивність болю у пацієнтів основної групи перевищувала таку в контролі в 1,7 раза ($P < 0,001$), через 6 місяців – в 1,2 раза ($P > 0,10$), через рік – в 1,1 раза ($P > 0,60$).

Обговорення

Коксартроз має провідні позиції серед інших остеоартрозів, оскільки вражає найбільший суглоб у людському тілі та призводить до грубої інвалідизації хворих. Пацієнти з коксартрозом чутливіші до переживання відчуття болю, вони частіше звертаються за допомогою до спеціалістів, відвідують лікувальні установи, приймають більше лікарських засобів, зокрема знеболювальних, і важко піддаються корекції. Питання розвитку ГПР у цих пацієнтів хвилює багатьох спеціалістів не лише в Україні, а і за кордоном. Тривожні та депресивні розлади найчастіше супроводжують цю патологію та значною мірою впливають на перебіг основного захворювання та на якість життя пацієнтів. Останні дані закордонних досліджень підтверджують той факт, що тривога та депресія можуть змінювати больовий поріг. У той же час хронічний біль сам по собі може викликати чи посилювати занепокоєння та депресію, розвивається так зване порочне коло, яке може суттєво вплинути на перебіг хронічного захворювання (Axford et al., 2010). Виявлений і досліджений нами стійкий взаємозв'язок больового синдрому із наявністю ГПР підтверджує отримані результати багатьох вітчизняних і закордонних досліджень. Зокрема, у дослідженні Gerrits et al. (2014) вивчали вплив тривоги та депресії на симптоми остеоартрозу. Встановлено прямий вплив цих психопатологічних станів на больовий синдром, що був провідним проявом остеоартрозу. Дослідники повідомляють, що вираженість тривоги та депресії взаємопов'язані з болем в ураженому суглобі, а також із його інтенсивністю. А больовий синдром, у свою чергу, посилював прояви депресивної та тривожної симптоматики. Все це значно погіршує якість життя пацієнтів та їх соціальну активність (Sale et al., 2008; Gerrits et al., 2014).

Проведене дослідження виявило, що переважна більшість пацієнтів мала 41–60 років, тобто була в найбільш працездатному віці. Цей факт відіграє значну роль у проведенні лікувально-реабілітаційних заходів, тому що тривале та дороге лікування впливає на соціальну активність цих хворих, знижує

трудова активність, що підтверджує виявлення в них симптомів ГПР порівняно з іншими віковими групами. Схожі результати отримані також в іноземних дослідженнях. Наприклад, Gignac et al. (2013) повідомляє, що пацієнти середнього віку (50,8 року) з остеоартрозом частіше скаржилися на знижений настрій чи відчуття тривоги, на відміну від хворих похилого віку (середній вік склав 67,8 року), що страждали на остеоартроз аналогічного ступеня тяжкості. Виявлена особливість описана авторами як переважне відчуття невдоволення та зниження якості життя внаслідок тяжкого захворювання в осіб середнього віку (Gignac et al., 2013).

Не викликає сумніву той факт, що у хворих з остеоартрозом, які потребують хірургічного лікування, частіше виявляються симптоми ГПР. Обстежені нами хворі перебували у відділенні ендпротезування, їм усім призначене оперативне втручання для заміни тазостегнового суглоба. Досить висока частка виявлених психопатологічних розладів серед цього контингенту хворих підтверджує дезадаптивний вплив хірургічного втручання. Kirkness et al. (2012) повідомляють, що великий депресивний розлад дуже поширений у пацієнтів, яким заплановане тотальне ендпротезування суглоба.

Що стосується лікувально-реабілітаційних заходів, доведено необхідність комплексного та індивідуального підходу до лікування цього контингенту хворих з урахуванням соматичних, психогенних і конституційних особливостей. Проведене дослідження виявило деякі труднощі та недоліки в лікувальних протоколах, що створює перепони для якісного та успішного видужання. Важливий саме комплексний підхід до лікування із залученням суміжних спеціалістів психіатричного профілю. Закордонні дослідники підтверджують факт, що лікарі загальносоматичного профілю частіше зосереджені вникатково на фізичних аспектах остеоартрозу та не завжди враховують психічний стан хворого. Можлива причина – недостатність компетенцій у цій галузі та неможливість якісно дослідити психічні зміни при соматичному захворюванні (Turner and Kelly, 2000).

Для лікування ГПР у досліджуваних нами пацієнтів ми застосували психоосвітні та психотерапевтичні заходи (бесіда, лекція, аутотренінг), а також психофармакотерапію (транквілізатори, антидепресанти, нейролептики в малих і середніх терапевтичних дозах). Комплексний підхід мав позитивні результати відносно зниження проявів ГПР і, як наслідок, відмічене суттєве поліпшення переносимості больових відчуттів у цих хворих, що ще раз підтверджує досліджуваний взаємозв'язок. Як видно з багатьох закордонних досліджень, спеціалісти активно розробляють нові програми комплексного лікування. Доведено позитивний вплив на загальний стан хворого таких психотерапевтичних методик як терапія музикою та йога (Ottaviani et al., 2012; Middleton et al., 2013).

Таким чином, проведений аналіз роботи із вивчення проблеми взаємовпливу психічної та фізичної складової за остеоартрозу доводить актуальність вибраної тематики та окреслює шляхи подальшого вдосконалення діагностичних та корекційних програм.

Висновки

Граничні психічні порушення, що мають місце у хворих із тривалими соматичними захворюваннями, до яких, зокрема, належить КА, суттєво посилюють тяжкість стану, знижують адаптаційні можливості, впливаючи тим самим на перебіг і результат основного захворювання.

Переважаючи у пацієнтів із соматичними захворюваннями неспсихотичних (граничних) форм психічних розладів значно ускладнює їх розпізнавання через неповну відповідність критеріям діагностики розгорнутого психіатричного захворювання. Досить часто в клінічній картині захворювання соматичні скарги та функціональні симптоми у пацієнтів із психопатологічними порушеннями (депресією, тривожністю) настільки прева-

люють, що лікарі-інтерністи навіть не припускають наявності у хворого психічного розладу.

Під час проведення курсів підвищення кваліфікації для лікарів загальносоматичного профілю необхідно робити акцент на вдосконаленні навичок своєчасно виявляти граничні психічні розлади, визначати їх тяжкість, а також направляти пацієнтів на консультацію до лікарів психотерапевтів та психіатрів.

Важлива необхідність призначення адекватної терапії виявлених психічних розладів у межах роботи з психічною сферою соматичного хворого, що дозволить знизити ризик рецидиву або загострення його хронічного захворювання, а також істотно вплине на зменшення тяжкості перебігу соматичної хвороби, зокрема інтенсивності болювого синдрому.

Для виявлення психопатологічних порушень у соматичних хворих доцільно використовувати не тільки діагностичні критерії МКХ-10, а й різні психометричні шкали та опитувальники для об'єктивізації клінічної симптоматики, дослідження вираженості проявів тривоги, депресії, невротичних розладів, особистісних характеристик пацієнтів, типів ставлення до хвороби тощо. Це дає можливість для глибшої диференційної діагностики психопатологічних станів, що перебігають зі схожою клінічною симптоматикою, але мають важливі відмінності у психологічній картині порушень. Застосування особистісних опитувальників дозволяє не тільки виявляти стрижньові структури пацієнта, що виконують ключову роль в його психічній дезадаптації, а і визначати мішені для психотерапевтичної роботи.

References

Ackerman, I. N., Bohensky, M. A., de Steiger, R., Brand, C. A., Eskelinen, A., Fenstad, A. M., Fumes, O., Graves, S. E., Haapakoski, J., Mäkelä, K., Mehnert, F., Nemes, S., Overgaard, S., Pedersen, A. B., & Garellick, G. (2017). Lifetime risk of primary total hip replacement surgery for osteoarthritis from 2003–2013: A multi-national analysis using national registry data: International lifetime risk of total hip replacement for osteoarthritis. *Arthritis Care and Research*.

Axford, J., Butt, A., Heron, C., Hammond, J., Morgan, J., Alavi, A., Bolton, J., & Bland, M. (2010). Prevalence of anxiety and depression in osteoarthritis: Use of the hospital anxiety and depression scale as a screening tool. *Clinical Rheumatology*, 29(11), 1277–1283.

Bair, M., Wu, J., Damush, T., Sutherland, J., & Kroenke, K. (2008). Association of depression and anxiety alone and in combination with chronic musculoskeletal pain in primary care patients. *Psychosomatic Medicine*, 70(8), 890–897.

Beltman, M. W., Voshaar, R. C. O., & Speckens, A. E. (2010). Cognitive-behavioural therapy for depression in people with a somatic disease: Meta-analysis of randomised controlled trials. *The British Journal of Psychiatry*, 197(1), 11–19.

Bokma, W. A., Batelaan, N. M., van Balkom, A. J. L. M., & Penninx, B. W. J. H. (2017). Impact of anxiety and/or depressive disorders and chronic somatic diseases on disability and work impairment. *Journal of Psychosomatic Research*, 94, 10–16.

Calvo-Lobo, C., Vilar Fernández, J. M., Becerro-de-Bengoa-Vallejo, R., Losa-Iglesias, M. E., Rodríguez-Sanz, D., Palomo López, P., & López López, D. (2017). Relationship of depression in participants with nonspecific acute or subacute low back pain and no-pain by age distribution. *Journal of Pain Research*, 10, 129–135.

Chaban, O. S., & Khaustova, O. O. (2010). Terapiia khronichnoho alhichnoho syndromu u patsientiv z nepsykhotychnymy depresyvnymy rozladamy i komorbidnoiu somatychnoiu patolohiieiu [Therapy of chronic algic syndrome in patients with non-psychotic depressive disorders and comorbid somatic pathology]. *Ukrainskyi Visnyk Psykhonevrolohii*, 18(1), 67–72 (in Ukrainian).

Cho, H. J., Morey, V., Kang, J. Y., Kim, K. W., & Kim, T. K. (2015). Prevalence and risk factors of spine, shoulder, hand, hip, and knee osteoarthritis in community-dwelling Koreans older than age 65 years. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 473(10), 3307–3314.

Chong, T., Don, D. W., Kao, M.-C., Wong, D., & Mitra, R. (2013). The value of physical examination in the diagnosis of hip osteoarthritis. *Journal of Back and Musculoskeletal Rehabilitation*, 26(4), 397–400.

Danilov, A. B., & Danilov, A. B. (2010). Bol': Patogenez i lechenie [Pain: Pathogenesis and treatment]. *Rossiyskiy Zhurnal Boli*, 2, 35–39 (in Russian).

Duffy, P. J., Masri, B. A., Garbus, D. S., & Duncan, C. P. (2005). Evaluation of patients with pain following total hip replacement. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 87(11), 2566–2575.

Gerrits, M. M., van Oppen, P., Leone, S. S., van Marwijk, H. W., van der Horst, H. E., & Penninx, B. W. (2014). Pain, not chronic disease, is associated with the recurrence of depressive and anxiety disorders. *BMC Psychiatry*, 14(1).

Gignac, M. A. M., Backman, C. L., Davis, A. M., Lacaille, D., Cao, X., & Badley, E. M. (2013). Social role participation and the life course in healthy adults and individuals with osteoarthritis: Are we overlooking the impact on the middle-aged? *Social Science and Medicine*, 81, 87–93.

Hardcastle, S. A., Dieppe, P., Gregson, C. L., Hunter, D., Thomas, G. E. R., Arden, N. K., Spector, T. D., Hart, D. J., Laugharne, M. J., Clague, G. A., Edwards, M. H., Dennison, E. M., Cooper, C., Williams, M., Davey Smith, G., & Tobias, J. H. (2014). Prevalence of radiographic hip osteoarthritis is increased in high bone mass. *Osteoarthritis and Cartilage*, 22(8), 1120–1128.

Hawker, G. A., Gignac, M. A. M., Badley, E., Davis, A. M., French, M. R., Li, Y., Perruccio, A. V., Power, J. D., Sale, J., & Lou, W. (2011). A longitudinal study to explain the pain-depression link in older adults with osteoarthritis. *Arthritis Care and Research*, 63(10), 1382–1390.

Kc, R., Li, X., Forsyth, C. B., Voigt, R. M., Summa, K. C., Vitaterna, M. H., Tryniszewska, B., Keshavarzian, A., Turek, F. W., Meng, Q.-J., & Im, H.-J. (2015). Osteoarthritis-like pathologic changes in the knee joint induced by environmental disruption of circadian rhythms is potentiated by a high-fat diet. *Scientific Reports*, 5, 16896.

Kirkness, C. S., McAdam-Marx, C., Unni, S., Young, J., Ye, X., Chandran, A., Peters, C. L., & Asche, C. V. (2012). Characterization of patients undergoing total knee arthroplasty in a real-world setting and pain-related medication prescriptions for management of postoperative pain. *Journal of Pain and Palliative Care Pharmacotherapy*, 26(4), 326–333.

Lawrence, R. C., Felson, D. T., Helmick, C. G., Arnold, L. M., Choi, H., Deyo, R. A., Gabriel, S., Hirsch, R., Hochberg, M. C., Hunder, G. G., Jordan, J. M., Katz, J. N., Kremers, H. M., & Wolfe, F. (2008). Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States: Part II. *Arthritis & Rheumatism*, 58(1), 26–35.

Loskutov, A. E. (2010). Endoprotezirovaniye tazobedrennogo sustava [Hip arthroplasty]. *Lira, Dnipropetrovsk* (in Russian).

Makolkina, V. I., Pak, I. V., & Men'shikova, I. V. (2007). Koksartroz: Voprosy etiologii, epidemiologii, klinicheskikh proyavleniy i novykh podhodov k lecheniyu [Coxarthrosis: Etiology, epidemiology, clinical manifestations and new approaches to therapy]. *Terapevticheskii Arkhiv*, 79(1), 81–85 (in Russian).

Matcham, F., Rayner, L., Steer, S., & Hotopf, M. (2014). The prevalence of depression in rheumatoid arthritis: A systematic review and meta-analysis: Reply. *Rheumatology (Oxford, England)*, 53(3), 578–579.

Middleton, K. R., Ward, M. M., Haaz, S., Velumylym, S., Fike, A., Acevedo, A. T., Tataw-Ayuketah, G., Dietz, L., Mittleman, B. B., & Wallen, G. R. (2013). A pilot study of yoga as self-care for arthritis in minority communities. *Health and Quality of Life Outcomes*, 11, 55.

Mújica Mota, R. E. (2013). Cost-effectiveness analysis of early versus late total hip replacement in Italy. *Value in Health*, 16(2), 267–279.

Munce, S., & Stewart, D. (2007). Gender differences in depression and chronic pain conditions in a national epidemiologic survey. *Psychosomatics*, 48(5), 394–399.

Nassonova, V. A., Mendel, O. I., Denisov, L. N., Vertkin, A. L., Alekseyeva, L. I., & Naumov, A. V. (2011). Osteoartroz i ozhirenie: Kliniko-patogeneticheskie vzaimosvjazi [Osteoarthritis and obesity: Clinical and pathogenetic associations]. *Profilakticheskaya Meditsina*, 1, 29–37 (in Russian).

O'Connor, K., Vizcaino, M., Ibarra, J. M., Balcazar, H., Perez, E., Flores, L., & Anders, R. L. (2015). Multimorbidity in a Mexican community: Secondary analysis of chronic illness and depression outcomes. *International Journal of Nursing*, 2(1), 35–47.

Ottaviani, S., Bernard, J.-L., Jean-Luc, B., Bardin, T., Thomas, B., Richette, P., & Pascal, R. (2012). Effect of music on anxiety and pain during joint lavage for knee osteoarthritis. *Clinical Rheumatology*, 31(3), 531–534.

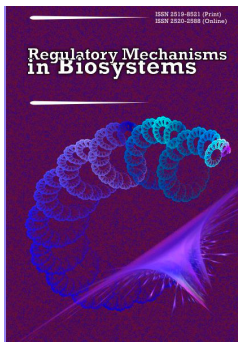
Poulsen, E., Christensen, H. W., Overgaard, S., & Hartvigsen, J. (2012). Prevalence of hip osteoarthritis in chiropractic practice in Denmark: A descriptive cross-sectional and prospective study. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*, 35(4), 263–271.

Rahman, M. M., Kopec, J. A., Goldsmith, C. H., Anis, A. H., & Cibere, J. (2016). Validation of administrative osteoarthritis diagnosis using a clinical and radiological population-based cohort. *International Journal of Rheumatology*, 2016, 1–7.

Rebrov, B. A., Blaginina, I. I., & Rebrova, O. A. (2011). K voprosu o svyazi khronicheskogo bolevoogo sindroma i trevozhno-depressivnykh rasstrojstv u bol'nykh terapevticheskogo profilja [To the question of the relationship of chronic pain syndrome and anxiety depressive disorders in patients of therapeutic profile]. *Bol', Sustavy, Pozvonochnik*, 1(2), 83–87 (in Russian).

Riediger, W., Doering, S., & Krismer, M. (2010). Depression and somatisation influence the outcome of total hip replacement. *International Orthopaedics*, 34(1), 13–18.

- Rodic, D., Meyer, A. H., & Meinschmidt, G. (2015). The association between depressive symptoms and physical diseases in Switzerland: A cross-sectional general population study. *Frontiers in Public Health*, 3, 47.
- Sale, J. E. M., Gignac, M., & Hawker, G. (2008). The relationship between disease symptoms, life events, coping and treatment, and depression among older adults with osteoarthritis. *The Journal of Rheumatology*, 35(2), 335–342.
- Sharma, A., Kudesia, P., Shi, Q., & Gandhi, R. (2016). Anxiety and depression in patients with osteoarthritis: Impact and management challenges. *Open Access Rheumatology: Research and Reviews*, 8, 103–113.
- Sharma, L., & Berenbaum, F. (Eds.). (2007). *Osteoarthritis: A companion to rheumatology*. Mosby, Philadelphia.
- Strine, T. W., Mokdad, A. H., Balluz, L. S., Gonzalez, O., Crider, R., Berry, J. T., & Kroenke, K. (2008). Depression and anxiety in the united states: Findings from the 2006 behavioral risk factor surveillance system. *Psychiatric services*, 59(12), 1383–1390.
- Tonelli, S. M., Rakel, B. A., Cooper, N. A., Angstrom, W. L., & Sluka, K. A. (2011). Women with knee osteoarthritis have more pain and poorer function than men, but similar physical activity prior to total knee replacement. *Biology of Sex Differences*, 2, 12.
- Tukker, A., Visscher, T., & Picavet, H. (2008). Overweight and health problems of the lower extremities: Osteoarthritis, pain and disability. *Public Health Nutrition*, 1.
- Turner, J., & Kelly, B. (2000). Emotional dimensions of chronic disease. *The Western Journal of Medicine*, 172(2), 124–128.
- Zagorodniy, N. V. (2011). Endoprotezirovaniye tazobedrennogo sustava. Osnovy i praktika [Hip arthroplasty. Fundamentals and practice]. Geotar-Media, Moscow (in Russian).



Central hemodynamic and splanchnic circulation in children with meningococcal septic shock

M. A. Georgiyants*, V. A. Korsunov*, O. M. Olkhovska**

*Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education, Kharkiv, Ukraine

**Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

Article info

Received 12.01.2017

Received in revised form
12.02.2017

Accepted 16.02.2017

Kulturny Str., 11/83,
Kharkiv, 61058, Ukraine
Tel. +38-066-523-32-13
E-mail: eniram@bigmir.net

Ugrickogo Str., 16,
Kharkiv, 61000, Ukraine
Tel. +38-050-300-05-16
E-mail: korsunoff@ukr.net

N'uton Str., 123/37,
Kharkiv, 61162, Ukraine
Tel. +38-095-193-12-44
E-mail: onixol19@gmail.com

Georgiyants, M. A., Korsunov, V. A., & Olkhovska, O. M. (2017). Central hemodynamic and splanchnic circulation in children with meningococcal septic shock. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(1), 91–97. doi: 10.15421/021716

Meningococcal infection is caused by the bacterium *Neisseria meningitidis* (also termed meningococcus). Invasive meningococcal disease remains a rare infectious disease not only with high mortality but also with important morbidity and remains as a leading cause of sepsis and septic shock. The pathogenic mechanisms of microcirculatory disorders in meningococcal septic shock have been subject to controversy. This article presents the results of a study of 11 paediatric patients' (4 boys and 7 girls) with meningococcal septic shock (Group I) who were hospitalized at the Regional Children's Infectious Hospital from 2009 to 2011. The average age of the patients was 37.4 ± 8.4 mo. Septic shock was diagnosed according to International Pediatric Sepsis Consensus Conference: definitions of criteria for sepsis and organ dysfunction in paediatrics. Heart rate, respiratory rate, systolic blood pressure, diastolic blood pressure, average blood pressure, SpO₂ were monitored. The cardiac output, ejection fraction, fraction shortening, stroke volume were measured by ultrasound in M-mode by Teichholz method. Blood circulation in the *a. mesenterica*, *a. hepatica*, *a. lienalis*, *a. renal sinister*, *v. porta*, *v. lienalis*, *v. renal sinister* was determined by impulse Doppler's wave. Acid-base and electrolytes level in serum, nitric oxide (NO), endothelin I, creatinine, C-reactivity protein and lactate blood level were measured. The control group consisted of 21 healthy children (9 boys and 12 girls), aged 37.5 ± 5.4 mo. in average (Group II). We used t-criteria (Student's) and correlation with R-criteria (Spearman) for statistical analysis. The data showed a statistically significant lower fraction of ejection, fraction of shortening, stroke volume in Group I. Moreover, our data showed a statistically high level of mesenterial and portal blood flow rate and high pulse index in *v. renal sinister* compared to healthy children. The blood level of NO was increased in Group I as well as in Group II. Direct correlations were determined between the level of NO and mesenteric, hepatic arterial and venous blood flow rate. Statistically significant inverse correlations between the level of NO and pulse resistive index in splanchnic vessels were discovered as well as inverse correlations between the NO level and the indicator of the severity of condition on PRISM scale ($r = -0.952$). At the same time, we have found no correlation between splanchnic circulation value and cardiac output. Based on the results of this study, we consider that NO has organ protective effects in children with meningococcal sepsis. Future research should aim to introduce new strategies of intensive care for patients with meningococcal septic shock with early use of inotrope and NO-donor therapy in fluid restriction combination.

Keywords: meningococcal sepsis; children; nitric oxide; portal circulation

Introduction

Meningococcal infection (MI) was first described by Vieusseux, Switzerland in 1805. *Meningococcus* (*Neisseria meningitidis*) was first identified in the cerebrospinal fluid of a patient with meningitis by Weichselbaum in 1887. According to WHO, MI has caused 171,000 deaths all over the world since the year 2000 (Hamborsky, 2015).

N. meningitidis leads to 500,000 cases of meningitis and septicemia in the world annually. Recent foreign data indicate a 5–15% mortality rate of meningococcal diseases (Sadarangani et al., 2015). It remains highly distressing that MI can kill healthy people of any age within a few hours of the onset of the first symptoms.

In 1919 W. W. Herrick pointed out, regarding meningococcal infection, "there is no other infection that kills so quickly" and this statement is still correct almost 100 years later. Meningococcal disease is the leading infectious factor in the death in children in the UK, despite the success of vaccination against meningococcus group

C. High mortality is not the only problem posed by meningococcal infection – more than a third of surviving patients have one or more clinically significant physical, cognitive or functional defects.

Overall, one in ten affected children can suffer such serious consequences as amputations and brain damage (Viner et al., 2012). Deaths and severe disability are usually associated with the fulminant course of meningococcal sepsis, the frequency of which is 10–20% and the mortality up to 80–100%. The leading factor of death and serious complications of the skin and soft tissue with MI is septic shock (Nadel, 2016). In pathogenesis of septic shock the main role is played by disorders of the microcirculation and tissue perfusion or microcirculatory distress, which are based on the damage to the endothelium (De Backer et al., 2013; Ince et al., 2016). Long-term persistence of these disorders despite intensive therapy is one of the leading factors in the formation of multiple organ failure syndrome and unfavourable outputs in septic shock (De Backer et al., 2013).

It is known that two groups of mediators are involved in the regulation of vascular tone: vasoconstrictors (catecholamines, vaso-

pressin, angiotensin II, endothelin, leukotrienes) and vasodilators (prostaglandins, serotonin, histamine, nitric oxide, atrial natriuretic peptide) (Boisrame-Helms et al., 2013). There is a hypothesis that explains the development of septic vasodilatation by an imbalance between vasodilators and vasoconstrictors in favour of vasodilators. However, vasodilatation affects not all vascular areas, but some vascular pools can be in a state of spasm, leading to a redistribution of blood flow through different parts of the microvasculature, as it is shown in patients with severe sepsis that the number of microvasculature vessels with normal blood circulation ($<20\ \mu\text{m}$) is significantly lower, compared to healthy volunteers (De Backer, 2014). Many studies have demonstrated that the slowdown of blood flow in micro vessels persists and causes a disturbance of oxygen consumption by tissues after solution resuscitation (Corrêa et al., 2016). In the experimental models of septic shock the rapid reduction in microcirculatory blood flow was detected, the formation of vessels with the ability to block blood circulation, increase in blood flow heterogeneity and reduction of the density of capillaries. It is emphasized that these disorders can occur in the absence of intensive hemodynamic changes and arterial hypotension (De Backer, 2014). Due to redistribution of blood flow, microcirculatory disorders lead to the development of multiple organ failure in septic shock syndrome and have to be corrected immediately by intensive care (Lupp et al., 2013). Thus, according to published data, vasodilation and vasoconstriction simultaneously appear in septic shock and are both responsible for damage to vital organs. However, in commonly adopted intensive care the major aim is to remove arterial hypotension (predominantly vasodilation) by using sympathomimetic drugs, which cause more severe vasoconstriction and closing of the vicious circle of septic shock. Nitric oxide (NO) is considered as the main vasodilator. The lifetime of NO is about 6 sec. after which it turns into nitrates (NO_2^-) and nitrite (NO_3^-). In septic shock NO formation is stimulated by LPS and pro-inflammatory cytokines from L-arginine due to the action of enzyme isoforms of NO-synthase. The formation of NO may also be as a result of restoration from NO_2^- and NO_3^- by nitrate reductase systems (Zhao et al., 2015). The effect of NO on the microorganism is realized through activation of soluble guanylate cyclase in the endothelium. Consequently, synthesis of cyclic guanosine monophosphate increases, causing the relaxation of blood vessels and as a result – hypotension and increased capillary leakage (Zhao et al., 2015). Thus, an excess of NO in septic shock can reduce systemic and pulmonary vascular resistance, which in turn reduces the systemic and pulmonary blood pressure. Its abundance is also associated with the development of myocardial dysfunction and increased oxygen consumption. However, in septic shock vasodilatation and its effects are also likely to occur due to hypoxia and activation of potassium channels, lactic acidosis, and vasopressin deficiency.

Thus, in recent years, the alternative concept of the role of L-arginine and NO in septic shock has been formulated. According to this concept, as the result of the activation of the second path using inducible nitric oxide synthase, hyperproduction of NO is compensatory in nature due to the inhibition of NO production by constitutive NO-synthase III type that provides a sufficient level of NO required for maintaining adequate organ perfusion.

Thus, it has been suggested that, primarily affected by the prevalence of septic shock, vasoconstrictors improve organ perfusion due to the overproduction of NO (Duran-Bedolla et al., 2014). It is important to remember that if septic shock in adults is often accompanied by high cardiac output and low peripheral vascular resistance (predominant occurrence of vasodilation), then septic shock in children often has the opposite hemodynamic profile – low cardiac output and elevated or normal vascular resistance.

That's why the leading symptom of septic shock in adults is blood pressure reduction and in children – microcirculatory disorders (Dellinger et al., 2013). Therefore, it is logical to assume that a vasoconstrictor effect is dominant in children with septic shock. This assumption is more logical regarding meningococcal septic shock, thanks to expressive microcirculation disorders that cause

necrosis of the skin and soft tissue more frequently than in any other diseases and the pathognomonic sign of meningococemia-disseminated hemorrhagic rash with necrosis.

However, according to the concept of blood flow heterogeneity in septic shock, a question arises: Is vasoconstriction present in all vascular pools in children with meningococcal septic shock? The greatest interest lies in the state of blood circulation in the organs of the splanchnic zone (intestines, liver), which is the largest vascular area and normally requires up to 25% of cardiac output and characterizes multiple aspects of homeostasis (Prin et al., 2015). There is an evident interest in the condition of the renal circulation, because damage and dysfunction of the kidneys and organs of the splanchnic zone are integral components of the multiple organ failure syndrome. Meanwhile, the data about microcirculatory changes in these organs during septic shock remain highly controversial (Gomez et al., 2014; Bernal, 2016). The next question concerns the relationship between the cardiac output and the state of regional circulation. Unfortunately, in the sources available to us, we have found only a few papers devoted to the analysis of the central hemodynamic in children with meningococcal septic shock and were unable to locate even a single work on the state of the splanchnic organs and renal blood flow. Meanwhile, there are publications on the use of Doppler ultrasound for blood flow investigation of the afferent and efferent renal vessels and mentioning the high efficiency of this method for the prediction of acute kidney injury (Schnell et al., 2012). Thus, there is significant difference in opinion on the state of splanchnic and renal perfusion in cases of MI, dependence of blood perfusion on the balance of nitric oxide and endothelin. These aspects have not been researched in children with meningococcal septic shock, which is why the current investigation was carried out.

The purpose of the study was to assess the state of splanchnic (top mesenteric, common hepatic, splenic artery, splenic and portal venous) blood flow and renal blood flow in children with meningococcal septic shock and make a subsequent comparison of the obtained data with the serum concentration of nitric oxide and endothelin I. We also set the goal of determining the relationship between the level of nitric oxide, endothelin and serum parameters of renal and splanchnic circulation, systemic inflammatory response and the severity of organ failure in children with meningococcal septic shock.

Materials and methods

The study involved 11 children (4 boys and 7 girls) aged from 7 months to 9 years (34.9 ± 8.5 months on average), who were hospitalized in the ICU of Regional Children's Infectious Diseases Hospital (Kharkiv) in the years 2009–2011 and diagnosed with septic shock of meningococcal etiology (Group 1). Diagnosis of septic shock was established on the basis of criteria of the International Pediatric Sepsis Consensus Conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics (2005). The severity was evaluated on the basis of Glasgow Meningococcal Septicaemia Prognostic Score (GMSPS) – $9, 0.0 \pm 1.3$ points on average; scale of septic multiple organ failure SOFA – 10.1 ± 1.2 points and PRISM GPA scale – 20.4 ± 3.2 points on average.

Monitor observation of patients included the determination of the heart rate (HR), skin and rectal temperature gradient, electrocardiography, systolic (SBP), diastolic (DBP) and mean arterial pressure (MBP), central venous pressure (CVP), the frequency of respiratory movements (RR), pulse oximetry (SpO_2) (monitors UM-300).

Simultaneously with intensive care measures (providing venous access, sedation, oxygen or endotracheal intubation, blood analysis and antibiotics therapy) all children underwent additional examination – M-mode echocardiography and pulsed-wave Doppler scan of blood flow in the liver (AH), splenic (AL) and upper mesenteric (AM) arteries, portal (VP) and splenic (VL) veins (ultrasound scanner "Ultima PA"). HR, end-diastolic (LVEDD) and end-systolic (LVESD) size of the left ventricle was measured. According to the formula Teichholz et al. (1976), indices of left ventricular end-sys-

tolic (LVESV) and end-diastolic volume (LVEDV), stroke volume (SV), stroke index (SI), ejection fraction (EF), contraction fraction (FS) were calculated. Cardiac output (HMV), cardiac index (CO) index and total peripheral vascular resistance (SVRI) were calculated by well-known formulae (Butterworth and Mackey, 2013). Also the diameter of blood vessels (D) of the portal vein, hepatic artery, splenic artery, upper mesenteric artery and splenic vein, the maximum (V_{max}) and minimum (V_{min}) blood flow speeds in these vessels were measured. According to the well-known formulae, the average blood flow velocity (V_{mean}), Pulse Code (RA), resistance index (IR), blood flow volume Q, the ratio of blood flow to the body weight Q/m and the indices of volumetric blood flow in the hepatic IBS AH and upper mesenteric artery IBS AM and their relationship to the CO (IBC/CO AH and IBC/CO AM) were calculated.

Besides, we determined the hepatic vascular index (HVI), splenoportal index (LPI), Doppler portal index (DPI), common hepatic blood volume flow (CHBV), hepatic portal ratio (HPR). With all patients the pulsed-wave Doppler scan blood flow in the left renal artery (A_{ren} S) and (V_{ren} S) vein was performed and the average flow velocity (V_{mean}), pulsation index (PI) and resistance index (IR) were calculated based on the results of maximum (V_{max}) and minimum (V_{min}) flow rate. Parameters of acid-base status and gases of arterial and central venous blood were measured by analyzer AVL – 995 and Gastat – mini. The level of hemoglobin (Hb) was determined by the colorimetric method. The calculation of oxygen supply DO_2 , oxygen consumption VO_2 and an index of tissue oxygen extraction was carried out by known formulae. The level of glucose was determined by analyzer "Exsan – G". C-reactive protein and endothelin I was measured by immuno-enzyme analysis (ELISA-test, USA), creatinine – by the method of Jaffe, content of blood lactate – enzymatic method with "Olvex diagnosticum" (Russia) by biochemical analyzer Stat Fax 1904+. The content of NO was assessed by serum final metabolites (nitrites/nitrates) by colorimetric method using the Griess reagent in the Central Research Laboratory of Kharkov National Medical University.

The control group (Group II) was formed of 21 practically healthy children (9 boys and 12 girls) (average age 37.5 ± 5.4 mo). The parameters of central hemodynamics indices, Doppler parameters of blood circulation in the vessels of splanchnic zone, kidneys and NO metabolites content and serum endothelin I were established in the control group. Statistical processing of the obtained data was carried out by means of Statistica 7.0 (StatSoft Inc., USA) applications.

The test of normality was carried out according to the Kolmogorov-Smirnov criterion. Output data were subordinated to a normal distribution, so the significance of differences between groups was determined by the t-test (Student's test) and correlations between the parameters – using the rank correlation coefficient R (Spearman).

Results and discussion

Patients of the study Group I and the control Group II were not significantly different in age and anthropometric parameters and therefore can be comparable for further analysis of hemodynamic parameters and indicators of splanchnological and renal blood flow (Table 1).

Table 1
General characteristics of Groups (Mean \pm SE)

Indices	Group I, n = 11	Group II, n = 21	P
Age, mo	34.9 \pm 8.5	37.5 \pm 5.4	0.761
Height, cm	106.1 \pm 4.6	99.0 \pm 5.9	0.243
Body weight, kg	14.9 \pm 1.9	14.3 \pm 2.3	0.782
Body area, m ²	0.66 \pm 0.05	0.63 \pm 0.06	0.603

Children from Group I showed signs of systemic inflammatory response in the form of fever, tachypnea, tachycardia, leukocytosis (or leukopenia), increased levels of C-reactive protein (normally less than 6 mg/l), which gave rise to the diagnosis of meningococcal sepsis based on combination of abundant hemorrhagic rash and results of bacteriological examination (emphasis of meningococcal

groups A, B or C in the blood or nasal-throat) (Table 2). Indicators of central hemodynamics in Group I were characterized by significantly increased heart rate and reduced rates of systolic, diastolic and common arterial pressure. These changes are typical of decompensated septic shock. Indicators of the diastolic-end and systolic-end dimensions and volumes of the left ventricle in Group I and Group II did not differ significantly, but due to the decrease of EDLVD and increase of ESLVD, we investigated a decrease in the left ventricular systolic function, which includes ejection and contraction fractions. Stroke volume and left ventricular stroke indices were significantly lower in Group I compared to Group II. However, integrated cardiac output indices – the volume of blood and heart index were similar in both groups. Despite reduced SV and SI, significant differences between MHV and CO in both groups were absent due to tachycardia in Group I. The total peripheral vascular resistance was not significantly different between the groups (Table 3).

Table 2

Indicators of systemic inflammatory response and clinical signs of shock in Group I patients, n = 11 (Mean \pm SE)

Indices	Group I
HR, 1/min	163.3 \pm 6.3
RR, 1/min	65.2 \pm 4.1
The number of leukocytes, 10 ⁹ /l	14.9 \pm 2.7
Body temperature, °C	39.2 \pm 0.3
C-reactive protein, mg/l	98.2 \pm 13.5
Time of filling the capillaries, s	5.6 \pm 0.4
Bad peripheral pulse, %	100.0

Table 3

Indicators of central hemodynamics in patients (Mean \pm SE)

Indices	Group I, n = 11	Group II, n = 21	P
SBP, mm Hg.	79.8 \pm 2.0	101.5 \pm 1.0	1.0·10 ⁻⁷
DBP, mm Hg.	43.4 \pm 3.0	57.3 \pm 1.4	0.001
MBP, mm Hg.	55.5 \pm 2.6	72.1 \pm 1.1	2.0·10 ⁻⁶
EDLVD, mm	28.9 \pm 0.02	30.4 \pm 0.07	0.540
ESLVD, mm	21.9 \pm 0.02	18.8 \pm 0.07	0.137
EDLVV, ml	35.5 \pm 7.40	37.2 \pm 2.79	0.830
ESLVV, ml	18.5 \pm 4.42	11.3 \pm 1.03	0.118
SV, ml/m ²	17.0 \pm 3.11	25.8 \pm 1.89	0.025
SI, ml/min/m ²	24.7 \pm 2.97	43.7 \pm 2.25	5.6·10 ⁻⁵
HMV, l/min	2.7 \pm 0.44	2.6 \pm 0.16	0.775
CO, l/min/m ²	4.0 \pm 0.42	4.4 \pm 0.22	0.394
EF, %	51.0 \pm 3.0	70.0 \pm 1.0	1.0·10 ⁻⁶
FS, %	25.0 \pm 1.0	38.0 \pm 1.0	1.0·10 ⁻⁷
SVRI, din·s·cm ⁻⁵ ·m ²	1150.2 \pm 132.9	1371.8 \pm 68.4	0.152

Thus, the indicators for analysis of central hemodynamics in children with meningococcal septic shock give reasons to recognize a significant deterioration of left ventricular systolic function as the leading factor of hemodynamic disorders, which in time offsets a significant increase in the heart rate. Despite the rather high cardiac output at normal ISVR of patients in Group II there was significant hypotension. We can assume that the second important factor which causes hemodynamic instability in the examined patients was the relative angioparesis, which made it impossible to maintain normal blood pressure. Analysis of acid-base status in patients of Group I indicates that they suffered from decompensated metabolic acidosis with increased anion interval. The possible reason for this was hyperlactatemia. Moderate anemia, hypercalcemia and increased creatinine were also observed. Usually, hypercalcemia is an atypical phenomenon for septic shock, but in our opinion, it was caused by the introduction of calcium to patients in prehospital emergency care. The increased level of creatinine indicates acute kidney damage in patients of Group I. Transport and consumption of oxygen were characterized by the moderate decrease in oxygen delivery with saved oxygen consumption, which is typical for the subcompensated state (Table 4).

Analysis of the blood flow in arterial vessels in the splanchnic zone shows the differences between Group I and the control Group II. Blood flow in the hepatic artery in Group I was characterized by

significant growth of diastolic velocity V_{min} accompanied by a significant decrease of pulsating index and resistance index compared to Group II. These changes follow the development of angioparesis in the hepatic artery. However, the volume flow rates of Groups I and II were not significantly different. So angioparesis may be viewed as compensatory within autoregulation of circulation in the internal organs to promote the required volume of blood circulation in the systemic arterial hypotension (Table 5).

In *a. mesenterica* of Group I we observed an almost double growth of V_{max} was observed up to 181.6 ± 26.4 cm/s, statistically unreliable tendency to increase the pulse index and resistance index with significant increase in the blood flow volume relating to body weight Q/m to 75.3 ± 11.0 ml/min/m² compared to 46.6 ± 4.5 ml/min/m² in Group II. Such changes of mesenteric blood flow should be considered as arterial congestion or excessive arterial blood supply, which leads to partial compensation in the form of arterial spasm development as autoregulation mechanisms of organ blood flow. We can exclude postprandial increase in blood flow in *a. mesenterica* because of the critical condition of children on empty stomachs who were admitted to the intensive care.

Table 4
Indicators of acid-base, fluid and electrolyte balance, oxygen transport and oxygen consumption in Group I patients, n = 11, (Mean \pm SE)

Indices	Group I, n = 11
Hb, g/l	105.9 \pm 4.7
PaO ₂ , mm Hg	124.4 \pm 21.1
SaO ₂ , %	95.3 \pm 1.6
PCvO ₂ , mm Hg	53.2 \pm 5.4
SvO ₂ , %	76.2 \pm 4.1
PaCO ₂ , mm Hg	30.1 \pm 1.6
pH	7.27 \pm 0.06
AB, mmol/l	15.5 \pm 1.9
BB, mmol/l	34.9 \pm 3.3
BE, mmol/l	-11.6 \pm 3.5
A gap, mmol/l	34.9 \pm 3.3
Na ⁺ , mmol/l	146.4 \pm 3.6
K ⁺ , mmol/l	4.69 \pm 0.76
iCa ⁺⁺ , mmol/l	1.43 \pm 0.34
Cl ⁻ , mmol/l	105.8 \pm 2.4
Venous blood Lactate, mmol/l	6.51 \pm 2.17
Creatinine, mkmol/l	187.3 \pm 45.5
DO ₂ , l/min/m ²	517.9 \pm 44.0
VO ₂ , l/min/m ²	124.7 \pm 32.5
ITEO ₂ , %	21 \pm 4

Blood flow in *a. lienalis* in patients in Group I was not significantly different in comparison with indicators of Group II (Table 5). Blood flow in *v. portae* in Group I was characterized by statistically significant increase of maximum, minimum and average linear blood flow compared with Group II. Increase of volumetric flow only had a statistically unreliable tendency. Indicators in the splenic vein flow had no significant differences between the study groups (Table 6).

Thus, in our opinion, the changes in blood flow in the portal vein should be also considered as a compensatory reaction to increase the blood supply of the liver. Taking into account the background of septic shock, we can consider a growing need for oxygen because of indirect systemic inflammatory response among the reasons for increased blood flow of the liver. In compensatory reaction to the arterial hypotension, we can observe the activation of Kuepfer macrophages and synthesis of acute phase proteins.

In analysis of the indices of blood flow in the hepatic artery, we haven't found any significant differences between Groups I and II. However, the blood flow volume index and its relation to body weight in Group II in the upper mesenteric artery were significantly higher than in Group I. The presence of significant differences between the indicators HVI, DPI and HPR reflect the relatively higher proportion of blood supply to the liver with the portal system and relatively smaller one with the hepatic artery system together with a statistically unreliable tendency to increase the overall volume of hepatic blood flow (Table 7).

Table 5
State of blood flow in blood vessels (Mean \pm SE)

Indices	Group I, n = 11	Group II, n = 21	P
AH			
V_{max} , cm/s	90.8 \pm 18.1	63.7 \pm 3.1	0.008
V_{min} , cm/s	27.1 \pm 5.4	14.3 \pm 1.1	0.678
V_{mean} , cm/s	48.1 \pm 9.0	28.0 \pm 3.0	0.073
PI	1.30 \pm 0.11	1.61 \pm 0.06	0.135
IR	0.69 \pm 0.03	0.78 \pm 0.01	0.182
D, cm	0.28 \pm 0.03	0.32 \pm 0.03	0.786
Q, ml/min	249.8 \pm 47.4	291.8 \pm 44.1	0.212
Q/m, ml/min/m ²	20.5 \pm 5.2	20.4 \pm 1.4	0.030
AM			
V_{max} , cm/s	181.6 \pm 26.4	100.4 \pm 4.6	0.064
V_{min} , cm/s	21.4 \pm 2.1	25.8 \pm 9.0	0.064
V_{mean} , cm/s	74.8 \pm 9.7	50.6 \pm 7.2	0.057
PI	2.08 \pm 0.09	1.72 \pm 0.19	0.817
IR	0.87 \pm 0.02	0.76 \pm 0.07	0.807
D, cm	0.41 \pm 0.02	0.41 \pm 0.01	0.241
Q, ml/min	1075.4 \pm 237.9	698.0 \pm 149.1	0.315
Q/m, ml/min/m ²	75.3 \pm 11.1	46.6 \pm 4.5	0.378
AL			
V_{max} , cm/s	97.2 \pm 15.1	67.3 \pm 3.0	0.064
V_{min} , cm/s	26.2 \pm 4.0	17.9 \pm 1.3	0.064
V_{mean} , cm/s	50.1 \pm 7.5	31.2 \pm 3.3	0.057
PI	1.43 \pm 0.06	1.45 \pm 0.06	0.817
IR	0.73 \pm 0.02	0.73 \pm 0.01	0.807
D, cm	0.31 \pm 0.02	0.34 \pm 0.01	0.241
Q, ml/min	467.0 \pm 124.1	330.6 \pm 38.7	0.315
Q/m, ml/min/m ²	34.1 \pm 10.7	24.2 \pm 2.3	0.378

Table 6
State of blood flow in the portal and splenic veins (Mean \pm SE)

Indices	Group I, n = 11	Group II, n = 21	P
VP			
V_{max} , cm/s	29.1 \pm 4.2	16.6 \pm 0.7	0.010
V_{min} , cm/s	14.5 \pm 1.3	11.2 \pm 0.5	0.007
V_{mean} , cm/s	17.0 \pm 1.5	13.0 \pm 0.6	0.007
PI	0.45 \pm 0.03	0.42 \pm 0.02	0.122
IR	0.34 \pm 0.02	0.33 \pm 0.01	0.129
D, cm	0.56 \pm 0.05	0.58 \pm 0.02	0.356
Q, ml/min	489.9 \pm 95.0	328.0 \pm 32.5	0.131
Q/m, ml/min/m ²	38.0 \pm 9.5	24.5 \pm 1.3	0.178
VL			
V_{max} , cm/s	20.6 \pm 3.2	22.1 \pm 1.2	0.667
V_{min} , cm/s	16.2 \pm 3.0	16.2 \pm 1.1	0.998
V_{mean} , cm/s	17.7 \pm 3.1	18.2 \pm 1.1	0.881
PI	0.31 \pm 0.07	0.34 \pm 0.04	0.672
IR	0.24 \pm 0.04	0.27 \pm 0.03	0.534
D, cm	0.56 \pm 0.05	0.40 \pm 0.02	0.947
Q, ml/min	246.5 \pm 57.8	237.1 \pm 27.9	0.888
Q/m, ml/min/m ²	18.0 \pm 4.6	17.5 \pm 1.6	0.912

Table 7
Indices of portal blood flow in the hepatic and upper mesenteric arteries (Mean \pm SE)

Indices	Group I, n = 11	Group II, n = 21	P
IBC AH	1795.9 \pm 373.8	1202.8 \pm 168.5	0.175
IBC AM	7324.3 \pm 1423.6	2860.4 \pm 568.7	0.011
IBC/CI AH	47.8 \pm 9.0	28.3 \pm 5.0	0.083
IBC/CI AM	194.7 \pm 41.8	68.4 \pm 16.6	0.013
HVI, cm/s	16.7 \pm 2.2	6.7 \pm 0.3	0.001
LPI, %	67.6 \pm 21.2	78.0 \pm 7.4	0.667
DPI	0.35 \pm 0.03	0.50 \pm 0.05	0.012
CHBV, ml/min	739.7 \pm 136.4	563.4 \pm 41.2	0.220
HPR	0.56 \pm 0.08	0.74 \pm 0.09	0.025

No significant differences in blood flow parameters between Groups I and II were found. Indicators of blood flow in the left renal vein showed no differences between Groups I and II, except that the pulse index (PI) in patients of Group I with meningococcal septic shock was significantly higher than in Group II. Thus, in patients with septic shock of meningococcal etiology a substantial

and clinically significant renal venous vasoconstriction was observed (Table 8).

Table 8
State of blood flow in the left renal artery and vein (Mean \pm SE)

Indices	Group I, n=11	Group II, n=21	P
A _{ren} S			
V _{max} , cm/s	55.1 \pm 8.6	68.0 \pm 3.7	0.182
V _{min} , cm/s	14.9 \pm 2.8	16.8 \pm 1.3	0.539
V _{mean} , cm/s	28.3 \pm 4.5	33.8 \pm 1.7	0.257
PI	1.46 \pm 0.16	1.52 \pm 0.08	0.762
IR	0.72 \pm 0.04	0.75 \pm 0.02	0.546
V _{ren} S			
V _{max} , cm/s	19.8 \pm 3.0	17.2 \pm 0.9	0.402
V _{min} , cm/s	9.9 \pm 1.5	11.6 \pm 0.5	0.276
V _{mean} , cm/s	13.2 \pm 1.8	13.5 \pm 0.6	0.880
PI	0.73 \pm 0.15	0.41 \pm 0.03	0.042
IR	0.45 \pm 0.07	0.32 \pm 0.02	0.056

Basically, the results of our data on the specificity of venous vasoconstriction, which is mostly characterized by a decrease in

diastolic flow velocity and the development of acute kidney damage are similar to those of other researchers (Fig. 1). Correlation analysis of indicators of renal venous flow revealed the presence of significant connection between V_{min} in the renal vein and creatinine (R = -0.840, P < 0.05). The Pulse Index of renal veins in Group II never exceeded the mark of 0.53 (Max = 0.53, Min = 0.22) (Fig. 2). To assess the impact of vasoactive mediators on blood flow distribution to different vascular zones, we explored the content of total serum metabolites of nitric oxide (NO₂⁻ + NO₃⁻) and concentration of endothelin I in blood. It was found that children in Group I had a significant increase of nitric oxide metabolites in comparison to those in Group II. Despite a tendency to slight increase of endothelin I concentration in Group I, there were no significant difference between the groups (Table 9).

Table 9
Content of NO final metabolites and serum lactate (Mean \pm SE)

Indices	Group I, n=11	Group II, n=21	P
The total NO metabolites, mkmol/l	51.3 \pm 8.3	29.3 \pm 2.5	0.014
Endothelin I, pmol/l	0.70 \pm 0.35	0.24 \pm 0.01	0.264

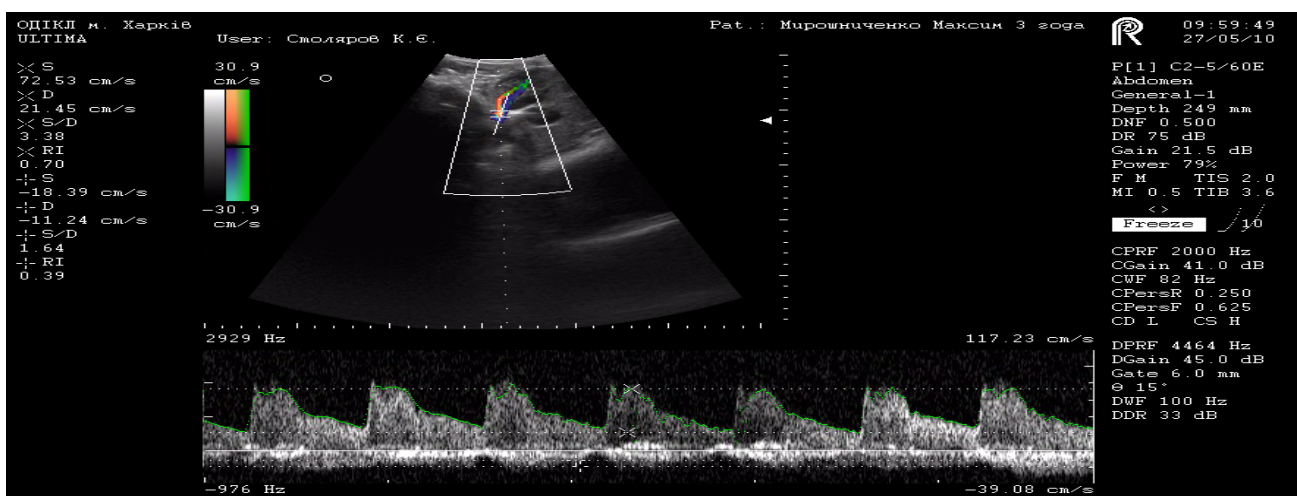


Fig. 1. Renal blood flow in baby with septic shock

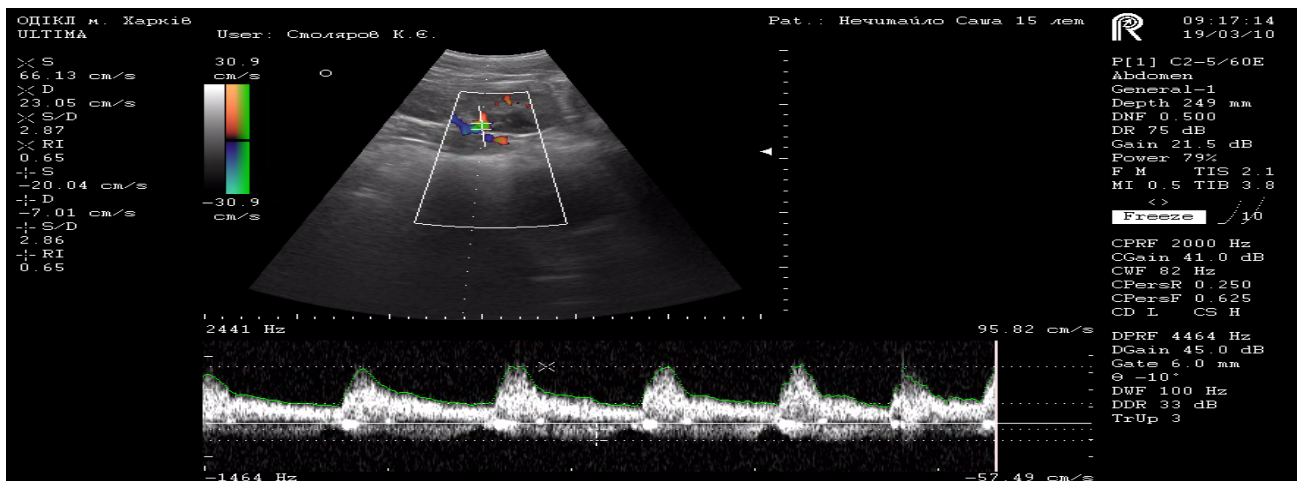


Fig. 2. Renal blood flow in healthy child

In order to determine the presence of relations between the states of regional blood flow, we conducted a correlation analysis of systemic inflammatory response, severity and studied vasoactive mediators. This analysis revealed strong positive relations between cumulative NO metabolites, speed of blood flow through the vessels in the splanchnic zone, diameter of vessels, pulse index and index of resistance. The direction of these connections testified the dependence of the vascular zone on NO, which has the ability of NO to cause vasodilation in liver and upper mesenteric artery,

splenic and portal veins. The direct relation of NO with the number of polymorphic nuclear neutrophils and reverse assessment scale of PRISM may indicate the increased production of NO which has a positive impact on patients recovering from meningococcal septic shock. Unlike NO, the endothelin correlation with indicators of vascular tone is evidence of its vasoconstrictive effect. Besides, endothelin had a direct relation with C-reactive protein. Based on our obtained data, we set ourselves the question about the role of cardiac output in influence on the performance of regional circulation.

In order to answer this question, we conducted a correlation analysis between the cardiac output measure and those indicators that demonstrated a close correlation with vasoactive mediators. In none of the cases did the SO have significant correlations with indicators of regional blood flow and systemic inflammatory response or severity of the examined patients' status (Table 10). We haven't found any significant correlation between indicators of central hemodynamics and NO, which may probably refute the traditional view of the ability of NO to cause myocardial depression in sepsis (Table 11).

Table 10

Correlation between cardiac output, vasoactive mediators, indicators of organ blood flow, systemic inflammatory response and the severity of Group I

Indices	R	P
V _{min} AH – CO	-0.200	> 0.05
V _{min} AH – NO	-0.710	< 0.05
IR VP – CO	-0.083	> 0.05
IR VP – NO	-0.738	< 0.05
PI VP – CO	-0.083	> 0.05
PI VP – NO	-0.738	< 0.05
D AM – CO	0.368	> 0.05
D AM – NO	0.826	< 0.05
V _{max} VL – CO	0.000	> 0.05
V _{max} VL – NO	0.785	< 0.05
V _{min} VL – CO	0.000	> 0.05
V _{min} VL – NO	0.780	< 0.05
V _{mean} VL – CO	0.000	> 0.05
V _{mean} VL – NO	0.780	< 0.05
PRISM – CO	0.118	> 0.05
PRISM – NO	-0.952	< 0.05
Polymorphonuclear neutrophils – CO	0.358	> 0.05
Polymorphonuclear neutrophils – NO	0.845	< 0.05
IR VL – CO	-0.283	> 0.05
IR VL – endothelin I	0.730	< 0.05
PI VL – CO	-0.283	> 0.05
PI VL – endothelin I	0.730	< 0.05
D AL – CO	0.193	> 0.05
D AL – endothelin I	-0.672	< 0.05
D VP – CO	-0.122	> 0.05
D VP – endothelin I	-0.666	< 0.05
IR VL – CO	-0.283	> 0.05
IR VL – endothelin I	0.732	< 0.05
PI VL – CO	-0.283	> 0.05
PI VL – endothelin I	0.732	< 0.05
C-reactive protein – CO	-0.383	> 0.05
C-reactive protein – endothelin I	0.808	< 0.05

Table 11

Correlation between indicators of central hemodynamics and NO metabolites in the Group I

Indices	R	P
MAP – NO	0.443	> 0.05
EDLVD – NO	0.060	> 0.05
ESLVD – NO	0.059	> 0.05
SV – NO	0.084	> 0.05
CO – NO	0.071	> 0.05
EF – NO	0.132	> 0.05
SVRI – NO	0.500	> 0.05

Thus, our obtained data on the state of central hemodynamics of children with meningococcal septic shock in general are similar to the work of Have et al. (2000) – the only ultrasound research conducted on hemodynamics in meningococcus infected children, which also showed a significant reduction in left ventricular systolic function and its prognostic significance in poor output. However, our findings may create a discussion on important role of hypovolemia in the development of septic shock in children. Identifying the truth on this matter is extremely important, because the current existing recommendations on the management of septic shock (including meningococcal shock in children) give preference to aggressive infusion therapy as the first step in treatment (Brierley et al., 2009; Nadel, 2016). However, the results of our studies show

the negative effects of aggressive infusion in patients with systolic heart failure! At the same time, we observe another approach to using infusion therapy in adults with septic shock, which includes minimization of the liquid volumes (Malbrain et al., 2014; Malbrain et al., 2015; Chen and Kollef, 2015). In a recent published study, the benefits of restrictive fluid therapy in comparison with standard infusion at septic shock in adults were presented (Hjortrup et al., 2015). The study RENAL showed that negative daily water balance was associated with clinical improvement in these patients (Bellomo et al., 2012).

The researched changes in the regional blood flow distribution in the splanchnic areas in patients with meningococcal septic shock indicate that the organs in splanchnic areas are not exposed to ischemia. On the contrary, in terms of early septic shock we found hyper perfusion on the basin of the upper mesenteric artery and increase (mainly due to portal) of total hepatic blood flow, which may well reflect increased oxygen need in the liver and intestine. The latter could be reached through the activation of immune cells (associated with intestine lymphoid tissue and liver Kuepfer macrophages) and their participation in the systemic inflammatory response. Also hemodynamic lesion of these organs may rather be due to the hyper perfusion than ischemia. The same applies to the kidneys. The role of direct prerenal ischemia in the development of acute kidney damage in sepsis is becoming more doubtful. Kidney damage and venous hypertension indicate intraorganic microcirculatory disorders, which were proven in the form of the pulse growth index of the main renal veins found in our study (Zarbok et al., 2014).

The role of NO molecules in meningococcal septic shock should be revised. The image of "sinister monster" responsible for cardiac dysfunction and uncontrolled arterial hypotension in septic shock should be rejected, because NO played a leading role in maintaining microcirculation and perfusion in vital parts of the vascular system (Duran-Bedolla et al., 2014). This is proved by the leading foreign publications, as well as the results of correlation analysis in our study. Unlike the current Guidelines SSC (2016), the data we obtained can be a theoretical basis for the application of NO donor in complex intensive therapy of hemodynamic disorders associated with meningococcal septic shock with the aim of improving the outcomes.

Conclusions

Meningococcal septic shock in children is characterized by significant impairment of the central hemodynamics, which consists in lowering blood pressure, tachycardia, and suppression of left ventricular systolic function. The data we have obtained on the nature of hemodynamic disorders in children suffering from meningococcal septic shock should be used to substantiate a more cautious approach to infusion therapy and earlier use of drugs with positive inotropic effects.

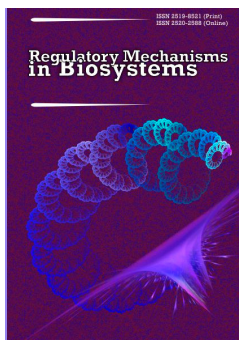
Given the significant increase of NO production, which correlates with splanchnic circulation indicators, we can assume that hyperproduction of NO and hyperperfusion in the splanchnic zones play a protective role against the development of organ failure, because they are associated with a lower score on the PRISM scale.

The increased resistance index in the main renal veins in patients with meningococcal septic shock is closely correlated with the creatinine level, so it can be used as a non-invasive sign of acute kidney injury. In contrast to the recommendations of the Surviving Sepsis Campaign (2016) concerning the undesirable use of arginine to increase the level of NO in adults with septic shock, the use of arginine and other donors of NO in children with meningococcal septic shock should be the subject of further research.

References

- Bellomo, R., Cass, A., Cole, L., Finfer, S., Gallagher, M., Lee, J., Lo, S., McArthur, C., McGuinness, S., Norton, R., Myburgh, J., Scheinkestel, C., & Su, S. (2012). An observational study fluid balance and patient outcomes

- in the randomized evaluation of normal vs. augmented level of replacement therapy trial. *Critical Care Medicine*, 40(6), 1753–1760.
- Bernal, W. (2016). The liver in systemic disease: Sepsis and critical illness. *Clinical Liver Disease*, 7(4), 88–91.
- Boisrame-Helms, J., Kremer, H., Schini-Kerth, V., & Meziani, F. (2013). Endothelial dysfunction in sepsis. *Current Vascular Pharmacology*, 11(2), 150–160.
- Carcillo, J. A., & Fields, A. I. (2002). Clinical practice parameters for hemodynamic support of pediatric and neonatal patients in septic shock. *Critical Care Medicine*, 30(6), 1365–1378.
- Di Lorenzo, A. N., & Schell, R. M. (2014). Morgan Mikhail's clinical anesthesiology, 5th Edition. *Anesthesia and Analgesia*, 119(2), 495–496.
- Chen, C., & Kollef, M. H. (2015). Targeted fluid minimization following initial resuscitation in septic shock. *Chest*, 148(6), 1462–1469.
- Corrêa, T. D., Filho, R. R., Assunção, M. S. C., Silva, E., & Lima, A. (2017). Vasodilators in septic shock resuscitation. *Shock*, 47(3), 269–275.
- De Backer, D., Orbeago Cortes, D., Donadello, K., & Vincent, J. L. (2013). Pathophysiology of microcirculatory dysfunction and the pathogenesis of septic shock. *Virulence*, 5(1), 73–79.
- De Backer, D., Donadello, K., Sakr, Y., Ospina-Tascon, G., Salgado, D., Scolletta, S., & Vincent, J. L. (2013). Microcirculatory alterations in patients with severe sepsis. *Critical Care Medicine*, 41(3), 791–799.
- Dellinger, R. P., Levy, M. M., Rhodes, A., Annane, D., Gerlach, H., Opal, S. M., Sevransky, J. E., Sprung, C. L., Douglas, I. S., Jaeschke, R., Osborn, T. M., Nunnally, M. E., Townsend, S. R., Reinhart, K., Kleinpell, R. M., Angus, D. C., Deutschman, C. S., Machado, F. R., Rubenfeld, G. D., Webb, S. A., Beale, R. J., Vincent, J. L., & Moreno, R. (2013). Surviving sepsis campaign. *Critical Care Medicine*, 41(2), 580–637.
- Duran-Bedolla, J., de Oca-Sandoval, M. A. M., Saldana-Navor, V., Villalobos-Silva, J. A., Rodriguez, M. C., & Rivas-Arancibia, S. (2014). Sepsis, mitochondrial failure and multiple organ dysfunction. *Clinical and Investigative Medicine*, 37(2), 58–69.
- Gomez, H., Ince, C., De Backer, D., Pickkers, P., Payen, D., Hotchkiss, J., & Kellum, J. A. (2014). A unified theory of sepsis-induced acute kidney injury. *Shock*, 41(1), 3–11.
- Hamborsky, J., & Kroger, A. (Eds.). (2015). *Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases*. Public Health Foundation, 512.
- Hagmolen of ten Have, W., Wiegman, A., van den Hoek, G. J., Vreede, W. B., & Derkx, H. H. F. (2000). Life-threatening heart failure in meningococcal septic shock in children: Non-invasive measurement of cardiac parameters is of important prognostic value. *European Journal of Pediatrics*, 159(4), 277–282.
- Hjortrup, P. B., Haase, N., Bundgaard, H., Thomsen, S. L., & Winding, R. (2016). Restricting volumes of resuscitation fluid in adults with septic shock after initial management: The CLASSIC randomised, parallel-group, multicentre feasibility trial. *Intensive Care Medicine*, 42(11), 1695–1705.
- Ince, C., Mayeux, P. R., Nguyen, T., Gomez, H., Kellum, J. A., Ospina-Tascón, G. A., & De Backer, D. (2016). The endothelium in sepsis. *Shock*, 45(3), 259–270.
- Lupp, C., Baasner, S., Ince, C., Nocken, F., Stover, J. F., & Westphal, M. (2013). Differentiated control of deranged nitric oxide metabolism: A therapeutic option in sepsis? *Critical Care*, 17(3), 311.
- Malbrain, M. L. N. G., Marik, P. E., Witters, I., Cordemans, C., Kirkpatrick, A. W., Roberts, D. J., & Van Regenmortel, N. (2014). Fluid overload, de-resuscitation, and outcomes in critically ill or injured patients: A systematic review with suggestions for clinical practice. *Anestezjologia Intensywna Terapia*, 46(5), 361–380.
- Malbrain, M. L. N. G., Van Regenmortel, N., & Owczuk, R. (2015). It is time to consider the four D's of fluid management. *Anestezjologia Intensywna Terapia*, 47, 1–5.
- Nadel, S. (2016). Treatment of meningococcal disease. *Journal of Adolescent Health*, 59(2), S21–S28.
- Prin, M. (2015). Hepatosplanchnic circulation in cirrhosis and sepsis. *World Journal of Gastroenterology*, 21(9), 2582.
- Rhodes, A., Evans, L. E., Alhazzani, W., Levy, M. M., Antonelli, M., Ferrer, R., Kumar, A., Sevransky, J. E., Sprung, C. L., Nunnally, M. E., Rochberg, B., Rubenfeld, G. D., Angus, D. C., Annane, D., Beale, R. J., Bellinhan, G. J., Bernard, G. R., Chiche, J. D., Coopersmith, C., De Backer, D. P., French, C. J., Fujishima, S., Gerlach, H., Hidalgo, J. L., Hollenberg, S. M., Jones, A. E., Kamad, D. R., Kleinpell, R. M., Koh, Y., Lisboa, T. C., Machado, F. R., Marini, J. J., Marshall, J. C., Mazuski, J. E., McIntyre, L. A., McLean, A. S., Mehta, S., Moreno, R. P., Myburgh, J., Navalesi, P., Nishida, O., Osborn, T. M., Perner, A., Plunkett, C. M., Ranieri, M., Schorr, C. A., Seckel, M. A., Seymour, C. W., Shieh, L., Shukri, K. A., Simpson, S. Q., Singer, M., Thompson, B. T., Townsend, S. R., Van der Poll, T., Vincent, J. L., Wiersinga, W. J., Zimmerman, J. L., Dellinger, R. P. (2017). Surviving sepsis campaign: International guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016. *Intensive Care Medicine*, 74.
- Sadarangani, M., Scheifele, D. W., Halperin, S. A., Vaudry, W., Le Saux, N., Tsang, R. (2015). Outcomes of invasive meningococcal disease in adults and children in Canada between 2002 and 2011: A prospective cohort study. *Clinical Infectious Diseases*, 60(8), e27–e35.
- Schnell, D., Deruddre, S., Harrois, A., Pottecher, J., Cosson, C., Adoui, N., Benhamou, D., Vicaud, E., Azoulay, E., Duranteau, J. (2012). Renal resistive index better predicts the occurrence of acute kidney injury than cystatin C. *Shock*, 38(6), 592–597.
- Viner, R. M., Booy, R., Johnson, H., Edmunds, W. J., Hudson, L., Bedford, H., Kaczmarski, E., Rajput, K., Ramsay, M., Christie, D. (2012). Outcomes of invasive meningococcal serogroup B disease in children and adolescents (MOSAIC): A case-control study. *The Lancet Neurology*, 11(9), 774–783.
- Zhao, Y., Vanhoutte, P. M., & Leung, S. W. S. (2015). Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *Journal of Pharmacological Sciences*, 129(2), 83–94.
- Zarbock, A., Gomez, H., & Kellum, J. A. (2014). Sepsis-induced acute kidney injury revisited. *Current Opinion in Critical Care*, 20(6), 588–595.



Ultrastructural changes in biofilm forms of staphylococci cultivated in a mixed culture with lactobacilli

G. Lavryk, O. Korniychuk, M. Tymkiv

Danylo Halytskyi Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

Article info

Received 19.01.2017

Received in revised form
17.02.2017

Accepted 20.02.2017

Danylo Halytskyi Lviv
National Medical University,
Pekarska Str., 69, Lviv,
79000, Ukraine
E-mail: lavrykgal@gmail.com

Lavryk, G., Korniychuk, O., & Tymkiv, M. (2017). Ultrastructural changes in biofilm forms of staphylococci cultivated in a mixed culture with lactobacilli. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8(1), 98–103. doi: 10.15421/021717

The capacity of opportunistic bacteria for biofilm formation plays an important role in the development of chronic inflammatory processes, which are difficult to treat. To improve antimicrobial therapy methods, the influence of lactobacilli on the ultrastructure of biofilm-forming clinical strains of staphylococci when co-cultured was investigated. 5 biofilm-forming clinical strains of *S. aureus* from the skin of acne vulgaris patients ($n = 24$) were isolated. Using transmission electron microscopy (TEM) the morphological changes of *S. aureus* cells in the mixed culture with standard strains of *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 and clinical strains of *L. fermentum* ($n = 4$) were studied. It was found that in 48 hours after the inoculation on the medium of samples of mixed cultures of *L. plantarum* 8P-A3 and *S. aureus* growth of staphylococci was not revealed. Only in some cases of mixed cultures of *L. fermentum* and biofilm-forming staphylococci was growth of *S. aureus* obtained. In electron diffraction patterns of control samples of 24-hour staphylococcal monocultures and 48-hour lactobacilli monocultures, natural development of the population at the cellular level was observed. Destructive changes under the influence of lactobacilli (probiotic and clinical strains) were detected in all ultrathin sections of the cells of biofilm-forming and planktonic staphylococci. Significant destructive changes in the cell wall of the staphylococci were observed: thickening, obtaining of irregular form, detachment of the cytoplasmic membrane, the complete destruction of the peptidoglycan layer and the emergence of "shadow cells". On all electron diffraction patterns fibrillar-threadlike structures of DNA could not be observed, but in some cases mesosome-like formations were poorly contrasted. It was established that the surface S-layer of lactobacilli was expressed on a significantly larger scale in the mixed culture with staphylococci. In mixed culture of clinical strains of lactobacilli with biofilm form of *S. aureus*, staphylococcal cells could be found in a dormant state. Thanks to an experimental model of biofilm in a mixed culture, the development of destructive changes of staphylococci under the influence of the lactobacilli both on the morphological and at the population levels has been assessed. The results obtained can be used in improving the schemes of complex antimicrobial therapy of pyoinflammatory processes with the use of biological preparations, which are composed of lactobacilli, including those in the form of local application.

Keywords: biofilm; *Lactobacillus*; *Staphylococcus aureus*; transmission electron microscopy

Introduction

Staphylococci, as ubiquitous opportunistic microorganisms, colonize the skin of the mucous membranes of many human body ecosystems (nasopharynx and oropharynx, gastrointestinal tract, vagina) (Wertheim et al., 2005). The carriage of staphylococci in the human population is over 20% (Kluytmans et al., 1997; Dall'Antonia et al., 2005). *Staphylococcus aureus* biofilm formation is a serious problem in nosocomial infections, and especially in the development of resistance to the majority of existing antibiotics. It should be stated that the ability to colonize and form biofilms on medical implants, catheters, endotracheal tubes, leads to the emergence of serious catheter-ventilator-associated infectious complications, sepsis (Reid, 1999; Weinstein and Darouiche, 2001; Ghannoum and O'Toole, 2004; Pal et al., 2007; Eftekhari and Mirmohamadi, 2009; Revdiwala et al., 2012; Nair et al., 2014). Furthermore, 60–65% of infections of the respiratory and urinary tract, osteomyelitis, endocarditis, cystic fibrosis, periodontitis, sores, etc. are caused by biofilm forms of bacteria (Hall-Stoodley and Stoodley, 2009; Wang et al., 2010). *S. aureus* is a major cause of development of persistent, chronic pyoinflammatory infections (Otto, 2008; Hall-Stoodley and Stoodley, 2009; Gostev and Sido-

renko, 2010). Biofilm microbiota, being in a symbiotic relationship with the macroorganism, create a powerful biological barrier, which prevents colonization of the epithelium by pathogenic microorganisms and ensures the preservation of its own microflora in natural human biotopes (Shyrobokov et al., 2009; He et al., 2011). It was found that human commensal microorganisms, being a part of the skin microbiocenoses, intestines, mucous, form complex interspecific communities (Hall-Stoodley and Stoodley, 2009; Harriott and Noverr, 2009). These formations are social systems characterized by certain co-operation and functional specialization, controlled by the QS-system (quorum sensing). Global regulation ensures the formation of biofilm, as well as increased bacterial adhesion, the beginning of the synthesis of the factors associated with the antagonistic activity for representatives of indigenous microflora and the manifestation of the pathogenicity for opportunistic microflora (MacFarlane, 2008; Bondarenko, 2011).

Lactobacilli are essential symbionts and members of various human body ecosystems. Anti-staphylococcal activity of lactobacilli strains is carried out by the production of nonspecific antimicrobial metabolites, such as organic acids including lactic, acetic, propionic and butyric, hydrogen peroxide, lysozyme and bacteriocin-like inhi-

biting substances (BLIS), biosurfactants (glycolipids, rhamnolipids, lipopeptides, polysaccharide-protein complexes, phospholipids, fatty acids and neutral lipids) (Dworkin et al., 2006; Varma et al., 2010, 2011; Dobson et al., 2012).

The efficacy of probiotic preparations containing lactobacilli is largely due to the activity of various antimicrobial agents, including biosurfactants (Velraeds et al., 1996), which introduce a powerful intervention into biofilm communities by changing the surface properties of bacterial cells, reduce their adhesion (Ahimou et al., 2000) and hinder the development of biofilms and intercellular interaction (Rasmussen and Givskov, 2006; Valle et al., 2006).

Consequently, the metabolites of lactobacilli are able to inhibit biofilm formation and cause ultrastructural changes in *S. aureus* and *S. epidermidis* cells, which leads to their death (Varma et al., 2011).

The aim of this study is to investigate the influence of lactobacilli on the ultrastructure of biofilm-forming clinical strains of staphylococci when co-cultured.

Materials and methods

For the investigation, 5 biofilm-forming clinical strains, isolated from the skin of acne vulgaris patients (n = 24), were selected. Primary selection of the strains was carried out on the basis of changes in their culture properties, including expressed increase in colony viscosity. Thus the proportion of biofilm-forming forms was 20.8%. The strains of *Lactobacillus fermentum* (n = 4) were isolated from the mucosa of the upper respiratory tract of healthy patients. Isolation and identification of staphylococci were performed using standard nutrient medium in the laboratory of the microbiology department of Danylo Halytskyi Lviv National Medical University according to the conventional techniques (Birger, 1982; Vos et al., 2009).

Staphylococcal biofilm formation was performed at the bottom of plastic cups (Ø 50 mm) using nutrient broth ("Farmactiv", Ukraine), biofilm of lactobacilli – using MRS-broth (de Man, Rogosa, Sharpe, India). 4 ml of broth and 10 µl of culture with turbidity $1,5 \times 10^9$ CFU/ml (corresponding to 5 McFarland units according to the standard) were added to each cup, in such a way that the suspension was uniformly distributed on the bottom of the cups. The cups with the staphylococci inoculations were placed in an incubator for 24 hours and the plates

Table

The dynamics of microorganisms growth after inoculation from biofilm

Bacterial strains associants	inoculated dose	0 h	The number of microorganisms, CFU/ml		
			the growth after inoculation from structured biofilm		
			12 h	24 h	48 h
<i>L. plantarum</i> 8P-A3 and <i>S. aureus</i> ATCC 25923	10^9 (1:1)	0* $(4.7x \pm 0.02) \times 10^8$	$(1.1 \pm 0.09) \times 10^4$ $(1.2 \pm 0.01) \times 10^6$	3×10^7 $(1.35 \pm 0.09) \times 10^2$	$(0.9 \pm 0.08) \times 10^{12}$ * 0*
<i>L. plantarum</i> 8P-A3 and <i>S. aureus</i> ATCC 12228	10^9 (1:1)	0* $(4.8x \pm 0.02) \times 10^8$	$(1.3 \pm 0.08) \times 10^4$ $(2.0 \pm 0.02) \times 10^6$	10^8 75 ± 0.56	$(1.0 \pm 0.1) \times 10^{12}$ 0*
<i>L. fermentum</i> , N = 4	10^9	0*	$(1.5 \pm 0.08) \times 10^4$	1.5×10^8	$0.85 \pm 0.09) \times 10^{12}$ *
<i>S. aureus</i> (biofilm-forming form), N = 5	(1:1)	$(4.6x \pm 0.02) \times 10^8$	$(8.7 \pm 0.07) \times 10^6$	$(1.35 \pm 0.09) \times 10^2$	$(1.8 \pm 0.2) \times 10^2$ *
<i>L. fermentum</i> , N = 4	10^9	0*	3×10^4	1.5×10^7	$(1.0 \pm 0.08) \times 10^{12}$ *
<i>S. aureus</i> ATCC 12228	(1:1)	$(4.5x \pm 0.02) \times 10^8$	$(1.2 \pm 0.04) \times 10^6$	$(2.0 \pm 0.10) \times 10^3$	0*

Note: statistically significant difference compared to control strains * – $P < 0.05$.

Growth of lactobacilli was absent. In isolation of cultures from structured biofilm samples association *L. plantarum* 8P-A3 as with the standard biofilm-forming strain of *Staphylococcus* and non-biofilm form strain after 12 hours, the number of lactobacilli was $1.1 \pm 0.09 \times 10^4$ and $1.3 \pm 0.08 \times 10^4$ CFU/ml, respectively, with an increase in the number of staphylococci to (1.2 ± 0.015) and $(2.0 \pm 0.03) \times 10^6$ CFU/ml. After 24 hours, the number of viable staphylococci rapidly decreased to (2.3 ± 0.02) and $(2.0 \pm 0.04) \times 10^3$ CFU/ml, and lactobacilli – increased to 10^{7-8} CFU/ml.

The trend in the nature of isolation from biofilm structures of clinical isolates *L. fermentum* and *S. aureus* association was similar but more active isolation of both associant species was registered after 12 hours. After 24 hours the number of isolated *L. fermentum* was somewhat reduced in comparison with the activity of probiotic

with the lactobacilli inoculations placed in an incubator for 48 hours, both at a temperature of 37 °C. After this exposure, the residual medium was collected from the cups in order not to destroy the existing biofilm and was washed with distilled water three times.

Similarly mixed cultures of *Staphylococcus* and Lactobacilli in MRS-broth were formed within 48 hours at 37 °C. For this 4 ml of the mentioned medium and 5 µl of lactobacilli and the staphylococcal suspension with density $1,5 \times 10^9$ CFU/ml were added to the plastic cups. As a control, a live culture of *Lactobacillus plantarum* 8P-A3, which is included in the composition of a probiotic preparation "Lactobacterin", which was obtained by cultivation in micro-aerophilic conditions first in thioglycollate medium and then on MRS-agar, was used. The standard film-forming strain of *S. aureus* ATCC 25923 and not the film-forming strain of *S. aureus* ATCC 12228, were used to determine a benchmark.

To determine the number of viable cells both the staphylococci and lactobacilli in mixed cultures of biofilms, inoculations of 10 µl on the solid medium immediately after the inoculation and at 12, 24, 48 hours were produced. In the case of a high density of the received culture it was diluted before the inoculation, which made it possible to set the number of germinated colonies.

Preparation of samples for transmission electron microscopy (TEM) was performed by classical methods (Weekly, 1975; Goldstein et al., 1984). They were viewed in the transmission electron microscope PEM-100-01 at a voltage of 75 kV at magnifications from $\times 1,000$ to $\times 30,000$.

Statistical analysis of experimental data was performed using Excel for PC. The significance of the difference between the two rates was assessed by Student's test. The difference was considered significant at $P < 0.05$.

Results and discussions

Comparison of capacities for isolation from mixed cultures in a nutrient medium and in conditions of the biofilm structure modeling was conducted. Controlling inoculation on the solid medium immediately after the inoculation in all samples of mixed cultures has demonstrated the presence of staphylococci in an amount, close to the inoculated dose from (4.5 ± 0.02) to $(4.8 \pm 0.04) \times 10^8$ CFU/ml (Table).

Inhibition of *Staphylococcus* growth to $(1.35 \pm 0.09) \times 10^2$ (biofilm form) was also observed and this inhibition was even more pronounced with the non-biofilm forming standard strain of staphylococci – 75 ± 0.56 CFU/ml. In 48 hours after the inoculation on the medium lactobacilli, were isolated from all samples, and reached the quantitative level 10^{12} . Isolation of staphylococcus was discontinued, except for *L. fermentum* and *S. aureus* (biofilm form, the number $(1.8 \pm 0.2) \times 10^2$) and the growth of individual colonies of clinical isolates of staphylococci in the modeling of biofilm was registered ($P < 0.05$). Thus, clinical strains of lactobacilli adapted to the conditions of the organism are actively reproduced *in vitro*, being sufficiently effective antagonists under the conditions of biofilm. However, quantitatively, lactic acid lactobacilli promote more rapid death of staphylococci in a mixed culture. The studies also show higher

potential of preservation of the viability of biofilm form bacteria in the bi-species biofilm. To assess the nature of the cell damage in the staphylococci in the mixed culture with the lactobacilli, the ultrastructure of these species of bacteria was studied in biofilm modeling conditions. In analyzing electron diffraction patterns in control samples of 24-hour

film-forming monocultures and planktonic *Staphylococcus* and 48-hour lactobacilli, natural development of the population at the cellular level was observed (Fig. 1a–c). Cells were visualized at different stages of morphogenesis: separation with forming cytoplasmic wall, at rest, as well as with complete and partial autolysis (Fig. 1b).

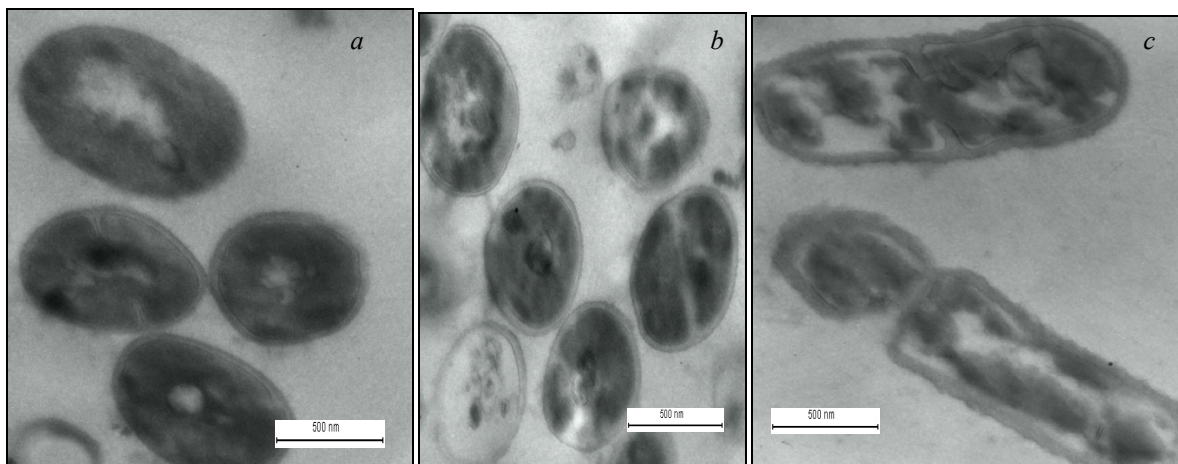


Fig. 1. Microphotography (TEM) of staphylococci and lactobacilli monocultures: (a) planktonic form of *S. aureus* ATCC 12228, (b) biofilm form of *S. aureus* ATCC 25923 at different stages of cell development, (c) clinical strain of *L. fermentum*

In most cells, a characteristic ultrastructural organization was observed: thick peptidoglycan layer, cytoplasmic membrane, nucleoid located diffusely in the form of light fibrillar-threadlike DNA structures, mesosomes (vesicular and lamellar membrane structures) in the place of septum formation. With almost all ultrathin sections of lactobacilli cells, the surface S-layer is visible. Only in the mixed culture of lactobacilli with staphylococci is it expressed on a significantly larger scale (Fig. 2c).

Comparing the electron diffraction patterns of 48-hour staphylococcal monocultures and cultures mixed with lactobacilli in the composition of biofilms, significant destructive changes in the ultrastructure of staphylococcal cells were observed (Fig. 2). Destabilization of the cell wall was manifested in its thickening, in the irregular form acquired by the cocci, detachment of the cytoplasmic membrane from the cell wall (Fig. 2f) and in the complete destruction of the peptidoglycan layer (Fig. 2a, e). Cell wall ruptures with the outflow of cell content were also recorded (Fig. 2b, e), which leads to a complete loss of colloid and corresponding protoplasmic structures and appearance of "shadow-cells" (Fig. 2d). Due to the high electron density of the cytoplasm in the nucleoid zone, it was impossible to observe characteristic pronounced fibrillar-threadlike structures of DNA, in some electron diffraction patterns mesosome-like formations were poorly contrasted. Such destructive changes were detected in all the ultrathin sections of cells of biofilm-forming and planktonic staphylococci induced by probiotic (Fig. 2g, h) as well as clinical lactobacilli (Fig. 2a–e).

It is known that bacterial cells, growing in adverse conditions of a natural or artificial environment, such as the depletion of nutrients, oxygen, inadequate pH, etc. can be transformed into uncultivated (VBNC – viable but non-culturable) forms with a slow metabolism, but preserving their viability. The uncultivated state is characterized by a number of molecular, structural and functional characteristics of the biofilm (Lleo et al., 2007; Stewart and Franklin, 2008; Oliver, 2010; Trevors, 2011).

VBNC forms are in transient dormancy condition and are orientated towards adaptation to stress and are associated with significant dwarfism of cells, as well as the inability to grow on nutrient media. Nevertheless, uncultivated cells that retain a certain degree of metabolic activity can be restored in cultivated states with the help of appropriate stimulation (Oliver, 2010; Trevors, 2011; Zandri et al., 2012).

Our studies have shown that in the case of a combination of a biofilm form of *S. aureus* and clinical strains of lactobacilli dormant

staphylococci cells are found in the field of view (Fig. 2a). Difficulties in the treatment of many bacterial infections are associated with formation of biofilm by microorganisms in the patient, which plays an important role in clinical medicine (Chebotar et al., 2010; Qu et al., 2010). One way to improve the effectiveness of antimicrobial therapy of diseases caused by staphylococci, is the use of tools that contribute to the disintegration of the biofilm to the transition of the pathogen in planktonic form. Microorganisms-antagonists in composition of eubiotic preparations, particularly, lactobacilli may be used for this (Samot and Badet, 2013; Lee and Kim, 2014; Nair et al., 2014).

Different *Lactobacillus* species are part of the natural human body biosystems and participate in the formation of multispecies biofilms which contain two or more members within the association. It has been proved that *L. reuteri*, on the basis of which a large number of probiotics are created, can prevent reproduction of pathogenic bacteria and restore the natural biofilm of the urogenital tract in women (Whitchurch et al., 2002; Younes et al., 2012).

The bacterial cell wall and its associated proteins mediate the interaction between the environment and the cytoplasm of microbial cells. It acts as a structural barrier against the action of toxic chemicals, protects the cell from changing environmental conditions and plays an important role in infection and pathogenicity (Dmitriev et al., 2004). Changes in cell wall thickness take place under the influence of various factors. In particular, its thickening has been fixed among strains of antibiotic-resistant *S. aureus* in the presence of antibiotics (Cui et al., 2000; Cui et al., 2003; Kim et al., 2012). Increase in the thickness of the cell wall and its changes in biochemical composition have also been obtained under the influence of cold stress (Onyango et al., 2012). The phenomenon of "shadow cells" with the release of cellular material outside is described in the study of the damaging effect of silver on *Pseudomonas aeruginosa* using TEM. The results obtained are confirmed by the scanning electron microscopy (SEM): the complete loss of cell membranes with disintegration of intracellular material was recorded in the processed cells (Dosunmu et al., 2015). Similar investigations on the study of the silver ions mechanism of action were carried out on cultures of *S. aureus* and *Escherichia coli*. In gram-positive and gram-negative bacteria cell wall damage, the release of cell content, complete or partial separation of the cytoplasmic membrane from the cell wall, and decrease in electron density in the cytoplasm were identified (Jung et al., 2008). The interaction between the silver and the components of bacterial membrane

causes structural changes and damage to membranes and intracellular metabolic activity, which may be the cause or the consequence of cell lysis (McDonnell et al., 1999; Sondi and Salopek-Sondi, 2004; Pal et al., 2007). Antiadhesive, antimicrobial and antibiofilm influence of biosurfactants produced by strains of *L. jensenii* and *L. rhamnosus*, in respect to a number of bacteria with clinical multidrug resistance (*Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus*

aureus (MRSA)), which can form biofilms on wounds, medical implants and industrial surfaces was revealed. Confirmation of TEM has shown cell wall damage and the appearance of shadow-cells (Sambanthamoorthy et al., 2014).

Comparing our results with those of other researchers, it may be suggested that such reaction of the cell wall may be common to bacterial cells under the influence of different stress factors.

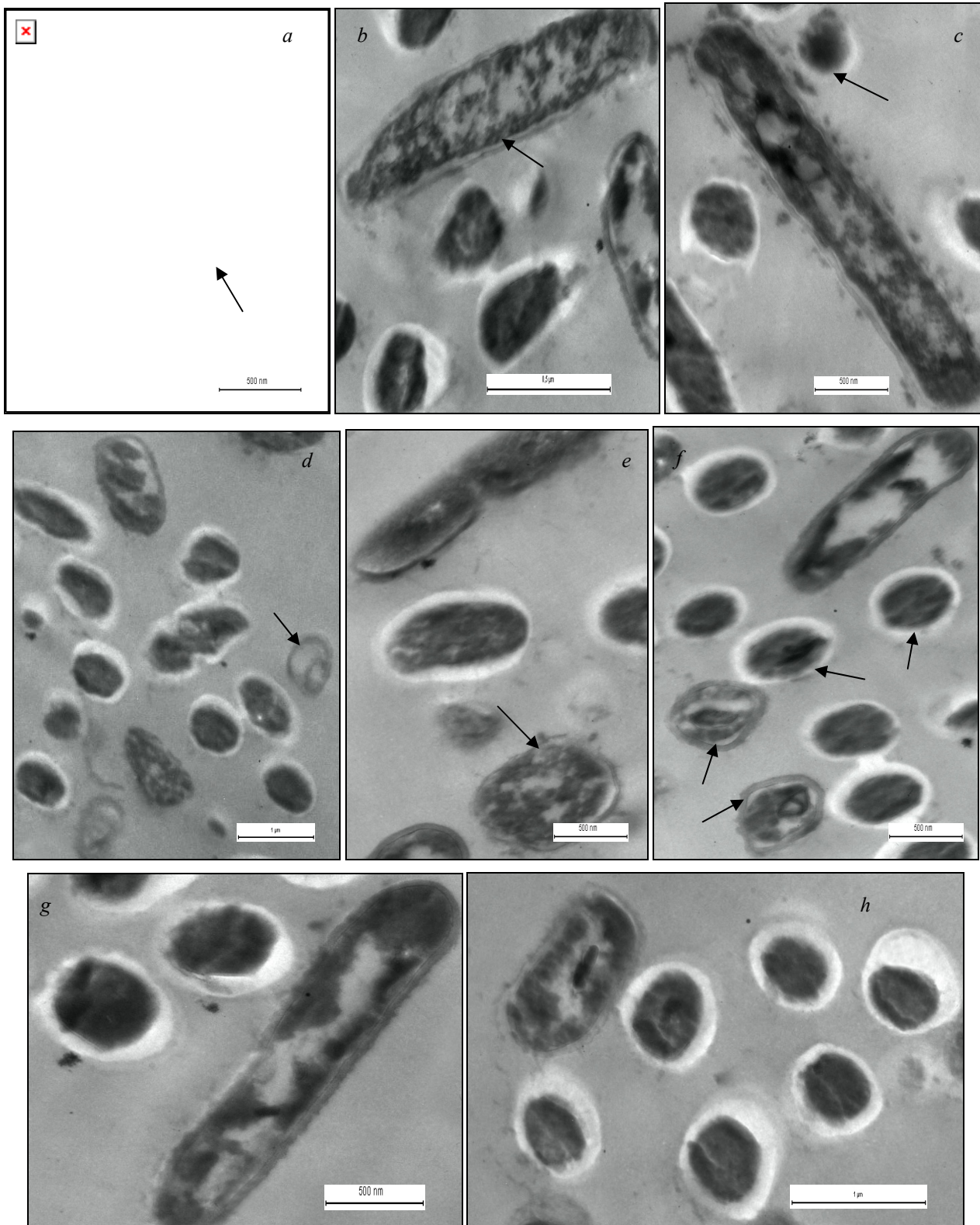


Fig 2. Microphotography (TEM) of mixed cultures of staphylococci and lactobacilli: (a) *L. fermentum* and *S. aureus* ATCC 12228, (b) *L. fermentum* – excess of S-layer, (c, d, e, f) *L. fermentum* and biofilm form of *S. aureus* (ultrastructural changes in staphylococcal cells are marked with arrows), (g) *L. plantarum* 8P-A3 and biofilm-forming form of *S. aureus*. *L. plantarum* 8P-A3 and *S. aureus* ATCC 12228

In one recent study (Khaleghi and Kermanshahi, 2012), the authors showed that environmental conditions affect the protein of the S-layer and the *slpA* gene expression. During the electron-microscopic examination of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, the excess of the S-layer was found at both ends of the bacterial cell at a temperature of 45 °C. This allows one to suggest that the S-layer protein is predominantly expressed in conditions which are not optimal for bacterial growth. The S-layer probably acts as a protective shell in *L. acidophilus* ATCC 4356. In addition, the results of some studies indicate the involvement of lactobacilli S-layer proteins in providing hydrophobicity, autoaggregation and adhesion of these bacteria to a variety of surfaces (Van der Mei et al., 2003; Vadillo-Rodríguez et al., 2004; Khaleghi and Kermanshahi, 2012; Hynönen and Palva, 2013).

In our studies, when comparing the S-layer of lactobacilli in mono- and mixed cultures, its increase was seen only in the second case – in the mixed culture of lactobacilli with staphylococci. These results confirm the hypothesis that the observed changes are the indicators of the reaction general to the bacteria manifested by morphological modifications in the conditions of interaction with the "unfriendly" associants.

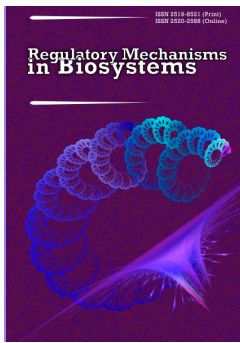
Conclusions

In terms of bi-species biofilm modeling, survival of associants of both species increases. The probiotic strain of lactobacilli reveals a more pronounced antagonistic effect on the staphylococci cultures in comparison with the activity of clinical isolates, while maintaining a minimum viability of probiotic forms of *Staphylococcus*. At the population level, the ratio of morphological types of *S. aureus* cells with an increase in the amount of involutinal and lysed cells changed. Significant ultrastructural changes took place at the morphological level of staphylococcal cells. In mixed cultures of clinical strains of lactobacilli and biofilm-forming staphylococci, the latter moved into a state of rest, fixed by TEM, and during inoculation they retained their capacity for cultivation *in vitro*, which indicates the high competitiveness of staphylococci. Thanks to an experimental model of biofilm in a mixed culture, the present study has allowed us to establish the nature of the antagonistic action of lactobacilli on *S. aureus* and to evaluate the development of destructive changes in the dynamics. The results obtained can be used in improving the schemes of complex antimicrobial therapy of pyoinflammatory processes with the use of biological preparations, which are composed of lactobacilli, including those in the form of local application.

References

- Ahimou, F., Jacques, P., & Deleu, M. (2000). Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(10), 749–754.
- Birger, M. I. (ed.) (1982). *Spravochnik po mikrobiologicheskim i virusologicheskim metodam issledovaniya* [Handbook on microbiological and virological research methods]. Medicine, Moscow (in Russian).
- Bondarenko, V. M. (2011). Rol' uslovno-patogennykh bakterij pri hronicheskikh vospalitel'nykh processah razlichnoj lokalizacii [The role of opportunistic bacteria in chronic inflammatory processes of different localization]. Triada, Tver (in Russian).
- Cameotra, S. S., Makkar, R. S., Kaur, J., & Mehta, S. K. (2010). *Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind in Biosurfactants*. Springer, New York.
- Chebota, I. V., Mayansky, A. N., Konchakova, E. D., Lazareva, A. V., & Chistyakova, V. P. (2012). Antibiotikorezistentnost' biopljonochnykh bakterij [Antimicrobial resistance of bacteria in biofilms]. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 14(1), 51–57 (in Russian).
- Cui, L., Ma, X., Sato, K., Okuma, K., Tenover, F. C., Mamizuka, E. M., Gemmill, C. G., Kim, M. N., Ploy, M. C., El-Solh, N., Ferraz, V., & Hiramatsu, K. (2003). Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1), 5–14.
- Cui, L., Murakami, H., Kuwahara-Arai, K., Hanaki, H., & Hiramatsu, K. (2000). Contribution of a thickened cell-wall and its glutamine non-amidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 44(9), 2276–2285.
- Dall'Antonia, M., Coen, P. G., Wilks, M., Whiley, A., & Millar, M. (2005). Competition between methicillin-sensitive and-resistant *Staphylococcus aureus* in the anterior nares. *Journal of Hospital Infection*, 61(1), 62–67.
- Derkach, M. P., Humetsky, R. J., & Chaban, M. E. (1977). Kurs variacijnoj' statystyky [A course of the variation statistics]. Vyshha Shkola, Kyiv (in Ukrainian).
- Dmitriev, B. A., Toukach, F. V., Holst, O., Rietschel, E. T., Ehlers, S. (2004). Tertiary structure of *Staphylococcus aureus* cell wall murein. *Journal of Bacteriology*, 186, 7141–7148.
- Dobson, A., Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2012). Bacteriocin production: A probiotic trait? *Applied and Environmental Microbiology*, 78(1), 1–6.
- Dosunmu, E., Chaudhari, A. A., Singh, S. R., Dennis, V. A., & Pillai, S. R. (2015). Silver-coated carbon nanotubes downregulate the expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes: A potential mechanism for their antimicrobial effect. *Journal of Clinical Microbiology*, 10, 5025–5034.
- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (2006). *The prokaryotes*. Vol. 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. Springer-Verlag, New York.
- Eftekhari, F., & Mirmohamadi, Z. (2009). Evaluation of biofilm production by *Staphylococcus epidermidis* isolates from nosocomial infections and skin of healthy volunteers. *International Journal of Medicine and Medical Sciences*, 1(10), 438–441.
- Ghannoum, M., & O'Toole, G. A. (2004). *Microbial biofilms*. ASM Press, Washington.
- Goldstein, J., Newbury, D. E., Echlin, P., Joy, D. C., Fiori, C., Lifshin, E. (1984). *Pastrovaja jelektronnaja mikroskopija i rentgenovskij mikroanaliz* [Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis]. Mir, Moscow (in Russian).
- Gostev, V. V., & Sidorenko, S. V. (2010). Bakterial'nye bioplenki i infekcii [Bacterial biofilms and infections]. *Zhurnal Infekologii*, 2(3), 4–15 (in Russian).
- Hall-Stoodley, L., & Stoodley, P. (2009). Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiology*, 11, 1034–1043.
- Harriott, M. M., & Noverr, M. C. (2009). *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: Effects on antimicrobial resistance. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 53, 3914–3922.
- He, X., Hu, W., He, J., Guo, L., Lux, R., & Shi, W. (2011). Community-based interference against integration of *Pseudomonas aeruginosa* into human salivary microbial biofilm. *Molecular Oral Microbiology*, 26(6), 337–352.
- Hynönen, U., & Palva, A. (2013). *Lactobacillus* surface layer proteins: Structure, function and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(12), 5225–5243.
- Jung, W. K., Koo, H. C., Kim, K. W., Shin, S., Kim, S. H., & Park, Y. H. (2008). Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(7), 2171–2178.
- Khaleghi, M., & Kermanshahi, R. K. (2012). Effect of environmental stresses on S-layer production in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Advances in Applied Microbiology*, 3, 209–224.
- Kim, J. W., Chung, G. T., Yoo, J. S., Lee, Y. S., & Yoo, J. I. (2012). Autolytic activity and molecular characteristics of *Staphylococcus haemolyticus* strains with induced vancomycin resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 61(10), 1428–1434.
- Kluytmans, J., Van Belkum, A., & Verbrugh, H. (1997). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(3), 505–520.
- Lee, S. H., & Kim, Y. J. (2014). A comparative study of the effect of probiotics on cariogenic biofilm model for preventing dental caries. *Archives of Microbiology*, 196(8), 601–609.
- Lleo, M., Bonato, B., Tafi, M. C., Caburlotto, G., Benedetti, D., & Canepari, P. (2007). Adhesion to medical device materials and biofilm formation capability of some species of enterococci in different physiological states. *FEMS Microbiology Letters*, 274(2), 232–237.
- Macfarlane, S. (2008). Microbial biofilm communities in the gastrointestinal tract. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 242(3), 142–143.
- McDonnell, G., & Russell, A. D. (1999). Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 147–179.
- Nair, N., Biswas, R., Götz, F., Biswas, L. (2014). Impact of *Staphylococcus aureus* on pathogenesis in polymicrobial infections. *Infection and Immunity*, 82(6), 2162–2169.
- Oliver, J. D. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(4), 415–425.
- Olson, M. E., Ceri, H., Morck, D. W., Buret, A. G., & Read, R. R. (2002). Biofilm bacteria: Formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 66(2), 86–92.
- Onyango, L. A., Dunstan, R. H., Gottfries, J., von Eiff, C., Roberts, T. K. (2012). Effect of low temperature on growth and ultrastructure of *Staphylococcus spp.* PLoS One, 7(1), e29031.
- Otto, M. (2008). *Staphylococcal biofilms*. In: *Bacterial biofilms*. Springer, Berlin, Heidelberg.

- Pal, S., Tak, Y. K., Song, J. M. (2007). Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1712–1720.
- Pascual, A. (2002). Pathogenesis of catheter-related infections: Lessons for new designs. *Clinical Microbiology and Infection*, 8, 256–264.
- Qu, Y., Daley, A. J., Istivan, T. S., Garland, S. M., & Deighton, M. A. (2010). Antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from very low birth weight babies: Comprehensive comparisons of bacteria at different stages of biofilm formation. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 9(1), 16.
- Rasmussen, T. B., & Givskov, M. (2006). Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *International Journal of Medical Microbiology*, 296(2), 149–161.
- Reid, G. (1999). Biofilms in infectious disease and on medical devices. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 11(3), 223–226.
- Revidwala, S., Rajdev, B. M., & Mulla, S. (2012). Characterization of bacterial etiologic agents of biofilm formation in medical devices in critical care setup. *Critical Care Research and Practice*, 2012, 945805.
- Sambanthamoorthy, K., Feng, X., Patel, R., Patel, S., & Parnavitana, C. (2014). Antimicrobial and antibiofilm potential of biosurfactants isolated from lactobacilli against multi-drug-resistant pathogens. *BMC Microbiology*, 14(1), 197.
- Samot, J., & Badet, C. (2013). Antibacterial activity of probiotic candidates for oral health. *Anaerobe*, 19, 34–38.
- Shyrobokov, V., Jankowski, D., & Dement, G. (2009). Mikrobna ekologija ljudyny z kol'orovym atlasom [Microbial ecology of the human with colored atlas]. Chervona Ruta, Kyiv (in Ukrainian).
- Sondi, I., & Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275(1), 177–182.
- Stewart, P. S., & Franklin, M. J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 6(3), 199–210.
- Trevors, J. T. (2011). Viable but non-culturable (VBNC) bacteria: Gene expression in planktonic and biofilm cells. *Journal of Microbiological Methods*, 86(2), 266–273.
- Vadillo-Rodríguez, V., Busscher, H. J., Norde, W., De Vries, J., & Van Der Mei, H. C. (2004). Dynamic cell surface hydrophobicity of *Lactobacillus* strains with and without surface layer proteins. *Journal of Bacteriology*, 186(19), 6647–6650.
- Valle, J., Da Re, S., Henry, N., Fontaine, T., Balestrino, D., Latour-Lambert, P., & Ghigo, J. M. (2006). Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(33), 12558–12563.
- Van der Mei, H. C., Van de Belt-Gritter, B., Pouwels, P. H., Martinez, B., & Busscher, H. J. (2003). Cell surface hydrophobicity is conveyed by S-layer proteins – a study in recombinant lactobacilli. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 28(2), 127–134.
- Varma, P., Dinesh, K. R., Menon, K. K., Biswas, R. (2010). *Lactobacillus fermentum* isolated from human colonic mucosal biopsy inhibits the growth and adhesion of enteric and foodborne pathogens. *Journal of Food Science*, 75, M546–M551.
- Varma, P., Nisha, N., Dinesh, K. R., Kumar, A. V., & Biswas, R. (2011). Anti-infective properties of *Lactobacillus fermentum* against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 20(3), 137–143.
- Velraeds, M. M., Van der Mei, H. C., Reid, G., & Busscher, H. J. (1996). Physicochemical and biochemical characterization of biosurfactants released by *Lactobacillus* strains. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 8(1-2), 51–61.
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K.-H., & Whitman, W. (eds.) (2009). *Bergey's manual of systematic bacteriology: Vol. 3: The Firmicutes*. Springer.
- Wang, C.-Y., Wang, H.-C., Li, J.-M., Wang, J.-Y., Yang, K.-C., & Ho, Y.-K. (2010). Invasive infections of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 43(6), 491–497.
- Weekly, B. S. (1975). *Jelektronnaja mikroskopija dlja nachinajushhih* [Electron microscopy for beginners]. Mir, Moscow (in Russian).
- Weinstein, R. A., & Darouiche, R. O. (2001). Device-associated infections: A macroproblem that starts with microadherence. *Clinical Infectious Diseases*, 33(9), 1567–1572.
- Wertheim, H. F., Melles, D. C., Vos, M. C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H. A., & Nouwen, J. L. (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *The Lancet Infectious Diseases*, 5(12), 751–762.
- Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C., & Mattick, J. S. (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, 295(5559), 1487–1487.
- Younes, J. A., van der Mei, H. C., van den Heuvel, E., Busscher, H. J., & Reid, G. (2012). Adhesion forces and coaggregation between vaginal staphylococci and lactobacilli. *PLoS One*, 7(5), e36917.
- Zandri, G., Pasquaroli, S., Vignaroli, C., Talevi, S., Manso, E., Donelli, G., & Biavasco, F. (2012). Detection of viable but non-culturable staphylococci in biofilms from central venous catheters negative on standard microbiological assays. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(7), E259–E261.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(1)

Table of Contents

<i>Mikheev, A. O.</i> Borna disease virus and its role in the pathology of animals and humans	3
<i>Naumenko, A. N., Gorelaya, M. V., & Babiy, S. O.</i> Biochemical composition of urine in rats with developed Guerin's carcinoma and administration of cisplatin	11
<i>Koloskova, O. K., Bilous, T. M., Dikal, M. V., Lomakina, U. V., Kopchuk, T. G., & Lobanova, T. O.</i> Reactions of eosinophilic granulocytes in the sputum and peripheral blood of children suffering from bronchial asthma with signs of eosinophilic and non-eosinophilic inflammation of the bronchi	15
<i>Didyc, N. V., & Lysunets, O. V.</i> Changes in the arteries in the course of hypertensive disease and extrasystoles	19
<i>Ryznychuk, M. O., & Pishak, V. P.</i> Obesity: The role of desynchronosis and genetic factors in mechanisms of its development	23
<i>Virysh, P. A., Shelyuk, O. V., Kabanova, T. A., Khalimova, O. I., Martynyuk, V. S., Pavlovsky, V. I., & Andronati, S. A.</i> Effect of 3-arylamino-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-ones on the bradykinin-induced smooth muscle contraction	30
<i>Boyko, A. A., & Brygadyrenko, V. V.</i> Changes in the viability of <i>Strongyloides ransomi</i> larvae (Nematoda, Rhabditida) under the influence of synthetic flavourings	36
<i>Gutyj, B., Khariv, I., Binkevych, V., Binkevych, O., Levkivska, N., Levkivskyj, D., & Vavrysevich, Y.</i> Research on acute and chronic toxicity of the experimental drug Amprolinsyl	41
<i>Skyba, O.</i> Pathogenic specifics of development of vegetative dysfunction in adolescents in relation to their morphological status	46
<i>Korzhyk, O. V., Pavlovysh, O. S., & Morenko, A. H.</i> Coherence of EEG frequency components during manual movements executed by the subdominant hand in women	51
<i>Popel', S. L., Baskevich, O. V., Zhurakivskyi, V. M., Zhurakivska, O. Y., Melnik, I. V., Krasnopolskij, S. Z., & Atamanchuk, O. V.</i> Three-dimensional structure of the lingual papillae of healthy rats and rats with experimental diabetes mellitus (in the context of mechanism of development of diabetic glossitis)	58
<i>Kirici, M., Atamanalp, M., Kirici, M., & Beydemir, Ş.</i> <i>In vitro</i> effects of some metal ions on glutathione reductase in the gills and liver of <i>Capoeta trutta</i>	66
<i>Poprotska, I. V., & Kuryata, V. G.</i> Features of gas exchange and use of reserve substances in pumpkin seedlings in conditions of skoto- and photomorphogenesis under the influence of gibberellin and chlormequat-chloride	71
<i>Fedotov, O. V.</i> Condition of the prooxidant-antioxidant system of some strains of Basidiomycetes	77
<i>Spirina, I. D., Fedenko, E. S., Rokutov, S. V., Kazakov, V. Y., & Shornikov, A. V.</i> Mutual influence of intensity of pain syndrome and borderline mental disorders in patients with coxarthrosis	84
<i>Georgiyants, M. A., Korsunov, V. A., & Olkhovska, O. M.</i> Central hemodynamic and splanchnic circulation in children with meningococcal septic shock	91
<i>Lavryk, G., Korniyshuk, O., & Tymkiv, M.</i> Ultrastructural changes in biofilm forms of staphylococci cultivated in a mixed culture with lactobacilli	98