

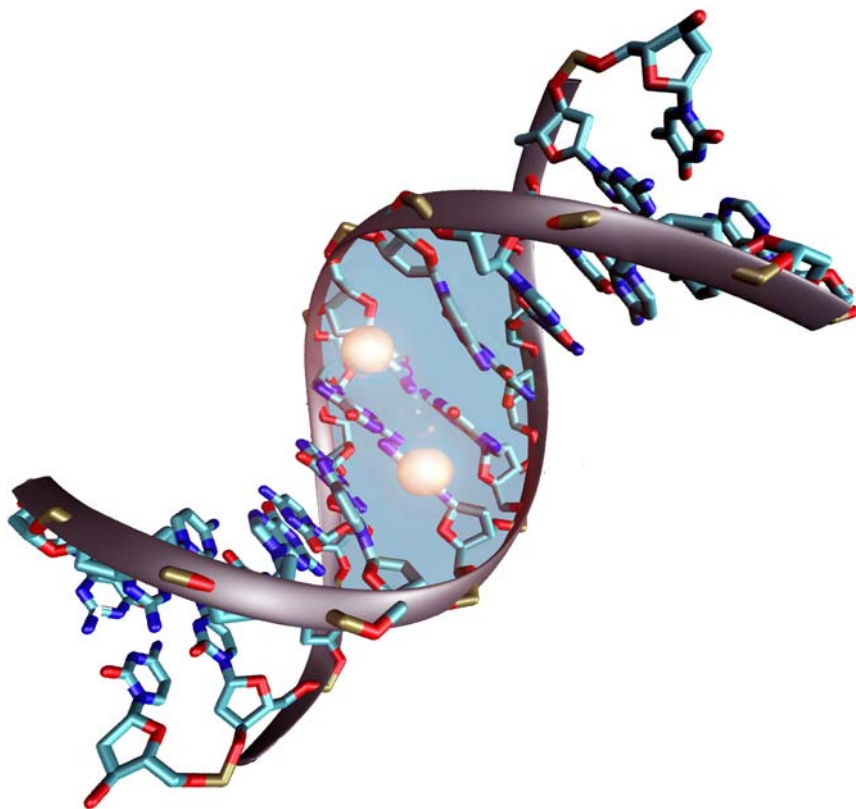
ВІСНИК

Дніпропетровського університету.

Біологія, медицина

Visnyk of Dnipropetrovsk University.

Biology, medicine



Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, медицина

Журнал публікує рецензовані наукові статті та огляди з різноманітних питань біології та медицини, у тому числі з анатомії, біохімії, біоінформатики, біофізики, клітинної біології, генетики, імунології, мікробіології, молекулярної біології, нейрології, фармакології, психології та токсикології.

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ

Голова редакційної колегії:

Проф. О.Є. Пахомов, кафедра зоології та екології, Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, Україна.

Заступники голови редакційної колегії:

Проф. Дж.А. МакЛаклан, кафедра фармакології, інститут медицини, Університет Тулейн, Новий Орлеан, США;

Д-р І. Меламед, відділення нейрофізіології, Медичний центр ім. М. Сороки, Негевський університет ім. Бен-Гуриона, Беер-Шева, Ізраїль;

Проф. С.Г. Піржинський, кафедра біології, Університет Лунда, Швеція;

Члени редакційної колегії:

Проф. В. Барабаш, кафедра мікробіології, Аграрний університет Кракова, Польща;

Проф. П.П. Бачинський, кафедра клінічної та лабораторної діагностики, Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, Україна;

Д-р З. Бедо, Науково-дослідний інститут сільського господарства Угорської академії наук, Угорщина;

Проф. Я.С. Березницький, кафедра хірургії №1, Дніпропетровська державна медична академія, Україна;

Доц. В.В. Бригадиренко (секретар редакційної колегії), кафедра зоології та екології, Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, Україна;

Д-р М. Бойко, відділ анестезіології, медичний факультет, Негевський університет ім. Бен-Гуриона, Беер-Шева, Ізраїль;

Проф. А.І. Вінніков, кафедра мікробіології, вірусології та біотехнології, Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, Україна;

Доц. В.Я. Гасо, кафедра зоології та екології, Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, Україна;

Проф. А.Д. Дюдюн, кафедра дерматовенерології, Дніпропетровська державна медична академія, Україна;

Проф. Т.М. Єрошкіна, кафедра клінічної та лабораторної діагностики, Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, Україна;

Д-р С. Козицька, Інститут молекулярної інфектології, університет Вюрцбурга, Німеччина;

Проф. Г.М. Кременчуцький, кафедра мікробіології, вірусології, імунології і епідеміології, Дніпропетровська державна медична академія, Україна;

Проф. Ф.І. Кулікова, відділення рентгендіагностики, Дніпропетровська обласна клінічна лікарня ім. І. І. Мечникова, Україна;

Д-р П. Куцк, відділ біотехнології навколишнього середовища, Центр охорони навколишнього середовища ім. Гельмгольца, Лейпциг, Німеччина;

Проф. О.А. Лихолат, кафедра товарознавства та митної експертизи, Університет митної справи та фінансів, Україна;

Проф. О.Є. Лоскутов, кафедра травматології та ортопедії, Дніпропетровська державна медична академія, Україна;

Проф. В.С. Недзвєцький, кафедра біофізики та біохімії, Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, Україна;

Проф. О.В. Севериновська, кафедра фізіології людини та тварин, Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, Україна;

Проф. В.П. Семенченко, член-кор. НАН Білорусі, лабораторія гідробіології, ГНПО «НПЦ НАН Білорусі по біоресурсам», Республіка Білорусь;

Проф. С.М. Тимчук, відділення лор-онкології, Дніпропетровська обласна клінічна лікарня ім. І. І. Мечникова, Україна;

Проф. Г.О. Ушакова, кафедра біофізики та біохімії, Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, Україна;

Проф. Дж. Федак, Східний центр досліджень зернових і олійних культур, Аграрне та аграрно-харчове управління Канади (AAFC), Канада;

Проф. П.Б. Чаунаву, Державний університет Джексона, Коледж науки, інженерії та технології, Центр санітарного стану навколишнього середовища, США.

Проф. Т.М. Шевченко, кафедра клінічної та лабораторної діагностики, Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, Україна.

Інформація про публікацію: *Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, медицина* (ISSN 2310-4155 (print), ISSN 2312-7295 (online)). Ви можете дізнатися вартість передплати на журнал, звернувшись до секретаря редакційної колегії *В.В. Бригадиренка* за адресою brigad@ua.fm та ознайомитись з інформацією на сайті www.medicine.dp.ua. Запрошуємо до співробітництва.

Друкується за рішенням вченої ради Дніпропетровського національного університету ім. Олеся Гончара згідно з планом видань на 2015 рік

Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, medicine

Aims and scope. *Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, medicine* publishes refereed original research articles and reviews on various aspects of biology and medicine: anatomy, health sciences, biochemistry, bioinformatics, biophysics, cell biology, genetics, immunology, microbiology, molecular biology, neuroscience, pharmacology, physiology and toxicology.

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief:

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

Deputy Editors:

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

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

Prof., PhD, S.G. Pierzynowski, Department of Biology, Lund University, Lund, Sweden;

Editorial Board:

Prof. P.P. Bachynskyi, MD, 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. Bereznytskyi, MD, Department of Surgery №1, Dnipropetrovsk State Medical Academy, Ukraine;

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

As.Prof., Ph.D., V.V. Brygadyrenko (Secretary), Department of Zoology and Ecology, Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Ukraine;

Prof. A.D. Diudium, MD, Department of Dermatovenereology, 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;

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

Prof. G.M. Kremenchutskyi, MD, Department of Microbiology, Virology, Immunology and Epidemiology, Dnipropetrovsk State Medical Academy, Ukraine;

Prof., DSc, F.I. Kulikova, MD, Department of X-ray diagnostics, Mechnikov Dnipropetrovsk Regional Clinical Hospital, Ukraine;

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

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

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

Prof., DSc, V.S. Nedzvetzkyi, Department of Biophysics and Biochemistry, Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Ukraine;

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

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

Prof., DSc, 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, MD, Department of ENT-Oncology, Mechnikov Dnipropetrovsk Regional Clinical Hospital, Ukraine;

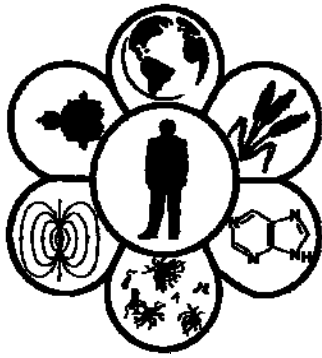
Prof., DSc, G.O. Ushakova, Department of Biophysics and Biochemistry, Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Ukraine;

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

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

Publication information: *Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, medicine* (ISSN 2310-4155 (print), ISSN 2312-7295 (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, Ukraine



УДК 577.112.85+616-097

Синтетичні позитивні контролю імуноферментних наборів для виявлення IgA та IgM антитіл до *Chlamydia trachomatis*

О.Ю. Галкін¹, Ю.В. Горшунів², О.Б. Бесараб¹

¹Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут», Київ, Україна

²Науково-дослідний та конструкторсько-технологічний інститут міського господарства, Київ, Україна

Важливе місце серед методів клінічної лабораторної діагностики посідають серологічні методи, основані на виявленні серологічних маркерів інфекційних і неінфекційних захворювань. Найбільш інформативним, універсальним та поширеним методом серологічних досліджень є імуноферментний аналіз. Важлива перевага даного методу – можливість виявлення специфічних антитіл різних класів, що дозволяє диференціювати первинний інфекційний процес і його ремісію, загострення чи хронізацію захворювання. На даному принципі побудована диференційна серологічна діагностика уrogenітального хламідіозу: відразу після інфікування *Chlamydia trachomatis* в організмі відбувається утворення специфічних IgM антитіл, а згодом синтезуються основні проєктивні антитіла класу IgG; при загостренні хронічного уrogenітального хламідіозу в організмі можуть синтезуватися специфічні антитіла класу IgA. Комплексне обстеження пацієнтів на наявність гуморальної імунної відповіді на *Ch. trachomatis* передбачає тестування сироватки (плазми) крові на вміст специфічних антитіл усіх трьох класів. Суттєвою проблемою у виробництві імуноферментних діагностичних наборів є отримання відповідного позитивного контролю. Сироватка (плазма) крові людини з умістом специфічних антитіл певного класу – край дефіцитний матеріал. Запропоновано методологічний підхід щодо застосування синтетичних позитивних контролів імуноферментних наборів для виявлення IgA та IgM антитіл до *Ch. trachomatis*, який полягає у використанні кон'югату нормальних IgM або IgA людини та моноклональних антитіл до основного білка зовнішньої мембрани збудника уrogenітального хламідіозу. Для вирішення проблеми можливо використовувати NHS ефір-малеїмід опосередковану кон'югацію та періодатний метод біокон'югації. Синтетичні позитивні контролю, отримані різними методами, характеризуються вищим титром, на відміну від високотитражних IgM- та IgA-позитивних сироваток. Разом із цим, позитивний контроль, отриманий за допомогою NHS ефір-малеїмід опосередкованої кон'югації характеризується найкращим профілем титрування (меншим спаданням активності в імуноферментному аналізі за його розведення) як на момент його отримання, так і після його зберігання упродовж тижня за температури 37 °C.

Ключові слова: імуноферментний аналіз; позитивний контроль; уrogenітальний хламідіоз; кон'югація

Synthetic positive controls for ELISA test kits for detection of IgA and IgM antibodies to *Chlamydia trachomatis*

O.Y. Galkin¹, Y.V. Gorshunov², O.B. Besarab¹

¹National Technical University of Ukraine "Kyiv Polytechnic Institute", Kyiv, Ukraine

²Research and Technology Institute of Urban Development, Kyiv, Ukraine

The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is the most informative and versatile method of serological diagnostics. The possibility of detecting by ELISA specific antibodies of different classes allow to differentiate primary infectious process and its remission, exacerbation and chronic disease (holding of differential diagnosis). This approach is implemented in the methodology for evaluation of patients for presence of humoral immune response against the causative agent of urogenital chlamydiosis. As with other infections immediately after *Chlamydia*

Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут», пр. Перемоги, 37, Київ, 03056, Україна
National Technical University of Ukraine "Kyiv Polytechnic Institute", Peremohy av., 37, Kyiv, 03056, Ukraine
Tel.: +38-067-234-86-42. E-mail: alexfbt@mail.ua

Науково-дослідний та конструкторсько-технологічний інститут міського господарства, вул. Урицького, 35, 03035, Київ, Україна
Research and Technology Institute of Urban Development, Urytskogo str., 35, Kyiv, Ukraine
Tel.: +38-044-502-79-00. E-mail: alexfax@mail.ru

trachomatis infection the specific IgM antibodies are formed, and subsequently basic projective antibodies of IgG class are synthesized. However, at exacerbation of chronic urogenital chlamydia specific IgA antibodies can be synthesized. That is why comprehensive evaluation of patients for presence of humoral immune response to *Ch. trachomatis* involves plasma testing of specific antibodies of all three classes. The essential problem in the production of ELISA diagnostic kits is obtaining of positive control. The classic version of positive control is human blood plasma containing specific antibodies. But specific IgM- and IgA-positive sera are deficit raw materials. This fact can significantly limit the production of diagnostic kits, especially in case of large-scale manufacture. We have suggested methodological approach to use of synthetic positive controls in indirect ELISA kits based on conjugate of normal human IgM (IgA) and monoclonal antibodies against major outer membrane protein of *Ch. trachomatis*. It was found that it's possible to realize such task by means of NHS ester-maleimide-mediated conjugation (by sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate) and reductive amination-mediated conjugation (by sodium periodate). It was found that synthetic positive controls obtained by different methods are characterized by higher titer compared to IgM- and IgA-positive high-titer serum. However, positive control obtained by NHS ester-mediated maleimide conjugation has the best titration profile characteristics, at the release time and after one-week storage at 37 °C.

Keywords: ELISA; positive control; urogenital chlamydia infection; conjugation

Вступ

Лабораторна діагностика – невід’ємна частина клінічного обстеження пацієнта, адже без даних лабораторного обстеження неможливе не тільки встановлення клінічного діагнозу, а й контроль за ефективністю терапевтичних заходів (Zupanec, 2005). Серед усього комплексу методів клінічної лабораторної діагностики важливе місце посідають серологічні методи, основані на виявленні серологічних маркерів (антигенів, алергенів, антитіл) інфекційних (вірусних, бактеріальних, грибкових і паразитарних) та неінфекційних (у т. ч. аутоімунних, алергічних, ендокринних і онкологічних) захворювань. Найбільш інформативним, універсальним і, як наслідок, поширеним методом серологічних досліджень є імуноферментний аналіз (ІФА) (Galkin, 2014). Можливість виявлення за допомогою ІФА специфічних антитіл різних класів дозволяє диференціювати первинний інфекційний процес і його ремісію, загострення чи хронізацію захворювання, тобто проводити диференціальну діагностику. Такий підхід реалізується у методології обстеження пацієнтів на наявність гуморальної імунної відповіді на збудник уrogenітального хламідіозу *Chlamydia trachomatis* (Taylor-Robinson, 1997; Chernesky, 2005; Isakov et al., 2012; Kamel, 2013). Як і у випадку інших інфекцій, відразу після інфікування *Ch. trachomatis* в організмі відбувається утворення специфічних IgM антитіл, а згодом синтезуються основні проєктивні антитіла класу IgG. Разом із тим при загостренні хронічного уrogenітального хламідіозу в організмі можуть синтезуватися специфічні антитіла класу IgA. Отже, комплексне обстеження пацієнтів на наявність гуморальної імунної відповіді на *Ch. trachomatis* передбачає тестування сироватки (плазми) крові на вміст специфічних антитіл усіх трьох класів (Ossewaarde, 1994; Isakov et al., 2012; Kamel, 2013).

За літературними даними (Ossewaarde, 1994; Kamel, 2013), імуноферментні набори для виявлення специфічних антитіл класу IgM та IgA до *Ch. trachomatis* у сироватці (плазмі) крові людини побудовані за принципом непрямого ІФА. Суттєвою проблемою у виробництві подібного роду діагностичних наборів є отримання позитивного контролю (ПК). Класичний варіант ПК – це сироватка (плазма) крові людини з вмістом специфічних антитіл певного класу. Частота виявлення IgM- та IgA-позитивних сироваток незначна. Вкрай дефіцитний відповідний біологічний матеріал – сировина для отримання ПК. Ця обставина може суттєво

обмежувати виробництво діагностичних наборів, особливо за умов широкомасштабного виробництва. Нами запропоновано методологічний підхід до використання синтетичних ПК в імуноферментних наборах, побудованих за принципом непрямого ІФА, який полягає у використанні кон’югату нормальних імуноглобулінів класу IgM (IgA) та моноклональних антитіл (МкАт) до основного білка зовнішньої мембрани *Ch. trachomatis* (major outer membrane protein, МОМР).

Мета цієї статті – охарактеризувати різні методи біокон’югації для синтезу позитивних контролів для імуноферментних наборів під час виявлення IgA та IgM антитіл до *Ch. trachomatis*.

Матеріал і методи досліджень

NHS ефір-малеїмід опосередкована кон’югація. Синтез кон’югату проводили за допомогою базового методу (Hermanson, 2000) із власними модифікаціями. На першому етапі проводили активацію нормального IgM (IgA) людини (Nikolayenko et al., 2005) NHS ефір-малеїмідним зшивальним агентом – сульфо-сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилату (сульфо-SMCC). Використовували 2–3 мл розчину IgM (IgA) (400–420 мг/мл) у 0,1 М фосфатному буфері із 0,15 М NaCl, pH 7,2 (ФБР). До розчину імуноглобулінів додавали 6 мг сульфо-SMCC, розмішували до повного розчинення та витримували упродовж 30 хв за кімнатної температури. Відділення сульфо-SMCC, що не прореагував, проводили на колонці 2,5 × 100 см із сефакрилом S-300, використовуючи ФБР. Активовані імуноглобуліни елюювали з колонки, розводили до концентрації 20 мг/мл та відразу використовували для синтезу кон’югата.

Кон’югацію активованого нормального імуноглобуліну та МкАт із відновленими сульфгідрильними групами проводили таким чином. Використовували розчин МкАт до МОМР із концентрацією 5 мг/мл у ФБР із 10 ммоль/л ЕДТА. До 3 мл розчину МкАт додавали 18 мг меркаптоетиламіну (МЕА), інкубували 90 хв за температури 37 °C. Для відділення редукованих антитіл від МЕА, що не вступив у реакцію, застосовували хроматографічну колонку 1,5 × 40 см із сефадексом G-25 (Pharmacia Biotech), використовуючи ФБР із 10 ммоль/л ЕДТА. Елюцію редукованих антитіл проводили зі швидкістю 2 мл/хв. Збирали фракції об’ємом 0,5 мл і вимірювали оптичну густину при 280 нм. Зібрані фракції редукованих МкАт негайно змішували з активованими імуноглобулінами (молярне

співвідношення IgM : МкАт становило 1 : 4, а IgA : МкАт – 1 : 2). Реакційну суміш витримували 2 год за кімнатної температури. Отриманий кон'югат піддавали очищенню за допомогою імуноафінної хроматографії на колонці із сефарозою 6-В, на якій іммобілізовані МкАт до МOMP.

Періодатний метод кон'югації. Кон'югацію МкАт до МOMP із нормальним імуноглобуліном людини здійснювали у молярному співвідношенні МкАт до IgM 1 : 1 методом періодатного окислення (Tijssen, 1985) із власними модифікаціями. Для окислення імуноглобулінів людини (15 мг/мл) застосовували 0,1 М бікарбонатний буфер, рН 8,3, додаючи такий же об'єм 14 мМ водного розчину періодату натрію. Суміш інкубували протягом 2 год за кімнатної температури. Одержаний таким чином розчин активованого імуноглобуліну людини додавали до розчину МкАт, які попередньо діалізували проти 0,1 М карбонатного розчину, рН 9,2. Суміш переносили у хроматографічну колонку та додавали 1/3 частину сухого сефадексу G-25, інкубували протягом 3 год за кімнатної температури. По закінченні інкубації розчин кон'югату елюювали з колонки та зупиняли реакцію додаванням 1/20 об'ємної частини водного розчину NaBH₄ (5 мг/мл), залишаючи на 30 хв за кімнатної температури. Після цього ще додавали 3/20 частини розчину боргідриду натрію, інкубували протягом 60 хв. Одержаний розчин кон'югату переводили у 0,02 М фосфатний буфер з 0,15 М NaCl шляхом діалізу.

Непрямий ІФА. Рекombінантний МOMP (Galkin and Dugan, 2014) сорбували в 0,02 М карбонат-бікарбонатному буфері в концентрації 2 мкг/мл на 96-лункові полістеролові планшети для ІФА високої сорбційної ємності (Suzhou Congrem Biomedical Technology Co., Китай). Планшет інкубували протягом 12 год за 4 °С, потім тричі відмивали 0,02 М фосфатним буферним

розчином із 0,15 М NaCl та 0,2% твін-20 (ФБРТ) та витримували у розчині бичачого сироваткового альбуміну (БСА) (10 мг/мл в ФБР) 1 год за температури 37 °С. Після чотириразового відмивання ФБРТ лунки планшета заповнювали 100 мкл розчину кон'югату нормального IgM (IgA) та МкАт до МOMP у реакційному буферному розчині (0,05 М трис-НСІ буфер, рН 8,0, 0,15 М NaCl, 5 мМ ЕДТА, 0,5 мг/мл БСА, 0,2% твін-20). Планшети інкубувалися 30 хв за температури 37 °С та відмивали 4 рази ФСБТ. Після відмивання вносили розчин пероксидазного кон'югату моноклональних антитіл до IgM (IgA) людини (100 мкл/лунку), який інкубували 30 хв за температури 37 °С. Тричі відмивали ФБРТ і двічі дистильованою водою, після чого вносили по 100 мкл субстратно-хромогенної суміші (розчин 3,3',5,5'-тетраметилбензидину 0,25 мг/мл у 0,1 М натрій-цитратного буферу, рН 4,5, із додаванням 10 мкл 33% розчину перекису водню). Реакцію проявляли 20 хв у темноті та зупиняли, додаючи 50 мкл 2 М сірчаної кислоти. Оптичну густину вимірювали за 450 нм/620 нм.

Результати та їх обговорення

Грунтуючись на даних інших авторів (Harlow and Lane, 1988; Johnstone, 1997; Hermanson, 2000) та власному досвіді (Galkin, 2010), ми обрали два принципові методологічні підходи до синтезу кон'югатів формату «антитіло – антитіло», які піддавали оцінці для синтезу відповідного ПК (неспецифічні IgM/IgA + моноклональних антитіл до МOMP): 1) NHS ефір-малеїмід опосередкована кон'югація на прикладі сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил) циклогексан-1-карбоксилату (SMCC) як зшивального агента; 2) періодатний метод (відновне амінування) (рис. 1, 2).

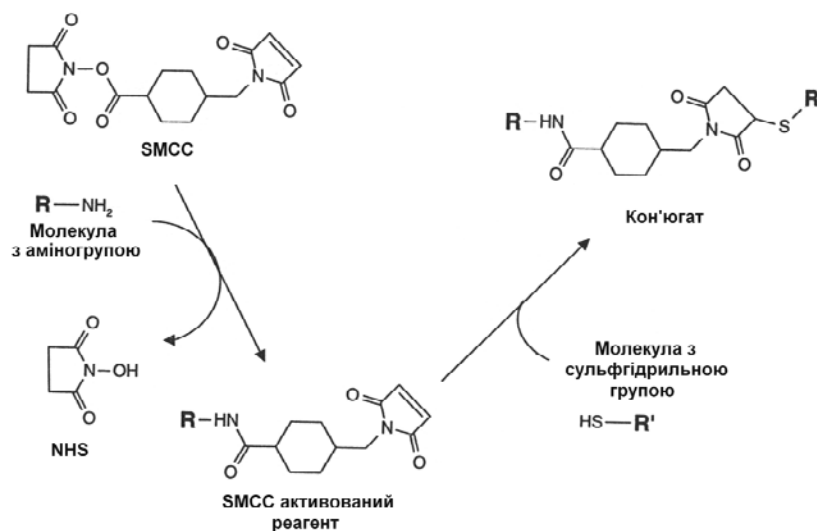


Рис. 1. Схема одержання кон'югатів за допомогою SMCC

Застосування зазначених методологічних прийомів можливе через такі передумови. NHS ефір-малеїмід опосередкована кон'югація можлива за участі двох біомолекул, одна з яких має вільні аміногрупи, а друга – вільні сульфгідрильні групи. Очевидно, що й IgM (IgA) людини, й мишачі моноклональні антитіла мають

відповідні групи, які можуть бути задіяні у даній методиці. Потенційна можливість використання періодатного методу зумовлена тим, що молекули IgM та IgA людини містять 7–12% вуглеводних залишків (Filipovich, 1999). Це, у свою чергу, дозволяє проводити модифікацію молекули IgM (IgA) з утворенням

активних альдегідних груп, які згодом будуть реагувати з аміногрупами антитіл з утворенням основи Шиффа. Альдегідні групи у молекулі IgM (IgA) утворюються під час окиснення періодатом натрію їх вуглеводних компонентів, аміногрупи якого попередньо або блоковані 1-фтор-2,4-динітробензолом, або протоновані (Hermanson, 2000). Таким чином, нам слід було на практиці оцінити прийнятність згаданих методик для

синтезу біокон'югатів формату «антитіло – антитіло». Синтетичні ПК, отримані різними методами, оцінювали шляхом їх титрування в імуноферментному аналізі, призначеному для виявлення IgM та IgA антитіл до збудника уrogenітального хламідіозу. Дане дослідження проводили порівняно з титруванням високотитражних сироваток з умістом відповідних специфічних антитіл, а також негативної сироватки (рис. 3).

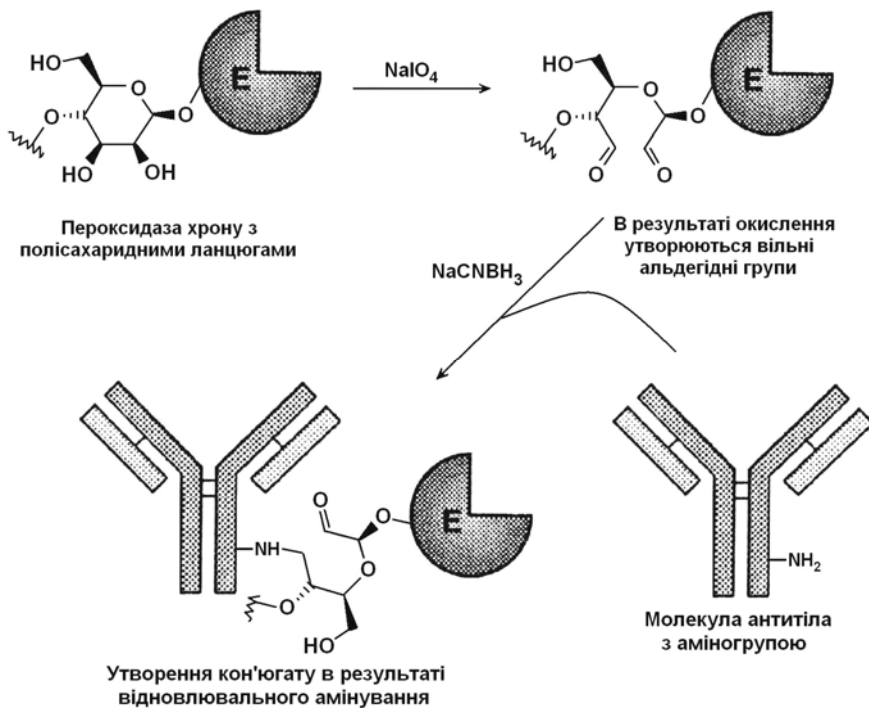


Рис. 2. Періодатний метод одержання кон'югатів

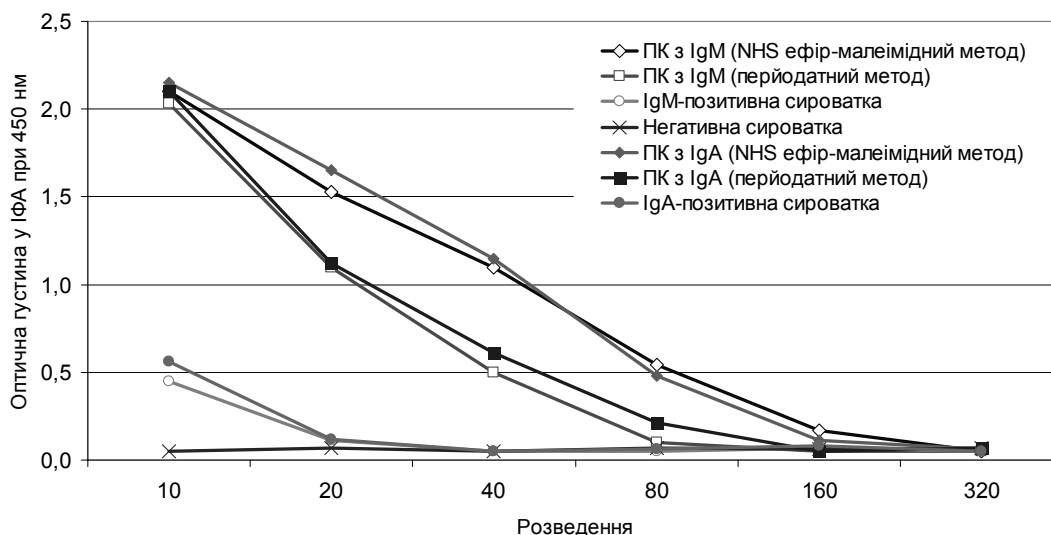


Рис. 3. Титрування синтетичних контролів, отриманих різними методами

Найкращим результатом характеризувався ПК, отриманий внаслідок використання SMCC як зшивального агента (NHS ефір-малеїмід опосередкована кон'югація). Спадання активності у разі розведення ПК, отриманого періодатним методом, відбувалося інтенсивніше. Разом із цим, усі варіанти синтезованих ПК характеризувалися сприятливішим сигналом у ІФА, аніж високотитражні

IgM- та IgA-позитивні сироватки. Аналогічні дослідження проведено після тесту прискореної стабільності (зберігання упродовж тижня за температури 37 °C). Результати відповідних випробувань (рис. 4) свідчили, що спадання активності синтетичних ПК відбувається менш повільно, ніж позитивних сироваток, що містять відповідні специфічні антитіла.

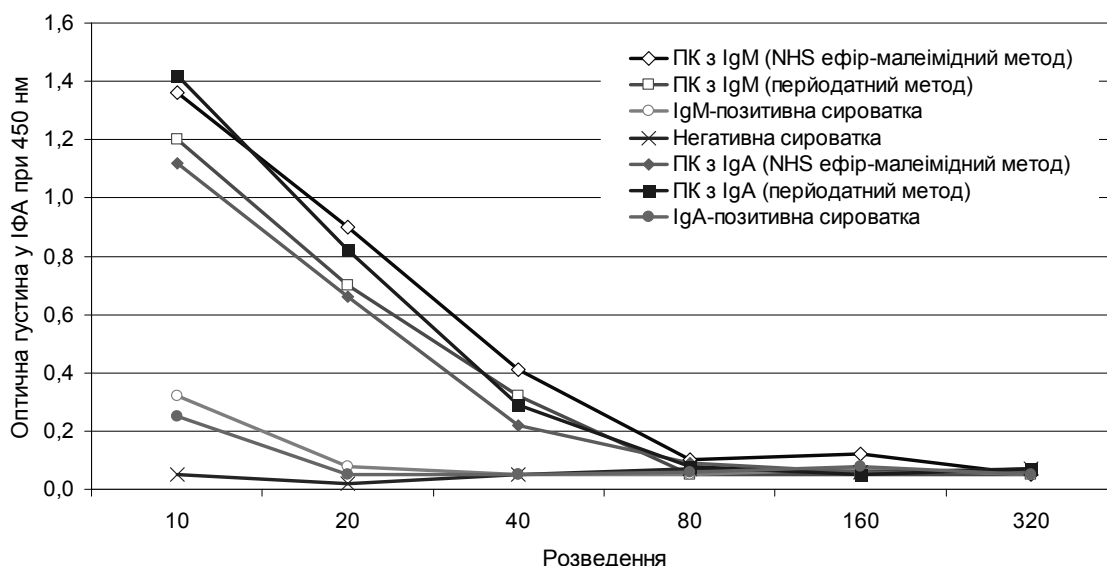


Рис. 4. Титрування синтетичних контролів, отриманих різними методами, після зберігання за 37 °С

Такі результати зумовлюють перспективність застосування описаного методологічного прийому під час розроблення та виготовлення імуноферментних наборів для діагностики уrogenітального хламідіозу. Отримані нами результати корелюють із даними інших праць у частині можливості створення кон'югованих біореагентів, які б характеризувалися кращими характеристиками, зокрема стабільністю та чутливістю (Dhar et al., 2012; Galkin and Gorshunov, 2014).

Висновки

Обґрунтовано методологічні підходи до отримання синтетичних позитивних контролів для непрямого імуноферментного аналізу, призначеного для виявлення IgM та IgA антитіл до збудника уrogenітального хламідіозу: NHS ефір-малеїмід опосередкована кон'югація на прикладі SMCC як зшивального агента, періодатний метод біокон'югації. Синтетичні позитивні контролі, отримані різними методами, характеризуються вищим титром порівняно з високотитражними сироватками, що містять IgM та IgA антитіл до *Ch. trachomatis*. Позитивний контроль, отриманий за допомогою SMCC, характеризується найкращим профілем титрування (меншим спаданням активності у ІФА під час розведення) як на момент отримання, так і після його зберігання за підвищеної температури.

Бібліографічні посилання

Chernesky, M.A., 2005. The laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 16(1), 39–44.

Dhar, T.K., Dasgupta S., Ray, D., Banerjee, M., 2012. A filtration method for rapid preparation of conjugates for immunoassay. *J. Immunol. Methods.* 385, 71–78.

Filippovich, J.B., 1999. *Osnovy Biohimii [Fundamentals of Biochemistry]*. Agar, Moscow.

Galkin, O.Y., 2010. Approaches to the synthesis of conjugates for enzyme immunoassay test-systems and evaluation of

their use for diagnostics of infectious diseases. *Ukr. J. Clin. Lab. Med.* 5(4), 54–60.

Galkin, O.Y., 2014. Parametry bioanalychnoyi standartyzatsiyi zasobiv dlya serolohichnoyi diahnostryky [Parameters for bioanalytical standardization of medical devices for serological diagnostics]. *Materialy IV Naukovo-Praktychnoyi Konferentsiyi "Suchasni Dosyahnennya Farmatsevtichnoyi Tekhnolohiyi"* [Proc. 4th Sci. Conf. "Recent advances in pharmaceutical technology"]. Publishing House of the National University of Pharmacy, Kharkov (in Ukrainian).

Galkin, O.Y., Dugan, O.M., 2014. Recombinant heat shock protein of *Chlamydia trachomatis*: Perspectives of usage in serological diagnostics. *Materialy Mizhnarodnoyi Naukovoyi Konferentsiyi "Mekhanizmy Funktsionuvannya Fiziolohichnykh System"* [Proc. Sci. Conf. "The Mechanisms of Physiological Systems Functioning"]. Lviv National University, Lviv.

Galkin, O.Y., Gorshunov, Y.V., 2014. Otsinka metodiv biokon'yuhatsiyi dlya otrymannya syntetychnykh pozytyvnykh kontroliv dlya imunofermentnoho analizu modyfikatsiyi "IgM-pastka" [Evaluation of bio-conjugation methods for obtaining of synthetic positive control for IgM-capture ELISA]. *Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Med.* 5(2), 85–89.

Harlow, E., Lane, D., 1988. *Antibodies. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.-Y.

Hermanson, G.T., 2000. *Bioconjugate techniques*. Academic Press, San Diego.

Isakov, V.A., Kuljashova, L.B., Berezina, L.A., Svarval', A.V., 2012. Laboratornaja diagnostika urogenital'nogo hlamidioza. *Sovremennye metody diagnostiki hlamidijnoj infekcii (analiticheskij obzor)* [Laboratory diagnosis of urogenital chlamydia. Modern methods of diagnosis of chlamydia infection (analytical review)]. *Terra Medica* 27, 8–13 (in Russian).

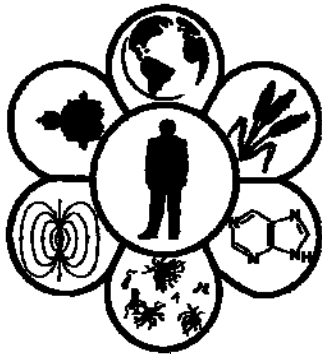
Johnstone, A., 1997. *Immunochemistry 2: A practical approach*. IRL Press, Oxford.

Kamel, R.M., 2013. Screening for *Chlamydia trachomatis* infection among infertile women in Saudi Arabia. *Int. J. Womens Health* 5, 277–284.

Nikolayenko, I.V., Galkin, O.Y., Grabchenko, N.I., Spivak, M.Y., 2005. Preparation of highly purified human IgG, IgM, and IgA for immunization and immunoanalysis. *Ukrainica Bioorganica Acta* 3(2), 3–11.

- Ossewaarde, J.M., de Vries, A., van den Hoek J.A., van Loon, A.M., 1994. Enzyme immunoassay with enhanced specificity for detection of antibodies to *Chlamydia trachomatis*. *J. Clin. Microbiol.* 32(6), 1419–1426.
- Taylor-Robinson, D., 1997. Evaluation and comparison of tests to diagnose *Chlamydia trachomatis* genital infections. *Hum. Reprod.* 12(11), 113–120.
- Tijssen, P., 1985. Practice and theory of enzyme immunoassays. *Lab. Tech. Biochem. Mol. Biol.* 15, 674–678.
- Zupanec, I.A., Misjureva, S.V., Propisnova, V.V., 2005. *Klinicheskaja laboratornaja diagnostika: Metody issledovanija* [Clinical laboratory diagnostics: Research methods]. Publishing House of the National University of Pharmacy, Kharkov (in Russian).

Надійшла до редколегії 11.01.2015



УДК 611.018.86+613.65+612.824

Структурний слід адаптації у рухових центрах спинного мозку щурів при гіпокінезії з наступним фізичним навантаженням у відновному періоді

С.Л. Попель¹, Б.М. Мицкан¹, С.З. Краснопольський², І.В. Мельник²

¹Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника, Івано-Франківськ, Україна

²Івано-Франківський національний медичний університет, Івано-Франківськ, Україна

Закономірності структурної перебудови складових компонентів спинного мозку за дії різних чинників є предметом вивчення багатьох дослідників. Однак зміни морфометричних параметрів нейронів рухових центрів при гіпокінезії залишаються поза увагою широкого кола авторів. Вивчення морфофункціональної перебудови нейронів та їх кровоносного русла стало метою даної роботи. Дослідження виконані на 55 лабораторних щурах лінії Вістар. Матеріалом служили L5-S2 сегменти спинного мозку. Застосовували гістологічні способи забарвлення поперечних зрізів спинного мозку та електронномікроскопічний метод для встановлення ступеня стійкості окремих ланок нейро-гематичного бар'єру за характером проходження часток колоїдного золота (5 нм) як маркера проникності капілярної стінки. При довготривалій гіпокінезії у спинному мозку щурів спостерігаються морфологічні зміни форми та розмірів ядер, перикаріона нейронів передніх рогів усіх досліджуваних сегментів спинного мозку. Збільшується кількість гіпохромних, гіперхромних нейронів без ознак і з ознаками деструктивних змін, з'являються клітини-тіні та випадки сателітозу та нейронофагії. Спостерігається зниження білоксинтетичної функції нейронів, про що свідчать ультраструктурні зміни їх субклітинних компонентів. Структурна перебудова нейронів викликає закономірні зміни їх кровопостачання. Внаслідок підвищення проникності стінки мікрогемосудин для часток маркера, кон'югованого з дрібномолекулярними білками плазми крові, спостерігається набряк ендотеліоцитів і перицитів, базальна мембрана локально втрачає правильну тришарову будову, має зони гомогенізації та розшарування. При тривалій гіпокінезії частки колоїдного золота виявляються також у паравазальному просторі. 30-кратне фізичне навантаження середньої аеробної потужності (150-метровий пробіг у трьохмілі двічі на день) сприяє усуненню цих морфофункціональних змін у складових компонентах рухових ядер спинного мозку.

Ключові слова: рухова активність; рухові нервові центри; нейрони; лабораторні тварини

Structural trace of adaptation in motive nuclei of spinal cord of rats in hypokinesia and after physical loading in the recovery period

S.L. Popel¹, B.M. Mitckan¹, S.Z. Krasnopolsky², I.V. Melnik²

¹Vasyl Stefanyk Precarpathian National University, Ivano-Frankivsk, Ukraine

²Ivano-Frankivsk National Medical University, Ivano-Frankivsk, Ukraine

The purpose of this paper is to study the morphological changes of neurocytes in spinal cord of rats in hypokinesia and subsequent physical loading. Studies were performed on 55 laboratory rats of Wistar line. Materials of the research were the anterior horns of the gray matter of L5-S2 spinal segments. Preparations stained by Nissl and Viktorov were examined histologically. Hypokinesia was modeled following on the author's technique. It was established that during prolonged hypokinesia in neurocytes of spinal cord of rats morphological changes in cell size and shape of the motor nuclei of all segments under study have been recorded. The number of hypochromic, hyperchromic destructively unchanged and hyperchromic destructively altered neurocytes increase; shadow cells appears, as well as cases of

Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника, вул. Шевченка, 57, Івано-Франківськ, 76018, Україна
Vasyl Stefanyk Precarpathian National University, Shevchenko Str., 57, Ivano-Frankivsk, 76018, Ukraine

Івано-Франківський національний медичний університет, вул. Галицька, 2, Івано-Франківськ, 76000, Україна
Ivano-Frankivsk National Medical University, Halyc'ka Str., 2, Ivano-Frankivsk, 76000, Ukraine
Tel.: +38-095-385-14-25. E-mail: serg_popel@mail.ru

satellitosis and neuronophagia. Decrease in of albumen synthetical neurocyte function has been recorded. Physical loading of the average aerobic capacity leads to normalization of structural and functional state of neurocytes and enhances the reparative processes, as evidenced by a number of positive changes in morphometric parameters: increase in the number of normochromic neurocytes and decreasing the number of hyper- and hypochromic neurocytes with destructive signs, absence of pyknotic forms. Morphological parameters of neurocytes and their nuclei after physical loading of average aerobic capacity do not differ from those in the control group of intact animals. In neurocytes of this group of rats RNA concentration increases by 12.6% compared to animals after prolonged hypokinesia. Neurocytes of spinal cord of rats after prolonged hypokinesia develop significant morphological changes which are characterized by emergence of a significant number of hyperchromic neurocytes with signs of destructive changes and shadow cells, as well as and hypochromic neurocytes with signs of destructive changes, reduction in size and change of shape of perikaryons of neurocytes and their nuclei. Morphological changes of neurocytes after prolonged hypokinesia are accompanied by violations of biosynthetic processes, as evidenced by RNA decrease in the cytoplasm of efferent neurocytes of spinal cord of rats. Physical loading of average aerobic capacity leads to normalization of structural and functional state of neurocytes and promotes the reparative processes supported by positive changes in morphometric parameters.

Keywords: hypokinesia; physical loading; spinal cord; neurocytes; rats

Вступ

Однією з актуальних проблем сучасної біології та медицини є вивчення закономірностей порушення структури спинномозкових нейронів при довготривалій гіпокінезії (ДГК) (Smirnov et al., 2000). За даними ВООЗ, перше місце серед причин первинної інвалідності посідають травми хребетного стовпа та ураження спинного мозку (СМ). Лікування таких травм завжди пов'язане з тривалою іммобілізацією всього організму. За даними окремих дослідників (Stogov, 2009; Narymbetova et al., 2011; Soubeyrand et al., 2013), унаслідок тривалої вимушеної нерухомості розвивається складний симптомокомплекс, ключовими ланками якого є пригнічення у тканинах СМ аеробного та активація анаеробного шляху утилізації глюкози, зниження енергозабезпечення, порушення транспорту різних іонів (Sazontova et al., 2007), зміна кислотно-лужного балансу (Ivanov, 2002; Ciobica et al., 2010) на фоні ішемії, яка виникає поступо (Machovic et al., 2013), дефіциту кисню (Mickan and Popel, 2001; Willis, 2011) та активації процесів перекисного окислення ліпідів (Kamskova, 2001; Cash et al., 2014).

Навіть короточасна ішемія СМ веде до глибоких пошкоджень нейронів через нестачу утворення важливих метаболітів (Bagautdinov and Vasil'ev, 2005; Polubinska et al., 2013), окисидантного стресу (Ciobica et al., 2010; Sies, 2015), порушення синтезу білків (Mickan and Popel, 2001; Jerastova et al., 2001; Sazontova et al., 2007). За даними багатьох авторів (Nechipurenko et al., 2008; Stogov, 2009), унаслідок деструкції власних білків у м'язових волокнах (яка виникає як реакція на депривацію рухової активності та відсутність аферентної імпульсації) виникає сенсibilізація організму, що істотно впливає на стан нейронів СМ (Nepomnjashchih et al., 2009).

Існують два критичні рівні мозкового кровотоку: перший (20 мл/100 г/хв) – для біоелектричної активності клітин, другий (15 мл/100 г/хв) – для біологічних насосів та підтримання іонного гомеостазу (Nechipurenko et al., 2008; Rakowska et al., 2012). Клітини з об'ємним кровотоком, що міститься між двома цими рівнями, утворюють зону ішемічної «півтіні». При цьому функція клітин тимчасово порушується, але структурних незворотних пошкоджень ще немає. Для профілактики іммобілізаційного стресу та ішемії нейронів СМ необхідне відновлення функції цієї зони ішемічної «півтіні» (Matsuzaki and Sampath, 2007). Для практичної

медицини інтерес становлять не тільки патогенетичні зміни при ДГК та ішемії, а й так звані реабілітаційні наслідки впливу фізичного навантаження різного рівня інтенсивності після ДГК. Відновлення кровотоку, яке може відбутись як у разі усунення умов іммобілізації, так і після фізичного навантаження середньої аеробної потужності (ФНСАП), викликає каскад адаптаційних процесів, пов'язаних із постгіпокінетичним синдромом (Mickan and Popel, 2001; Narymbetova et al., 2011). При цьому кров надходить у зону ішемії, в якій стінки мікросудин мають підвищену проникність, особливо для дрібномолекулярних білків плазми крові (Popel, 2013). Це викликає свій комплекс патогенетичних механізмів, який також необхідно враховувати, розробляючи реабілітаційні заходи. Після ДГК кисень, який вільно надходить у тканини СМ, включається у процеси вільнорадикального окислення, яке зумовлює розвиток цитотоксичного ефекту (Sazontova et al., 2007; Chugunov et al., 2009), внаслідок якого посилюються мембранні пошкодження, змінюється водно-електролітний баланс між поза- та внутрішньоклітинним середовищем, наростає енергодефіцит у зоні ішемічної «напівтіні» (Bagautdinov et al., 2000; Wu et al., 2006; Machovic et al., 2013). Враховуючи значну роль захворювань, пов'язаних із ДГК, у патогенезі яких лежить ішемічний компонент, важливо виявити морфофункціональні зміни нейронів СМ при ДГК і в умовах ФНСАП.

Мета даної статті – охарактеризувати морфофункціональні зміни нейронів спинного мозку щурів при гіпокінезії та наступному фізичному навантаженні.

Матеріал і методи досліджень

Експерименти проведено на 55 лабораторних щурах-самцях масою 210–290 г. Тварини перебували у спеціальних клітках-пеналах в умовах вільного споживання корму та питної води (стандартний раціон для лабораторних щурів). Усі експерименти схвалено етичною комісією Прикарпатського національного університету та проведено згідно з «Правилами поводження з експериментальними тваринами» та «Загальними етичними принципами експериментів на тваринах». Відбір експериментальних тварин зумовлений схожістю нейроангіоархітектоніки СМ щурів і людини.

Тварин розділили на три групи: п'ять інтактних щурів склали контрольну групу (КГ); по 25 щурів увійшли до групи порівняння (ГП) та експериментальної групи (ЕГ). У тварин ГП ДГК моделювали за методикою

Б.М. Мицкана (Mickan and Popel, 2001). Рівень фізичного навантаження обирали згідно з авторською методикою (Popel and Mickan, 2013) з урахуванням рекомендацій В.А. Левицького та співавторів (Levitc'kiy et al., 2014). Евтаназію тварин проводили через 240 діб після початку моделювання гіпокінезії. Після декапітації тканину СМ фіксували в рідині Карнуа, після чого матеріал зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації, просочували ксилолом і поміщали в парафін. Для світлооптичного дослідження готували серійні поперечні зрізи товщиною 8–10 мкм і забарвлювали за Ейнарсоном (виявлення РНК), Нісслем (Sengul, 2015), для виявлення нейронів з ознаками деструкції – за Вікторовим (Victorov et al., 2000). Гістологічні та гістохімічні препарати вивчали під світловим мікроскопом МС 300 (ТХР, Австрія) та фотографували за допомогою Digital camera for microscope DCM 900 (ТХР, Австрія). Морфометрію здійснювали на вказаних препаратах за допомогою програмного забезпечення NIH USA «Image J» в автоматичному або ручному режимі з урахуванням збільшення. У ході морфометричного аналізу визначали розмір і форму нейронів та їх ядер, кількість нейронів і відносний вміст (%) нормохромних, гіпохромних, гіперхромних без ознак деструктивних змін, гіперхромних з ознаками деструктивних змін нейронів і клітин-тіней.

Судини гемомікроциркуляторного руслу (ГМЦР) СМ вивчали під електронним мікроскопом ПЕМ-100 (ВО «SELMІ», м. Суми, Україна). Збирання матеріалу та приготування препаратів для електронної мікроскопії проводили за загальноприйнятими правилами. Маркер судинної проникності (колоїдне золото) готували за авторською методикою (Popel, 2013), з урахуванням рекомендацій Dykman and Khlebtsov (2012), кон'югували з альбуміном плазми крові та вводили у кровоносне русло через хвостову вену з розрахунку 5,0 мл/кг маси тварин (1,25 мл за маси тіла щура 250 г).

Для порівняння морфометричних параметрів використано непараметричний критерій Манна-Уїтні. Від-

мінності вважалися вірогідними за $P < 0,05$. Статистичну обробку даних здійснювали із застосуванням пакета Statistica 6.0. Розраховували середнє, похибку середнього та середньоквадратичне відхилення (Rebrova, 2006).

Результати досліджень

Після 240 діб із початку моделювання ДГК на гістологічних препаратах відносна щільність розташування нейронів порівняно з тваринами КГ значно змінюється. При цьому збільшується кількість гіперхромних з ознаками деструктивних змін і гіпохромних нейронів (рис. 1). У тварин ГП спостерігалися випадки сателітозу та нейронофагії (рис. 2). При цьому у передніх рогах сірої речовини СМ відносна кількість нормохромних нейронів зменшується на 16,8% ($P < 0,05$). Трапляються нейрони з розширеним апікальним відростком. У гіперхромних нейронах з ознаками деструктивних змін він спіралеподібно закручується. У цитоплазмі деяких нейронів спостерігається частковий лізис хроматофільної речовини. Ядерця в ядрах більшості нейронів розташовані ексцентрично.

Клітинне тіло пікноморфних нейронів характеризується неправильною формою. Порівняно з іншими видами нейронів їх ядра пікнотичні, гіперхромні, мають менший розмір і найчастіше не візуалізуються. Аксон у цих клітинах нерідко піддається інтенсивному забарвленню, має пряму або зигзагоподібну форму. Іноді в центрі таких клітин спостерігаються ділянки зниженої хроматофільності.

Під час забарвлення гістологічних препаратів для виявлення нейронів з ознаками деструктивних змін (Victorov et al., 2000) встановлено, що вони практично відсутні у тварин КГ (тільки 1,0–1,2%) і з'являються в усіх тварин як при ДГК, так і при ФНСАП. У СМ тварин ГП деструктивно змінені нейрони складають 27,9% серед усіх нейронів.

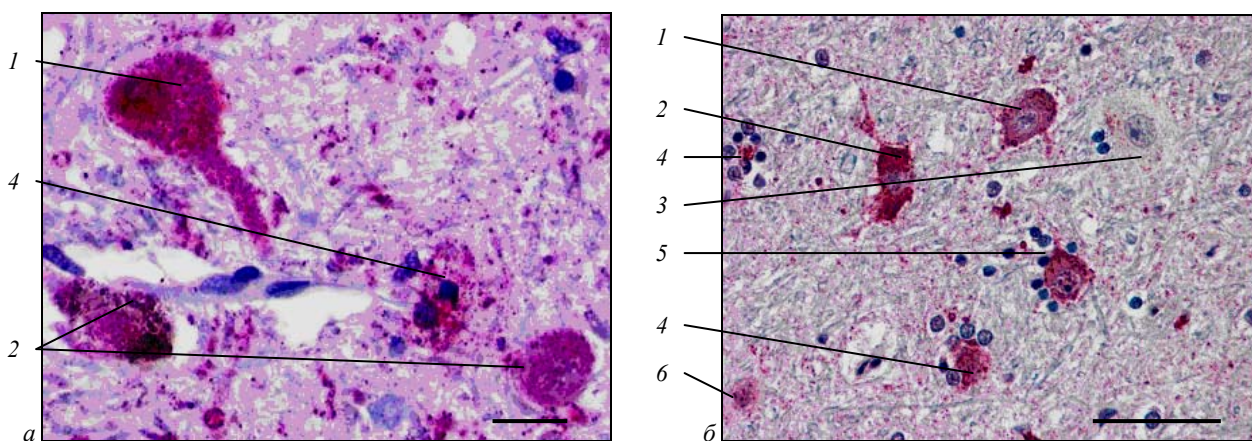


Рис. 1. Гістологічна будова нейронів передніх рогов S_1 спинного мозку щура при довготривалій гіпокінезії:

1 – гіперхромний нейрон без ознак деструкції, 2 – гіперхромний нейрон з ознаками деструкції,

3 – гіпохромний нейрон, 4 – нейронофагія, 5 – сателітоз, 6 – клітина-тінь;

забарвлення за Нісслем; лінії знизу рисунків відповідають 10 мкм (а) та 100 мкм (б)

У цій групі тварин нейрони втрачають свою сферичність, про що свідчить зменшення форм-фактора на 11,4% порівняно з контролем ($P < 0,05$). Ядра

нейронів видовжуються, про що свідчить збільшення чинника елонгації на 4,8% і зменшення мінімального діаметра ядра на 5,3% порівняно з контролем ($P < 0,05$).

Нейроцити при ДГК зменшуються в розмірах, про що свідчить зменшення площі нейроцитів, максимального діаметра та периметра порівняно зі значеннями тварин у контролі. Статистично вірогідно зменшуються площа ядер нейроцитів, їх периметр, максимальний і мінімальний діаметри порівняно зі значеннями в КГ.

Клітини втрачають свою сферичність як порівняно з контролем, так і з тваринами ЕГ (оскільки зменшується форм-фактор), нейроцити при цьому довші, ніж в ЕГ, про що свідчить збільшення чинника елонгації (табл. 1). Ядра нейроцитів також зменшуються, проте форма їх не змінюється (табл. 2).

Таблиця 1

Морфометрична характеристика нейроцитів спинного мозку (M ± m, n = 55)

Параметри	Контроль	ДГК	ФНСАП
Площа, мкм	220,5 ± 12,5	179,1 ± 10,3*	165,0 ± 10,2*
Фактор елонгації	1,22 ± 0,04	1,42 ± 0,06	1,33 ± 0,05*
Форм-фактор	0,85 ± 0,11	0,84 ± 0,10	0,82 ± 0,12
D _{max} , мкм	20,6 ± 1,32	18,2 ± 1,14*	18,3 ± 1,11*
D _{min} , мкм	13,6 ± 1,38	12,5 ± 1,23	12,0 ± 1,15*
Периметр, мкм	56,6 ± 2,22	53,1 ± 2,19	51,4 ± 2,18*

Примітки: D_{max} – максимальний діаметр, D_{min} – мінімальний діаметр, ДГК – тривала гіпокінезія, ФНСАП – фізичне навантаження середньої аеробної потужності, * – статистично вірогідна різниця з контролем P < 0,05; * – статистично вірогідна різниця з групою тварин при гіпокінезії P < 0,05.

Таблиця 2

Морфометрична характеристика ядер нейроцитів спинного мозку щурів (M ± m, n = 55)

Параметри	Контроль	ДГК	ФНСАП
Площа, мкм	90,0 ± 2,24	71,7 ± 2,43*	70,6 ± 2,24*
D _{max}	12,4 ± 1,12	10,9 ± 1,07*	11,0 ± 1,11
D _{min}	9,2 ± 1,04	8,5 ± 1,03*	8,9 ± 1,02
Периметр, мкм	36,0 ± 2,01	32,3 ± 1,97*	32,4 ± 1,86*

Примітки: * – статистично вірогідна різниця порівняно з контролем P < 0,05.

У цитоплазмі нейроцитів тварин ГП порівняно з контролем на 23,5% зменшується вміст РНК (P < 0,05) (табл. 3). При цьому збільшується кількість гіпохромних, гіперхромних без деструктивних змін, гіперхромних нейроцитів з ознаками деструктивних змін і з'являється значна кількість клітин-тіней. При цьому кількість нейроцитів з ознаками деструктивних змін (Victorov et al., 2000) зростає в усіх препаратах. Проте загальна щільність нейроцитів в обох дослідних групах при цьому не змінюється.

Таблиця 3

Вміст РНК у цитоплазмі нейронів спинного мозку щурів, од. опт. щільності (M ± m, n = 55)

Контроль	ДГК	ФНСАП
0,22 ± 0,004	0,16 ± 0,002*	0,21 ± 0,003

Примітка: * – статистично вірогідна різниця порівняно з контролем P < 0,05.

При ДГК спостерігаються виражені структурні та біохімічні (вміст РНК у цитоплазмі) порушення нейроцитів СМ. Вищеописані зміни структури нейроцитів супроводжуються відповідною перебудовою мікросудин, які забезпечують їх кровопостачання. У першу чергу, ми відмітили зменшення просвіту прекапілярів (на 25,4%) і гемокапілярів (на 29,1%), в їх просвіті спостерігаються еритроцитарні складки (рис. 2, а).

Це пов'язано не стільки з вазоконстрикцією, як із набряком ендотеліоцитів. У цитоплазмі цих клітин спостерігаються дві групи мікропіноцитозних пухирців: світлі (діаметр 1 500 нм) і темні (діаметр не перевищує 800 нм). До їх складу включено багато часток колоїдного золота, що свідчить про підвищену проникність

стілки гемокапілярів. При цьому світлі везикули нерідко об'єднуються в трансендотеліальні каналці та мульти-везикулярні тільця (див. рис. 2 б). Морфометричні параметри мітохондрій зменшуються, спостерігається фрагментація крист. У гемокапілярах рухових ядер СМ при ДГК відбувається розширення міжендотеліальних з'єднань, через які легко проходять окремі частки колоїдного золота (рис. 2 в). Базальна мембрана має локальні потовщення та зони гомогенізації.

Після 30-разового ФНСАП у тварин ЕГ відносна кількість нормохромних нейроцитів залишається на рівні показників КГ і становить 53,7% загальної кількості нейроцитів на 1 мм² площі поперечного перерізу СМ (P < 0,05). При цьому відсоток гіперхромних з ознаками деструктивних змін нейроцитів складає тільки 12,6%, а кількість гіперхромних клітин без ознак деструкції зменшується на 14,5% порівняно з ГП (P < 0,05).

Порівняно з контролем морфометричні показники ядер та периаіону гіперхромних нейроцитів без деструктивних ознак не мали статистично вірогідних відмінностей ані при ДГК, ані при ФНСАП. Проте мінімальний діаметр у тварин ЕГ статистично вірогідно збільшується на 17,1% порівняно з ГП (P < 0,05). Гіпохромні деструктивно змінені нейроцити складають менше 10,0% (P < 0,05), що свідчить про виражену протекторну роль ФНСАП щодо підвищення стійкості нейроцитів до ДГК. Морфологічні показники нейроцитів та їх ядер після ФНСАП статистично не відрізняються від таких у контрольній групі. У нейроцитах тварин ЕГ вміст РНК збільшується на 12,6% порівняно з ГП (P < 0,05).

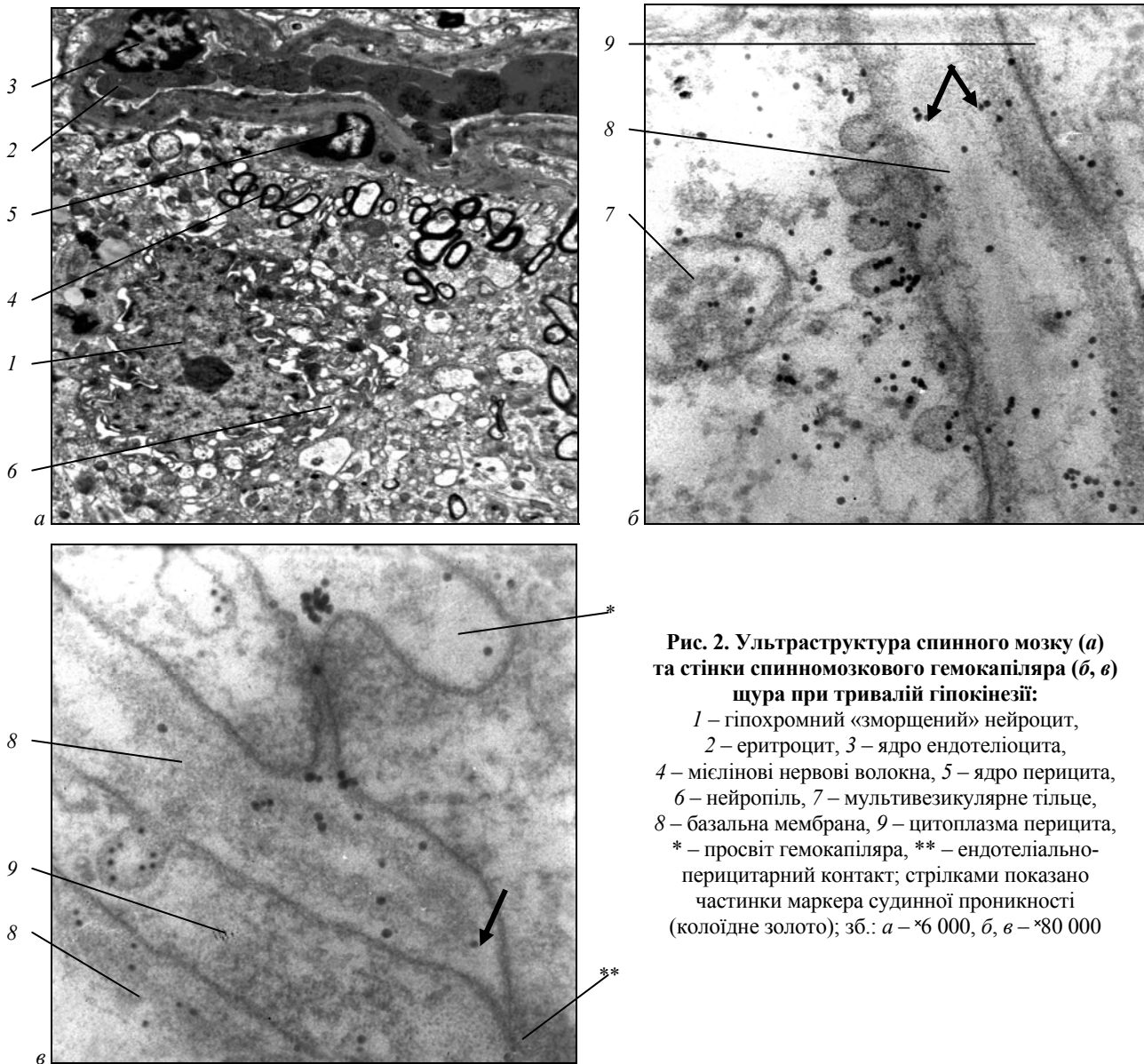


Рис. 2. Ультраструктура спинного мозку (а) та стінки спинномозкового гемокапіляра (б, в) щура при тривалій гіпокінезії:

1 – гіпохромний «зморщений» нейрцит, 2 – еритроцит, 3 – ядро ендотеліоцита, 4 – мієлінові нервові волокна, 5 – ядро перицита, 6 – нейропіль, 7 – мультівезикулярне тільце, 8 – базальна мембрана, 9 – цитоплазма перицита, * – просвіт гемокапіляра, ** – ендотеліально-перицитарний контакт; стрілками показано частинки маркера судинної проникності (колоїдне золото); зб.: а – $\times 6\ 000$, б, в – $\times 80\ 000$

Обговорення результатів досліджень

Проведене нами дослідження підтверджує результати, отримані іншими авторами (Smirnov et al., 2000; Jerastova et al., 2001; Bagautdinov and Vasil'ev, 2005; Nepomnjashchih and Bakarev, 2009), які вказують на деструктивний характер змін у різних органах і тканинах при ДГК. Ми підтримуємо їхню думку про те, що регресивні зміни в нейрцитах є неспецифічним пристосуванням організму до умов гіпокінезії, які спричинюють обмеження адаптаційних можливостей організму (Matsuzaki and Sampath, 2007). Ймовірно, такий характер морфологічних змін зумовлений накопиченням у клітинах недоокислених продуктів метаболізму та вільних радикалів, що провокує своєрідні ланцюгові реакції, які зумовлюють деградацію нейрцитів (Сіобіса et al., 2010; Soubeyrand et al., 2013). Результати досліджень вказують на те, що вільні радикали порушують цілісність мембран лізосом і підвищують їх проникність для нуклеаз. Останні виходять у цитоплазму та пошкоджують геном клітин, що узгоджується з уявленнями

багатьох авторів (Wielgat and Braszko, 2012; Machovic et al., 2013; Cash et al., 2014). ДГК супроводжується також активізацією локусів хроматину, які визначають синтез антитіл на певний вид білків. Такі явища зумовлюють утворення в організмі антитіл на власні білки та пошкодження імунними комплексами окремих клітин і тканин (Udina et al., 2011; Raimondo et al., 2011).

На підтвердження цього у віддалені терміни експерименту ми відмітили зменшення кількості нормохромних нейрцитів і збільшення числа нейрцитів із явищами дисхромії. Відомо, що порушення тинкторіальних властивостей клітин є однією з перших ознак розвитку деструктивних процесів (Zhabotinskij, 1965; Wielgat and Braszko, 2012).

При цьому гіпохромія та гіперхромія нейрцитів без деструктивних змін розцінюються як зміни зворотного характеру, а утворення «клітин-тіней», гіперхромію з деструкцією нейрцитів відносять до «важких» незворотних змін (Bagautdinov and Vasil'ev, 2005; Nechipurenko et al., 2008). Ми встановили, що ДГК суттєво впливає на морфологію «клітин-тіней»: їх перикаріон набуває розмитих контурів і характеризується різноманітним

рівнем хроматофілії. Ідентифікація ядра та ядерця в таких нейронах досить проблематична, тому ряд авторів (Matsuzaki and Sampath, 2007; Raimondo et al., 2011; Willis, 2011) такі клітини ідентифікуює як фрагменти деструктивно змінених нейронів. Ми також схильні підтримати їхню думку тому, що нерідко спостерігали «клітини-тіні» на гістологічних препаратах, а під час ультраструктурного дослідження вони виявлялися у вигляді «зморщених» і фрагментованих клітин.

Поява різноманітних форм нейронів у рухових ядрах СМ при ДГК свідчить про перенапруження метаболічних процесів в одних нейронах і незворотні зміни в інших клітинах. Підтвердженням цього є значне збільшення кількості ацидофільних нейронів. Ацидофілія свідчить про важке пошкодження нейронів та їх остаточну дегенерацію (Zhabotinskij, 1965; Mickan and Popel, 2001; Bagautdinov and Vasil'ev, 2005; Soubeyrand et al., 2013).

При ДГК структурна перебудова поєднується з вираженими біохімічними (вміст РНК у цитоплазмі) змінами нейронів СМ, що свідчить про порушення біосинтетичних процесів (Chugunov et al., 2009).

Результати експериментального вивчення метаболічних пошкоджень СМ дозволили виділити гострий і хронічний варіанти розвитку змін і відповідні спектри структурних реакцій. Гострі пошкодження нейронів пов'язані в основному з ішемією та активацією лізосомних ферментів. Їх можна умовно поділити на дві групи: вогнищеві та дифузні. Оскільки відновлення складної нейроархітектури СМ пов'язане з великими енергетичними витратами, багато з вогнищевих проявів деструкції мають пристосувально-адаптивне значення (Ivanov, 2002; Udina et al., 2011).

Під час поступового наростання порушень енергетичного метаболізму перші адаптивні реакції розвиваються на рівні мітохондріального компартменту та з часом змінюються його структурною декомпенсацією. Посилення фрагментації крист мітохондрій може мати «превентивний» характер, сприяючи усуненню незворотно пошкоджених мітохондрій, і може розглядатися як перший («метаболічний») етап клітинної стратегії, спрямованої на обмеження пошкодження. При загрозі тотального руйнування нейронів критичне значення в стратегії обмеження набуває їх «механічна» фрагментація, пов'язана з деструктивними реакціями, а також позаклітинні чинники, що забезпечують видалення пошкодженого фрагмента та репарацію утвореного дефекту. Недостатність цих реакцій або екстремальний характер дії ДГК може спричинити розповсюдження пошкодження на значну частину або всю ділянку рухового ядра СМ. Такі зміни супроводжуються дегенерацією нейронів (Soubeyrand et al., 2013).

Активність нейронів нерозривно пов'язана з навколишньою макроглією та мікроциркуляторним руслом (Shvalev et al., 2001; Popel, 2013). Із часу описання єдиної нейроно-гліо-капілярної метаболічної системи (Zhabotinskij, 1965) зацікавленість до взаємовідношень її складових компонентів невпинно зростає. І все ж питання про їх структурну перебудову за умов ДГК висвітлене недостатньо, має суперечливий характер (Smirnov et al., 2000; Nechipurenko et al., 2008; Popel, 2013; Cash et al., 2014). Повідомлення про нейрон-гліо-капілярні взає-

мовідношення у СМ при ДГК практично відсутні. Що стосується кровопостачання рухових центрів СМ, ми не зовсім згодні з окремими авторами (Matsuzaki and Sampath, 2007), які стверджують, що воно забезпечується тільки гемокапілярами, оскільки ми знаходили в ньому всі складові ГМЦР.

Відповідна перебудова МЦР у віддалені терміни ДГК відображає порушення регуляторних механізмів мікроциркуляції, які лежать в основі певного гемодинамічного режиму, зумовлюють недосконалість шляхів перерозподілу кровотоку, адекватного та економічного їх використання (Machovic et al., 2013; Popel, 2013), що спричинює виснаження функціональних резервів ГМЦР (Rakowska et al., 2012).

Зменшення кількості гемокапілярів із терміном ДГК можна пояснити порушенням зв'язку між ендотеліоцитами. Ми встановили, що фіксація між окремими ендотеліоцитами за таких умов послаблена. Внаслідок цього вони стають мобільнішими, міжклітинні контакти розширюються, що виступає своєрідним морфологічним маркером порушення бар'єрної функції гемокапілярів (Nechipurenko et al., 2008; Popel, 2013).

На фоні порушеного гемато-неврального бар'єру інтенсивність проникнення дрібномолекулярних білків у паравазальний простір збільшується, що було нами показано у ранній праці (Popel, 2013) на моделі проникнення наночасток золота через судинну стінку. Таке саме явище спостерігали різні автори у спінальних рухових центрах різних тварин, у трійчастому ганглії людини та вузлах на різному рівні симпатичного стовбура у вівці та кішки, внутрішньом'язових нервах собаки та щура (Breit, 2002; Arciszewski et al., 2006; Raimondo et al., 2011; Rusu et al., 2011). Як стверджують ці автори, нейрони в умовах зниженої аферентації вимагають для підтримання власної метаболічної активності значно інтенсивнішого кровопостачання. Однак при ДГК порушуються тісні нерво-гліо-капілярні взаємовідношення СМ. Оскільки цей комплекс поліморфний і динамічний, він залежить від гемодинаміки та механізмів мікроциркуляції, закономірностей нейроархітектури, рівня метаболізму та активності гліальних клітин (Majovski and Breiger, 2009; Willis, 2011; Popel, 2013). У даній роботі ми не проводили спеціального дослідження стану нейроглії при ДГК, але з даних літератури відомо, що екстрацелюлярні проміжки представлені міжклітинними щилинами, які обмежуються мембранними структурами нерво-гліокапілярних комплексів і розглядаються як безпосередня ланка гемато-неврального бар'єру (Rusu et al., 2011; Willis, 2011). Багатогранність фізіологічних процесів, які тут відбуваються, забезпечує підтримання сталості міжклітинного простору. Він представлений різними глікозаміногліканами (Willis, 2011) і доповнюється клітинами фібробластичного ряду, окремими колагеновими волокнами (Sengul, 2015). Зміни концентрації та конформації цих компонентів визначають виникнення значних морфофункціональних зрушень у рухових нейронах СМ за ДГК. Крім того, звертається увага на наявність у цих просторах медіаторів, нейрогормонів, гормонів периферичних ендокринних залоз та інших біологічно активних речовин (Nepomnjashchih and Bakarev, 2009; Soubeyrand et al., 2014), які активізують процеси перебудови нейронів при ДГК.

Таким чином, міжмембранний вміст треба розглядати одночасно як інтегроване та інтегровальне середовище, через яке реалізуються гуморальні механізми об'єднання всіх складових елементів СМ в єдине ціле. Мембранні структури та міжмембранні проміжки являють єдиний комунікаційний канал, який забезпечує вибірково-двобічний транспорт речовин і впливає на рівень метаболічних процесів у нервовій тканині (Bagautdinov and Vasil'ev, 2005; Raimondo et al., 2011; Soubeyrand et al., 2013).

При ФНСАП у післягіпокінетичному періоді просторова організація та гісто-ультраструктура нейронів та їх ГМЦР зазнають значних змін. Вони лежать в основі збільшення інтенсивності їх кровопостачання та відображають глибоку трансформацію процесів метаболізму у реабілітаційному періоді експерименту (Ivanov, 2002; Nepomnjashchih and Bakarev, 2009). Це проявляється у значному згущенні кровоносного русла, зменшенні кількості плазматичних капілярів, відновленні рівномірності їх контурів і цілісності капілярних петель. Наші дані про збільшення загальної кількості гемокапілярів навколо окремих нейронів підтверджуються морфометричними показниками. Певні зміни гемокапілярів та їх взаємовідносин з навколишніми тканинами відбуваються на ультраструктурному рівні, свідчать про підвищення енергозабезпечення та білоксинтезувальної функції в нейронах (Ivanov, 2002; Nechipurenko et al., 2008; Popel, 2013), активізацію процесів транспорту речовин (Jerastova et al., 2001; Cach et al., 2014), а також про зниження перекисного окиснення ліпідів. Такі явища після 30-разового ФНСАП мають генералізований характер. Вони доповнюються відновленням структури міжнотеліальних контактів, що зумовлює поліпшення гемоциркуляції, зменшення явищ гіпоксії та спостерігається в інших органах і тканинах не тільки при ДГК, а й у відновному періоді у цілій низці патологічних процесів (Jerastova et al., 2001; Chugunov et al., 2009; Nepomnjashchih and Bakarev, 2009; Ciobica et al., 2010). Комплекс перерахованих змін лежить в основі структурного та функціонального впливу ФНСАП на складові гемато-неврального бар'єру (Mqjovski et al., 2009; Popel, 2013; Machovic et al., 2013).

Застосування 30-разового ФНСАП викликає зменшення дисхромічних форм нейронів. Морфологічні показники нейронів та їх ядер після ФНСАП статистично не відрізняються від таких у контрольній групі. В ЕГ гіпохромні деструктивно змінені нейрони складають менше 10,0%, а кількість гіперхромних клітин зменшується до 4,5% ($P < 0,05$), що свідчить про протекторну роль ФНСАП, яка виражається у підвищенні стійкості нейронів в умовах ДГК. У нейронах тварин ЕГ вміст РНК збільшується на 12,6% порівняно з ГП ($P < 0,05$).

Ряд авторів (Kamskova, 2001; Ivanov, 2002; Sazontova et al., 2007; Stogov, 2009) зазначають, що рухова активність суттєво впливає на білоксинтезувальні процеси у клітинах різних органів і тканин. Відновлення структури нейронів після ФНСАП зумовлює поліпшення нейрогістологічних показників, що свідчить про значну пластичність структур нервової системи при ФНСАП після ДГК (Raimondo et al., 2011; Rakowska et al., 2012; Sengul et al., 2015).

Висновки

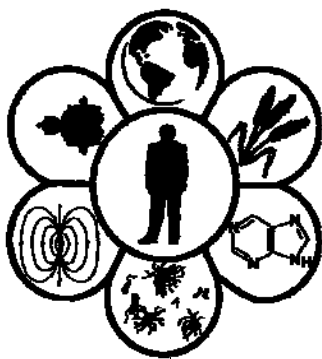
1. У нейронах спинного мозку щурів після тривалої гіпокінезії розвиваються значні морфофункціональні зміни, які характеризуються появою значної кількості гіперхромних з ознаками деструктивних змін нейронів і «клітин-тіней», а також гіпохромних з ознаками деструктивних змін нейронів, зменшенням розмірів і зміною форми перикарионів нейронів та їх ядер.
2. Морфологічні зміни нейронів після тривалої гіпокінезії супроводжуються порушенням біосинтетичних процесів, про що свідчить зниження вмісту РНК у цитоплазмі еферентних нейронів спинного мозку щурів.
3. Фізичне навантаження середньої аеробної потужності викликає нормалізацію структурно-функціонального стану нейронів і сприяє посиленню репаративних процесів, що підтверджується позитивними змінами морфометричних показників.

Бібліографічні посилання

- Arciszewski, M.B., Wąsowicz, K., 2006. Neurochemical properties of the middle cervical ganglion in the sheep. *Ann. Anat.* 188(1), 75–83.
- Bagautdinov, I.R., Vasil'ev, J.G., 2005. Morfologija dvigateľnyh jader spinnogo mozga pri hronicheskoj gipokinezii [Morphology of motive kernels of spinal cord at chronic hypokinesia]. *Fundamental'nye Issledovaniya* 5, 104–104 (in Russian).
- Breit, S., 2002. Functional adaptations of facet geometry in the canine thoracolumbar and lumbar spine (Th10-L6). *Ann. Anat.* 184(4), 379–385.
- Cash, W.J., O'Neill, S., O'Donnell, M.E., McCance, D.R., Young, I.S., McEnery, J., McDougall, N.I., Callender, M.E., 2014. Endothelial function, antioxidant status and vascular compliance in newly diagnosed HFE C282Y homozygotes. *Adv. Med. Sci.* 59(10), 28–33.
- Chugunov, A.V., Kamchatnov, P.R., Mihajlova, N.A., 2009. Korrekcija svobodnoradikal'nogo okislenija patogeneticheskij podhod k lecheniju ostrogo ishemicheskogo insulta [Correction of free radical oxidization is pathogenetic approach to treatment of sharp ischemic stroke]. *Zhurnal Nevrologii i Psihatrii* 10, 65–67 (in Russian).
- Ciobica, A., Hritcu, L., Padurariu, M., Dobrin, R., Bild, V., 2010. Effects of serotonin depletion on behavior and neuronal oxidative stress status in rat: Relevance for anxiety and affective disorders. *Adv. Med. Sci.* 55(2), 289–296.
- Dykman, L., Khlebtsov, N., 2012. Gold nanoparticles in biomedical applications: Recent advances and perspective. *Chem. Soc. Rev.* 41, 2256–2282.
- Ivanov, K.P., 2002. Voprosy stroenija i funkcii sistemy jenergosnabzhenija nejrona [Questions of structure and function of the system of energy supply of neuron]. *Kolosovskie Chtenija: Mater. IV Mezhdunar. Konf. po Funkcional'noj Nejromorfologii*. SPb., 44 (in Russian).
- Jerastova, E.R., Samarin, M.J., Birjukova, O.V., 2001. Morfofunkcional'nye izmenenija jelementov nervnoj i jendokrinoj sistem pri razlichnyh dvigateľnyh rezhimah [Morphofunctional changes of elements of the nervous and endocrine systems at different motive modes]. *Morfologija* 121, 187–190 (in Russian).
- Kamskova, Y.G., 2001. Changes in the antioxidant state and intensity of lipid peroxidation in the blood and liver during 30-day hypokinesia. *Bull. Exp. Biol. Med.* 132(10), 387–389.

- Levit'kiy, V.A., Popel, S.L., Zhurakivs'ka, O.J., 2014. Sposib viznachennja rivnja fizichnogo navantazhennja dlja shhuriv z eksperimental'nim strepozotocinovim diabetom [Method of determination of level of the physical loading for rats with experimental streptozocin diabetes]. Pat. 92278, Ukraïna. MKI A61 V 5/024; A61N 3/00 / – № 92278; Zajavl. 03.03.2014; Opubl. 11.08.2014, Bjul. 15, 5 (in Ukrainian).
- Mahovic, D., Zurak, N., Lakusic, N., Sporis, D., Zarkovic, N., Stancin, N., Bosnar-Puretic, M. 2013. The dynamics of soluble Fas/APO 1 apoptotic biochemical marker in acute ischemic stroke patients. *Adv. Med. Sci.* 58(2), 298–303.
- Majovski, L.V., Breiger, D., 2009. Development of higher brain functions: Birth through adolescence. In: *Handbook of Clinical Child Neuropsychology*. Springer Science + Business Media, LLC.
- Matsuzaki, F., Sampath, K., 2007. Wiring the nervous system: From form to function. *Development* 134, 1819–1822.
- Mickan, B.M., Popel, S.L., 2001. Nervovo-m'jazovij aparat i gipokinezija [Nerve-muscle vehicle and hypokinesia]. *Koncepcija Rozvitku Galuzi Fizichnogo Vihovannja i Sportu v Ukraini*. Prajt Hauz, Rivne 2, 148–151 (in Ukrainian).
- Narymbetova, T.M., Ormanbaev, K.S., Bajzakova, B.U., 2011. Gipokinezija i giperkinezija kak faktory riska v jekstremal'nyh uslovijah [Hypokinesia and hyperkinesia as risk factors in extreme terms]. *Uspehi Sovremennogo Estestvoznanija* 5, 64–66 (in Russian).
- Nechipurenko, N.I., Pashkovskaja, I.D., Musienko J.I., 2008. Osnovnye patofiziologicheskie mehanizmy ishemii spinogo mozga [Basic patophysiological mechanisms of ischemia of spinal cord]. *Medicinskie Novosti* 1, 713–716 (in Russian).
- Nepomnjashchih, L.M., Bakarev, M.A., 2009. Morfogenez metabolicheskikh povrezhdenij skeletnyh myshc: Strategija ograniczenija povrezhdenija [Morfogenez of metabolic damages of skeletal muscles: Strategy of limitation of damage]. *Vestnik Rossijskoj Akademii Medicinskih Nauk* 7, 13–19 (in Russian).
- Poľubińska, A., Staniszewski, R., Baum, E., Sumińska-Jasińska, K., Bręborowicz, A., 2013. Sulodexide modifies intravascular homeostasis what affects function of the endothelium. *Adv. Med. Sci.* 58(2), 304–310.
- Popel, S.L., 2013. Changeability of neurons of spinal cord of rats of a different age in norm. *European Applied Sciences* 3(1), 14–16.
- Popel, S.L., 2013. Budova mikroциркуляторного rusla okremih elementiv prostoї reflektornoї dugi pri obmezheni ruhovoi aktivnosti [Structure of microcirculatory network of separate elements of simple reflex arc at limitation of motive activity]. *Visnik Morfologii*. Vinnicja 19(1), 10–15 (in Ukrainian).
- Popel, S.L., Mickan, B.M., 2013. Trivalist', ob'yem ta intensivnist' fizichnih navantazhen' pislja dii dovgotrivaloї gipokinezij [Duration, volume and intensity of the physical loadings after action of of long duration hypokinesia]. *A.s.* 49326, Ukraine. MKI A61 V 5/024 / . – № 49326; Zajavl. 20.12.2012; Opubl. 27.05.13, Bjul. 12, 4 (in Ukrainian).
- Rakowska, A., Rudnicka, L., Olszewska, M., Kurzeja, M., 2012. *Blood Vessels*. Springer-Verlag, London.
- Raimondo, S., Fornaro, M, Tos, P., Battiston, B., Giacobini-Robecchi, M.G., Geuna, S., 2011. Perspectives in regeneration and tissue engineering of peripheral nerves. *Ann. Anat.* 193(4), 334–340.
- Rebrova, O.J., 2006. Statisticheskij analiz medicinskih dannyh. Primenenie paketa prikladnyh programm Statistica [Statistical medical data analysis. Application of the Statistica application package]. *MediaSfera*, Moscow (in Russian).
- Rusu, M.C., Pop, F., Hostiuc, S., Dermengiu, D., Lală, A.I., Ion, D.A., Mănoiu, V.S., Mirancea, N., 2011. The human trigeminal ganglion: C-kit positive neurons and interstitial cells. *Ann. Anat.* 193(5), 403–411.
- Sazontova, T.G., Anchishkina, N.A., Archipenko, Y.V., 2007. Induction of HSPs and antioxidant defense enzymes during activation of free radical oxidation at the early stage of hypokinesia. *Bull. Exp. Biol. Med.* 143(4), 378–382.
- Shvalev, V.N., Sosunov, A.A., Majorov, V.N., 2001. Nervnaja tkan' i nejroglia [Nervous fabric and neuroglia]. *SpecLit*, SPb (in Russian).
- Sengul, G., 2015. Peripheral nervous system spinal cord cyto- and chemoarchitecture. In: *The rat nervous system* (Fourth Ed.). G. Paxinos (Ed.). Section II, 87–95.
- Sies, H., 2015. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biology* 4, 180–183.
- Smirnov, A.V., Chernov, D.A., Ivanauskene, N.J., 2000. Izmenenie struktury perifericheskikh otdelov nervnoj i jendokrinnoj sistem rastushhego organizma pod vlijaniem gipodinamii i gipokinezii [The change of structure of peripheral departments of the nervous and endocrine systems of growing organism under influencing is hypodinamia and hypokinesia]. *Morfologija* 117(3), 112–115 (in Russian).
- Smirnov, J.I., Smirnova, Z.D., Efranova, V.V., 2000. Vozrastajushhaja gipodinamija v sovremennom obshhestve – opasnyj nedug podrastajushhego pokolenija [Increasing hypodinamia in modern society is the dangerous ailment of rising generation]. *Fizicheskaja kul'tura i sport v zhizni obshhestva: Mater. Mezhdunar. Nauch. Prakt. Konf. Cheljabinsk*, 92–94 (in Russian).
- Soubeyrand, M., Laemmel, E., Court, C., Dubory, A., Vicaut, E., Duranteau, J., 2013. Rat model of spinal cord injury preserving dura mater integrity and allowing measurements of cerebrospinal fluid pressure and spinal cord blood flow. *Eur. Spine J.* 22, 632–635.
- Soubeyrand, M., Dubory, A., Laemmel, E., Court, C., Vicaut, E., Duranteau, J., 2014. Effect of norepinephrine on spinal cord blood flow and parenchymal hemorrhage size in acute-phase experimental spinal cord injury. *Eur. Spine J.* 23, 358–365.
- Stogov, M.V., 2009. Creatine metabolism in skeletal muscles during hypokinesia. *Bull. Exp. Biol. Med.* 148(7), 34–36.
- Udina, E., Cobianchi, S., Allodi, I., Navarro, X., 2011. Effects of activity-dependent strategies on regeneration and plasticity after peripheral nerve injuries. *Ann. Anat.* 193(4), 347–353.
- Victorov, I.V., Prass, K., Dirnagl, U., 2000. Improved selective, simple, and contrast staining of acidophilic neurons with vanadium acid fuchsin. *Brain Res. Protoc.* 5, 135–139.
- Wielgat, P., Braszko, J.J., 2012. Significance of the cell adhesion molecules and sialic acid in neurodegeneration. *Adv. Med. Sci.* 57(1), 23–30.
- Willis, C.L., 2011. Glia-induced reversible disruption of blood-brain barrier integrity and neuropathological response of the neurovascular unit. *Toxicol. Pathol.* 39(1), 172–185.
- Wu, S., Wum, Y., Capecchi, M.R., 2006. Motoneurons and oligodendrocytes are sequentially generated from neural stem cells but do not appear to share common lineage – restricted progenitors in vivo. *Development* 133(4), 581–590.
- Zhabotinskij, J.M., 1965. Normal'naja i patologicheskaja morfologija nejrona [Normal and pathological morphology of neuron]. *Medicina*, Leningrad (in Russian).

Надійшла до редколегії 21.01.2015



УДК 577.112.85+616-005.3-08

Роль фібронектину за дії доксорубіцину

Я.В. Бабець¹, А.О. Петрушенко¹, А.І. Шевцова², Г.О. Ушакова¹

¹Дніпропетровський національний університет імені Олеса Гончара, Дніпропетровськ, Україна
²Державний заклад «Дніпропетровська медична академія», Дніпропетровськ, Україна

Досліджено рівень фібронектину у моделі доксорубіцин-індукованої кардіоміопатії та ефекту цього цитостатика на фібронектин разом з антиоксидантами різної природи. Отримані дані вказують на те, що розвиток пошкоджень серця за дії доксорубіцину супроводжується зниженням концентрації загального білка, підвищенням рівня фібронектину в плазмі крові щурів та його зниженням у гомогенаті серцевого м'язу. Застосування доксорубіцину протягом 4 тижнів спільно з 1% α -кетоглутаратом у питній воді або корвітином (5 мг/кг перед уведенням доксорубіцину) суттєво не запобігає зміні вказаних параметрів. За впливу доксорубіцину зниження концентрації фібронектину в серці корелює зі зниженням концентрації загального білка у плазмі крові та серцевому екстракті, що свідчить про порушення анаболічної частини метаболізму білків за дії даного антибіотика.

Ключові слова: доксорубіцин; фібронектин; загальний білок; кардіопатія

Role of fibronectin under conditions of doxorubicin action

Y.V. Babets¹, A.O. Petrusenko¹, A.I. Shevtsova², G.A. Ushakova¹

¹Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine
²“Dnipropetrovsk Medical Academy” State Enterprise, Dnipropetrovsk, Ukraine

There is no standard as to treatment of anthracycline chemotherapy complications. The reduction of cytotoxic drugs toxicity without weakening of their antitumor action remains relevant. The extracellular matrix which key component is fibronectin is present in all tissues and it continuously undergoes controlled remodeling. So, the purpose of our work was to study the level of fibronectin in the experimental model of doxorubicin-induced cardiomyopathy and effects of this cytostatic and its co-administration with antioxidants of different nature. The level of fibronectin was measured by ELISA using monospecific antibodies against fibronectin (Sigma, USA), secondary anti-IgG labeled with horseradish peroxidase (Sigma, USA) and fibronectin standard (Sigma, USA). The study was conducted on Wistar male rats with weight of 210 ± 50 g which were divided into 4 groups by 8 animals in each group: 1 – control, rats receiving saline i/p; 2 – doxorubicin 1 mg/kg i/p once a week during 4 weeks; 3 – doxorubicin by the same scheme plus 1% 2-oxoglutarate in drinking water during 4 weeks; 4 – doxorubicin by the same scheme and korvitin injection 30 min before doxorubicin application once a week during 4 weeks. Obtained data indicate the effect of doxorubicin to decrease in index mass heart in 38% of animals compared to control animals; decrease in total protein concentration by 8% ($P < 0,05$) and increase of the level of fibronectin by 67% ($P < 0,001$) in blood plasma of rats and decrease in the level of fibronectin in the heart extract by 19% ($P < 0,05$) under development of doxorubicin-induced cardiotoxicity. Increased fibronectin concentration in blood plasma had strong correlation with decreased total protein concentration in blood ($r = 0,80$) and heart extract ($r = 0,59$) in rats with doxorubicin-induced cardiomyopathy indicating the sensitive reaction of fibronectin to development of metabolic disorders under doxorubicin influence.

Keywords: doxorubicin; fibronectin; total protein; cardiomyopathy

Дніпропетровський національний університет імені Олеса Гончара, пр. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ, 49010, Україна
Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, pr. Gagarina, 72, Dnipropetrovsk, 49010, Ukraine

Державний заклад «Дніпропетровська медична академія», вул. Дзержинського, 9, Дніпропетровськ, 49044, Україна
State Establishment “Dnipropetrovsk Medical Academy”, Dzerzhinsky str., 9, Dnipropetrovsk, 49044, Ukraine
Tel.: +38-097-789-66-43. E-mail: kristabxx@yandex.ru

Позаклітинний матрикс – динамічна структура, присутня в усіх тканинах, яка безперервно проходить контрольоване ремоделювання. Під час розвитку будь-яких патологій склад міжклітинного матриксу зазнає значних змін (Tiwari et al., 2013). Ключовий білок екстрацелюлярного матриксу фібронектин у тканині за фізіологічних умов забезпечує суттєві зв'язки через інтегрини та інші рецептори, сприяє клітинній адгезії, міграції та диференціації (Schwarzbauegand et al., 2011), також бере участь у здійсненні захисних реакцій організму (Kelsh et al., 2014). Фібронектиновий матрикс – складна мережа полімеризованих волокон, які зазнають великих перебудов під час розвитку та відновлення тканин, а також за прогресування більшості захворювань (Kelsh et al., 2014). Фібронектин бере участь у канцерогенезі, модулюючи формування судин та ріст пухлини за рахунок регуляції кількості васкулярного ендотеліального фактора росту (VEGF) (Naci, 2012; von Au et al., 2013), стійкості пухлинних клітин до лікувальних агентів. На основі властивостей фібронектину зараз розглядається можливість створення лікувальних агентів, коли фібронектин є мішенню для доставки фактора некрозу пухлин до новоутворень (Hemmerle et al., 2013).

Ефективне лікування пухлин антрацикліновими препаратами обмежується тяжкістю побічних ефектів на здорові тканини та органи, найважчим серед яких вважається пошкодження тканин серця з подальшим розвитком серцевої дисфункції, кардіоміопатії, що в кінцевому підсумку призводить до важкої серцевої недостатності та смерті (Zhang et al., 2009). Механізми, відповідальні за доксорубіцин-індуковану кардіотоксичність, не повністю з'ясовані, але вже відомо, що доксорубіцин індукує окисний стрес, порушення мітохондріальної та ядерної ДНК, активацію апоптозу, некрозу тощо (Distefano, 2009; Strigun et al., 2012; Babets et al., 2013).

Нині немає ніяких стандартів лікування ускладнень антрациклінової хіміотерапії, тому питання про зменшення токсичності цих цитостатиків без значного зниження їх протипухлинної дії залишається актуальним. Природні антиоксиданти, які не мають потенційно шкідливого впливу на організм пацієнта, можна вважати терапевтичними та профілактичними. До таких речовин можна віднести корвітин (водорозчинна форма біофлавоноїду кверцетину) і α -кетоглутарат (метаболіт циклу трикарбонних кислот). Перший має антиоксидантну активність, другий безпосередньо впливає на енергетичний метаболізм клітин. Поряд із тим, α -кетоглутарат може виступати як детоксикант активних форм кисню та аміаку, тобто має антиоксидантні властивості. Невідомо, як ці агенти впливають на метаболізм фібронектину в серці та крові під час застосування антрациклінових препаратів (Gordienko et al., 2014).

Отже, мета нашої роботи – визначити рівень фібронектину в плазмі крові та екстракті серця за умов експериментальної моделі доксорубіцин-індукованої кардіоміопатії та ефекту цього цитостатика разом з антиоксидантами різної природи.

Тварини. Дослідження проводили на білих щурах-самцях лінії Вістар вагою 210 ± 50 г. Тварин поділено на чотири групи по 8 особин у кожній. Тварин утримували у віварії ДЗ «Дніпропетровська медична академія» у стандартних умовах із вільним споживанням води та їжі протягом усього експериментального періоду. Всі експериментальні протоколи та поведіння з тваринами схвалені місцевим етичним комітетом (Дніпропетровськ, Україна).

Модель доксорубіцин-індукованої кардіотоксичності. До першої групи увійшли контрольні тварини, які отримували ін'єкції фізіологічного розчину. У другій групі щурам вводили внутрішньочеревинно доксорубіцин у дозі 1 мг/кг один раз на тиждень протягом чотирьох тижнів. Третя група отримувала доксорубіцин за такою самою схемою, як і друга група, та водний розчин 1% α -кетоглутарату у питній воді протягом усього експерименту. Щодня тварини третьої групи вживали 43 мл питної рідини на 1 кг ваги. Четверта група тварин отримувала внутрішньочеревинно ін'єкції корвітину (Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод, Україна) у дозі 5 мг/кг за 30–60 хв до уведення доксорубіцину за наведеною схемою. Після закінчення п'ятого тижня експерименту всіх тварин декапітували з використанням тіопенталу натрію в дозі 60 мг/кг згідно з вимогами Міжнародної конвенції з правил гуманного поводження з дослідними тваринами.

Імуноферментний аналіз. Із тканин серцевого м'яза виділяли цитозольну фракцію білків. Спочатку тканину гомогенізували у співвідношенні 1 : 10 у буфері А (трис-НСІ – 25 мМ; рН 7,4; ЕДТО – 1 мМ; дитіотреїтол 0,01%, суміш протеазних інгібіторів – 2 мМ), після чого центрифугували за 20 000 г протягом 60 хв, супернатант відокремлювали для подальшого аналізу. Рівень фібронектину вимірювали за допомогою імуноферментного аналізу з використанням моноспецифічних антитіл проти фібронектину (Sigma, США), вторинних анти-IgG, мічених пероксидазою хрому (Sigma, США) та очищеного фібронектину як стандарту (Sigma, США). Вимірювання проводили за допомогою імуноферментного рідера Antos 2010 (Фінляндія) за 492 нм. Концентрацію загального білка визначали методом Бредфорд (Bradford et al., 1976).

Статистичну обробку результатів здійснювали з використанням t-критерію Стьюдента. Вірогідними вважали результати при $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення

У даному дослідженні визначено зниження маси серця щурів з $1,3 \pm 0,3$ г у контрольних тварин до $1,2 \pm 0,1$ за умов дії доксорубіцину 1 мг/кг щотижня протягом чотирьох тижнів, а у перерахунку на вагу тіла індекс маси серця за дії доксорубіцину знижувався на 38% ($P < 0,05$) і склав $4,6 \cdot 10^{-3}$ порівняно з контрольними щурами, індекс маси серця яких склав $7,5 \cdot 10^{-3}$. Застосування як α -кетоглутарату, так і корвітину протягом дії доксорубіцину викликало запобігання зниження індексу маси серця на 8% ($P = 0,06$) за дії α -кетоглутарату та на 13% ($P < 0,05$) за дії корвітину. Раніше було встановлено, що у разі введення доксорубіцину у дозі 7 мг/кг відбувалось

значне зниження маси серця вже через два тижні після застосування препарату (Lushnikova et al., 2011). У нашому дослідженні встановлено, що вже за дози доксорубіцину 1 мг/кг ваги один раз на тиждень тривалістю чотири тижні маса серця у щурів вірогідно знижувалася.

За умов впливу доксорубіцину протягом чотирьох тижнів встановлено вірогідне зниження концентрації

загального білка в плазмі крові дослідних тварин на 8% ($P < 0,05$, $55,9 \pm 1,9$ мг/мл) (рис. 1). Антиоксидантні препарати на фоні дії доксорубіцину не зумовлювали досягнення рівня загального білка в плазмі крові дослідних щурів. В екстрактах із серцевого м'яза тварин усіх досліджуваних груп не визначено вірогідних змін концентрації загального білка як за дії доксорубіцину, так і спільно з антиоксидантними речовинами (рис. 1).

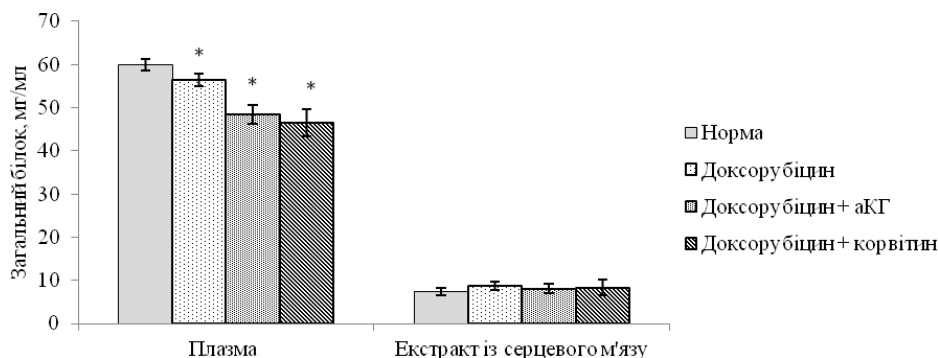


Рис. 1. Концентрація загального білка в плазмі крові та екстракті із серцевого м'яза щурів за нормальних умов, впливу доксорубіцину протягом чотирьох тижнів (1 мг/кг тіла один раз на тиждень) та спільного застосування доксорубіцину та α -кетоглутарату (1% у питній воді протягом чотирьох тижнів) або доксорубіцину та корвітіну (5 мг/кг за 30–60 хв до уведення доксорубіцину): $n = 8$, * – $P < 0,05$

Інша картина спостерігалася під час визначення співвідношення фібронектину до загального білка у плазмі крові (Ф/ЗБ). Цей індекс збільшувався на 79% за умов уведення щурам доксорубіцину до $4,7 \cdot 10^{-3}$ ($P < 0,05$) відносно контрольної групи – $2,5 \cdot 10^{-3}$. За спільного уведення доксорубіцину та антиоксидантів цей індекс не змінювався та залишався на рівні $5 \cdot 10^{-3}$ за дії кетоглутарату та $5,3 \cdot 10^{-3}$ за дії корвітіну. Загальний білок плазми крові – один з основних показників гомеостазу

крові. Зниження його рівня та підвищення індексу Ф/ЗБ свідчить про порушення метаболізму білків, викликане застосуванням доксорубіцину у дозі 1 мг/кг ваги протягом чотирьох тижнів.

Визначаючи рівень фібронектину у плазмі крові дослідних щурів, установили, що за уведення доксорубіцину у дозі 1 мг/кг ваги тіла один раз на тиждень протягом чотирьох тижнів рівень фібронектину збільшився на 67% ($P < 0,05$) і склав $247,2 \pm 16,4$ мкг/мл (рис. 2).

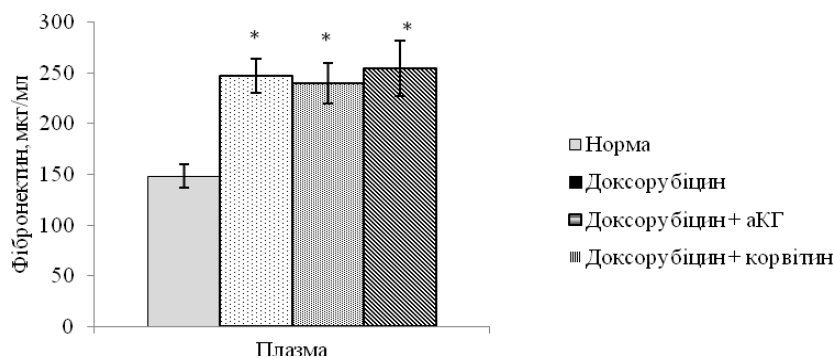


Рис. 2. Концентрація фібронектину у плазмі крові щурів за нормальних умов, впливу доксорубіцину протягом чотирьох тижнів (1 мг/кг тіла один раз на тиждень) та спільного застосування доксорубіцину та α -кетоглутарату (1% у питній воді протягом чотирьох тижнів) або доксорубіцину та корвітіну (5 мг/кг за 30–60 хв до уведення доксорубіцину): $n = 8$, * – $P < 0,05$

У нашому дослідженні в умовах застосування антиоксидантів спільно з доксорубіцином рівень фібронектину залишався підвищеним на 61% ($P < 0,05$, $239,7 \pm 20,3$ мкг/мл) у випадку дії α -кетоглутарату та на 71% ($p < 0,05$, $253,9 \pm 27,3$ мкг/мл) за дії доксорубіцину та корвітіну відносно нормальних показників ($148,4 \pm 11,6$ мкг/мл).

Плазматичний фібронектин синтезується у печінці та не містить EDA домену. Клітини тканин, у першу чергу

фібробласти, полімеризують клітинний фібронектин плазми у стромальному матриксі, однак, у відповідь на пошкодження або під час хвороби, резидентні клітини синтезують клітинний фібронектин, який альтернативно сплайсингований і включає додаткові домени, EDA і EDB. Типи III домену EDA і EDB (E3A і E3B), вірогідніше за все, беруть участь у складанні матриці, клітинній адгезії, міграції та диференціації, а також у

процесі клітинного циклу та мітогенній передачі сигналу (Aziz-Seible et al., 2011). Інші типи I та II домену стабільніші за рахунок наявності дисульфідних зв'язків усередині домену фібронектину та більше відповідають за цілісність фібронектинового матриксу (Kelsh et al., 2014). Під час розвитку серця, EDA і EDB фібронектин експресуються в дорзальній аорті, фарингіальних артеріях і ендокарді (Xie et al., 2010; Lockhart et al., 2011). Механізми регуляції рівня фібронектину в плазмі крові мало зрозумілі, проте відомо, що концентрація фібронектину за нормального стану показує низький рівень. Під час травми або хвороби (Aziz-Seible et al., 2011), у тому числі серця (Konstandin et al., 2013; Tiwari et al., 2013) його рівень підвищується. Хоча й однозначно позитивної відповіді щодо діагностичної значимості рівня фібронектину донині немає (Nadashkevich et al., 1999), його все ж використовують як діагностичний маркер деяких процесів пошкодження серця (Konstandin et al., 2013; Tiwari et al., 2013).

Фібронектин – полідоменний і поліфункціональний білок, що зв'язується з колагеном екстрацелюлярного матриксу, взаємодіє з гепарином, імуноглобулінами та іншими лігандами та забезпечує адгезію типу клітина – матрикс через інтегринові рецептори на поверхні клітин. За впливу ушкоджувальних факторів у матриксу зв'язування фібронектину з рецептором викликає вмикання сигнальних механізмів, що регулюють клітинну проліферацію, виживання, диференціацію та ремоделювання матриксу. Клітинний сигнальний шлях активується у відповідь на надмірні механічні сигнали та фрагменти фібронектину (Tamura et al., 2000; Aziz-Seible et al., 2011). За умов патологічних станів посилюється деградація фібронектину, утворюються його фрагменти, які генерують сигнал через $\alpha 5 \beta 1$ інтегрини, активуючи прозапальну та прокатаболічну відповідь, що може спричинювати подальше пошкодження матриксу.

У разі порушення роботи серця, яке сприяє розвитку гіпоксії та активації матриксних металопротеїназ, що показано нами раніше (Gordienko et al., 2014), може відбуватися підвищення ступеня деградації та, як наслідок, кількості фрагментів та рівня фібронектину у плазмі крові (Xie et al., 2010), що і підтверджується в нашому дослідженні. Фібронектинова матриця чутлива

до протеаз, які звільняють біологічно активні фрагменти з матриці і тим самим регулюють клітинну адгезію, апоптоз і вивільнення запальних медіаторів і протеаз (Kelsh et al., 2014). Фібронектин може деградуватися матриксними металопротеїназами (Horstmann et al., 2003; Xie et al., 2010), а фрагменти фібронектину можуть бути субстратом для матриксних металопротеїназ (ММП-7, ММ-9) (Loeser et al., 2014). Також доведено можливість регуляції експресії фібронектину декількома мікроРНК (Rutnam et al., 2013) і здатність ангіотензину II активувати транскрипцію гена фібронектину через рецептор АТ1 шляхом активації AP-1 у судинних клітинах гладеньких м'язів (Tamura et al., 2000).

Фібронектин існує у двох формах: розчинній, що синтезується у печінці та секретується у плазму, та клітинній (тканинній), що безпосередньо синтезується та виділяється на прикріплених клітинах, таких як клітини гладеньких м'язів та фібробластів (Michel et al., 2009). Тканинний фібронектин швидше за плазмовий (розчинний) реагує на метаболічні зміни тканин (Wang et al., 2013).

Цікава картина спостерігалася під час визначення концентрації фібронектину в екстракті серцевого м'яза (рис. 3). У деяких тварин за дії доксорубіцину відбувається зниження рівня фібронектину на 19% ($P < 0,05$, до $3,11 \pm 0,21$ мкг/мл). За спільної дії α -кетоглутарату та доксорубіцину, навпаки, відмічалася підвищення рівня фібронектину на 53% ($P < 0,05$, до $5,93 \pm 0,45$ мкг/мл) відносно контрольної групи. Після ін'єкцій корвітину та дії доксорубіцину рівень фібронектину залишався низьким ($2,91 \pm 0,23$ мкг/мл).

У критичний термін перебігу хвороби (Erturk et al., 2014) або за хронізації патології, наприклад, при ушкодженні печінки та втраті функцій нормальних гепатоцитів, відмічається низький рівень фібронектину (Levitan et al., 1999; Erturk et al., 2014). У серці фібронектин залучається для мобілізації кардіоміоцитів та їх інтеграції в місці ушкодження (Wang et al., 2013). Експресія клітинного фібронектину макрофагами та фібробластами максимально індукується під час проліферативної фази загоєння за умов інфаркту міокарда (Dobaczewski et al., 2009).

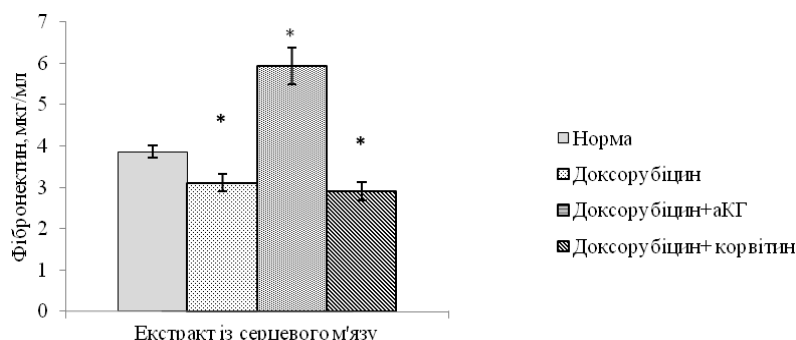


Рис. 3. Концентрація фібронектину в екстракті серцевого м'язу у щурів за нормальних умов, впливу доксорубіцину протягом чотирьох тижнів (1 мг/кг тіла один раз на тиждень) та спільного застосування доксорубіцину та α -кетоглутарату (1% у питній воді протягом чотирьох тижнів) або доксорубіцину та корвітину (5 мг/кг за 30–60 хв до введення доксорубіцину): n = 8, * – $P < 0,05$

Раніше ми підтвердили, що за умов тривалого впливу доксорубіцину у дозі 1 мг/кг тіла щотижня протягом чотирьох тижнів розвивається кардіопатія (Gordienko et al., 2012). Порушення роботи серця спричинює розвиток

гіпоксії, за якої відбувається каскад біохімічних порушень: втрата АТФ, порушення метаболізму глюкози та транспорту кисню, розлад роботи клітинних мембран, активація фосфоліпази, що викликає ліполізу, вивільнення арахідонової кислоти, глутамату та інших токсичних нейротрансмітерів, що забезпечують активацію прозапальних шляхів, активацію металопротеїназ і підвищення рівня фібронектину у плазмі крові.

Пошкодження тканин серця за вже розвиненої доксорубіцин-індукованої патології (яка підтверджена гістологічними зрізами (Gordienko et al., 2012)), сприяє зниженню рівня загального білка в плазмі крові та екстракті серцевого м'яза, яке має тісний кореляційний зв'язок ($r = 0,80$ та $0,59$ відповідно) зі зниженням рівня фібронектину в екстракті з серцевого м'яза. Що саме спричинює зниження фібронектину, донині не зрозуміло, проте вважають, що зниження концентрації фібронектину відбувається за рахунок вивільнення плазмового та тканинного фібронектину із тканини серця за рахунок активації протеаз і деградації екстрацелюлярного матриксу у відповідь на пошкодження (Lutay et al., 2004; Dobaczewski et al., 2009).

Згідно з літературними даними (Yan et al., 2014), діюча речовина корвітину – кверцетин – запобігає підвищенню рівня фібронектину, наприклад, у моделі фіброзу нирок, при якому індуковано дисліпідемію. Також раніше показано, що кверцетин інгібує експресію фібронектину у фібробластах «келоїдного» походження (Phan et al., 2003).

Підвищення концентрації фібронектину в екстракті серцевого м'яза за спільної дії доксорубіцину та α -кетоглутарату поки що не зрозуміле, хоча літературні джерела вказують, що застосування антиоксидантних препаратів викликає зменшення рівня фібронектину до нормальних значень за різного роду патологій (Liu et al., 2014; Yan et al., 2014). У нашому дослідженні використані дози антиоксидантів (корвітину та α -кетоглутарату) на фоні дії доксорубіцину не запобігали як підвищенню рівня фібронектину в плазмі крові, так і зміні рівня фібронектину в екстракті серцевого м'яза, хоча часткове відновлення серцевого м'яза за дії обох антиоксидантів було показано раніше (Gordienko, 2012), де за дії корвітину спостерігався найбільш виражений репаративний ефект на серце на фоні токсичної дії доксорубіцину.

Висновки

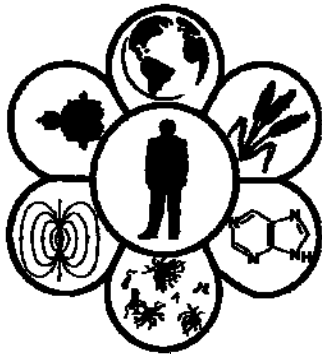
При доксорубіцин-індукованій кардіоміопатією у щурів спостерігаються різноспрямовані зміни загального пулу білків у плазмі крові та серці: у плазмі крові знижується концентрація загального білка на фоні підвищення рівня фібронектину, а у серцевому м'язі рівень фібронектину зменшується на тлі практично незмінної концентрації загального білка. Застосування доксорубіцину протягом чотирьох тижнів спільно з 1% α -кетоглутаратом у питній воді або корвітином (5 мг/кг перед уведенням доксорубіцину) суттєво не запобігає зміні вказаних параметрів.

Бібліографічні посилання

- Von Au, A., Vassel, M., Kraft, S., Sens, C., Hackl, N., Marx, A., Stroebel, P., Hennenlotter, J., Todenhöfer, T., Stenzl, A., Schott, S., Sinn, H.P., Wetterwald, A., Bermejo, J.L., Cecchini, M.G., Nakchbandi, I.A., 2013. Circulating fibronectin controls tumor growth. *Neoplasia* 15(8), 925–938.
- Aziz-Seible, R.S., Casey, C.A., 2011. Fibronectin: Functional character and role in alcoholic liver disease. *World J. Gastroenterol.* 17(20), 482–499.
- Baklanova, Y.V., Ushakova, G.A., 2013. Toxicni effecti ta biochemichniy control' naslidkiv antraciklinovoi terapii [Toxic effects and biochemical control of anthracycline therapy consequence]. *Archives of Clinical and Experimental Medicine* 22(2), 242–248 (in Ukrainian).
- Distefano, G., 2009. Molecular pathogenetic mechanisms and new therapeutic perspectives in anthracycline-induced cardiomyopathy. *Ital. J. Pediatr.* 35(1), 1–8.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Dobaczewski, M., Gonzalez-Quesada, C., Frangogiannis, N.G., 2009. The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. *J. Mol. Cell Cardiol.* 48(3), 504–511.
- Erturk, A., Cure, E., Ozkurt, Z., Parlack, E., Cure, M.C., 2014. Serum fibronectin levels in acute and chronic viral hepatitis patients. *Malays. J. Med. Sci.* 21(1), 29–36.
- Gordienko, Y.A., Baklanova, Y.V., Kovalenko, M.V., Stepchenko, L.M., Shevtsova, A.I., Ushakova, G.A., 2012. Zmini fiziologichnyx ta biochimichnyx pokaznykiv y wchuriv z doxorubicin-indukovanou kardiomiopatieu na tli zastosuvannz preparative z antioxidantnou dieu [Changes of physiological and biochemical parameters in rats with doxorubicin-induced cardiopathy under influence of substances with antioxidant action]. *The Animal Biology* 14, 74–79 (in Ukrainian).
- Gordienko, Y.A., Shevtsova, A.I., Babets, Y.V., Ushakova, G.A., Kulinich, A.O., 2014. Aktivnist' tripsinopodobnyx enzimiv ta gelatinas u wchuriv z doxorubicinovou kardiomiopatieu [Activity of trypsin-like enzymes and gelatinases in rats with doxorubicin cardiomyopathy]. *Ukr. Biochem. J.* 86(6), 139–146 (in Ukrainian).
- Hemmerle, T., Probst, P., Giovannoni, L., Green, A.J., Meyer, T., Neri, D., 2013. The antibody-based targeted delivery of TNF in combination with doxorubicin eradicates sarcomas in mice and confers protective immunity. *Br. J. Cancer.* 109(5), 1206–1213.
- Horstmann, S., Kalb, P., Koziol, H., Gardner, H., Wagner, S., 2003. Profiles of matrix metalloproteinases, their inhibitors, and laminin in stroke patients: Influence of different therapies. *Stroke* 34, 2165–2170.
- Kelsh, R., You, R., Horzempa, C., Zheng, M., McKeown-Longo, P.J., 2014. Regulation of the innate immune response by fibronectin: Synergism between the III-1 and EDA domains. *Plos One* 9(7), 1–11.
- Konstandin, M.H., Toko, H., Gastelum, G.M., Quijada, P., De La Torre, A., Quintana, M., Collins, B., Din, S., Avitabile, D., Völkner, M., Gude, N., Fässler, R., Sussman, M.A., 2013. Fibronectin is essential for reparative cardiac progenitor cell response after myocardial infarction. *Circ. Res.* 113(2), 115–125.
- Levitani, B.N., Astachin, A.B., 1999. Diagnosticheskoe i prognosticheskoe znachenie plasmennogo fibronektina pri chronicheskix diffusnix zabolevaniyax pecheni [The diagnostic and prognostic importance of liver disease chronic diffuse]. *Rossiyskiy Gastroenterologicheskii Zhurnal* 3, 34–60 (in Russian).

- Liu, J., Zeng, L., Zhao, Y., Zhu, B., Ren, W., Wu, C., 2014. Selenium suppresses lipopolysaccharide-induced fibrosis in peritoneal mesothelial cells through inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition. *Biol. Trace Elem. Res.* 161(2), 202–209.
- Lockhart, M., Wirrig, E., Phelps, A., Wessels, A., 2011. Extracellular matrix and heart development. *Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.* 91(6), 535–550.
- Loeser, R.F., 2014. Integrins and chondrocyte-matrix interactions in articular cartilage. *Matrix. Biol.* 39C, 11–16.
- Lushnikova, E.L., Nepomnyachix, L.M., Molodich, N.A., Klinnikova, M.G., Molodich, O.P., 2011. Strukturnaya reorganizatsia miokarda kris i chislennost' kardiomiocitov pri deystvii doksorubicina i triterpenoidov [Structural reorganization of the rat myocardium and cardiomyocyte number under influence of doxorubicin and triterpenoids]. *Fundamentalniye Issledovaniya* 6, 98–102 (in Russian).
- Lutay, N.V., Brazluk, A.Z., Peleshenko, A.I., Shevtsova, A.I., 2004. Obchwaya rol' fibronectina v norme i pri patologii [General organization of fibronectins and their role in norm and pathology]. *Biopolym. Cell.* 20(5), 402–409.
- Michel, J.-B., 2003. Anoikis in the cardiovascular system known and unknown extracellular mediators. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23(12), 2146–2154.
- Naci, D., Azreq, E., Chetoui, N., Lauden, L., Sigaux, F., Charon, D., Daccak, R., Aoudjit, F., 2012. $\alpha 2\beta 1$ Integrin promotes chemoresistance against doxorubicin in cancer cells through extracellular signal-regulated kinase (ERK). *J. Biol. Chem.* 287(21), 17065–17076.
- Nadashkevich, O.N., 1999. Imunologichni pokazniki u chvorich na sistemnu sklerodermiu [Immunological parameters in patients with systemic sclerosis]. *Practychna Medicina* 5–6, 22–24 (in Ukrainian).
- Phan, T.T., Lim, I.J., Sun, L., Chan, S.Y., Bay, B.H., 2003. Quercetin inhibits fibronectin production by keloid-derived fibroblasts. Implication for the treatment of excessive scars. *J. Dermatol. Sci.* 33(3), 192–194.
- Rutnam, Z.J., Wight, T.N., Yang, B.B., 2013. miRNAs regulate expression and function of extracellular matrix molecules. *Matrix Biol.* 32(2), 74–85.
- Schwarzbauerand, J.E., De Simone, D.W., 2011. Fibronectins, their fibrillogenesis, and in vivo functions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3(7), 1–19.
- Strigun, A., Wahrheit, J., Niklas, J., Heinzle, E., Noor, F., 2012. Doxorubicin increases oxidative metabolism in HL-1 cardiomyocytes as shown by ^{13}C metabolic flux analysis. *Toxicol. Sci.* 125(2), 595–606.
- Tamura, K., Chen, Y.E., Lopez-Illasaca, M., Daviet, L., Tamura, N., Ishigami, T., Akishita, M., Takasaki, I., Tokita, Y., Pratt, R.E., Horiuchi, M., Dzau, V.J., Umemura, S., 2000. Molecular mechanism of fibronectin gene activation by cyclic stretch in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 275(44), 34619–34627.
- Tiwari, S., Mishra, M., Jadhav, A., Gerger, C., Lee, P., Weber, L., 2013. The risk of heart failure and cardiometabolic complications in obesity may be masked by an apparent healthy status of normal blood glucose. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2013, 1–16.
- Wang, J., Karra, R., Dickson, A.L., Poss, K.D., 2013. Fibronectin is deposited by injury-activated epicardial cells and is necessary for zebrafish heart regeneration. *Dev. Biol.* 382(2), 427–435.
- Xie, L., Terrand, J., Xu, B., Tsapralis, G., Boyer, J., Chen, Q.M., 2010. Cystatin C increases in cardiac injury: A role in extracellular matrix protein modulation. *Cardiovasc. Res.* 87(4), 628–635.
- Yan, Y., Feng, Y., Li, W., Ping Che, J.I., 2014. Protective effects of quercetin and hyperoside on renal fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction. *Exp. Ther. Med.* 8, 727–730.
- Zhang, Y., Shi, J., Li, Y., Wei, L., 2009. Cardiomyocyte death in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 57(6), 435–445.

Надійшла до редколегії 12.02.2015



УДК 594:094.3(262.5)

Стан глутатіонметаболізувальної системи в умовах трансплантації м'язових тканин однопослідних щурів

О.В. Кулібаба¹, С.М. Козішкурт¹, О.О. Дузенко², І.Л. Вовчук¹, С.А. Петров¹

¹Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова, Одеса, Україна

²Одеський національний медичний університет, Одеса, Україна

Наведено результати визначення кількості відновленого глутатіону, активності глутатіонредуктази та глутатіонпероксидази після трансплантації м'язових тканин, узятих у щурів з одного посліду. Проведено два види операційного втручання: трансплантацію м'язових тканин, узятих з одного посліду у щурів, та операцію без підсадки. Трансплантацію проводили на білих нелінійних щурах-самцях масою 180–300 г. Тварин виводили з експерименту шляхом пропускання електричного струму через довгастих мозок. Для отримання донорів для трансплантації використані самці з одного посліду. У дорослих щурів-донорів витягали черевну м'язову тканину, яку підшивали до гомологічної тканини щура-реципієнта. Таку ж процедуру проводили і зі стегною м'язовою тканиною. Операцію без підсадки здійснювали для порівняння впливу змін досліджуваних показників за хірургічного впливу. Контролем слугувала тканина, яка не підлягала ніяким хірургічним втручанням. Досліджувані показники визначали на першу, третю та сьому добу після трансплантації. Трансплантація м'язової тканини, взятої у тварин з одного посліду викликає достовірне зменшення кількості відновленого глутатіону у стегновій м'язовій тканині реципієнта та в черевній м'язовій тканині донора та реципієнта і достовірне збільшення активності глутатіонредуктази у стегновій м'язовій тканині донора та в черевній м'язовій тканині донора та реципієнта.

Ключові слова: трансплантація; відновлений глутатіон; глутатіонредуктаза; глутатіонпероксидаза

Glutathione metabolism system under condition of transplantation of muscle tissue in rats

O.V. Kulibaba¹, S.M. Kozishkurt¹, O.O. Duzenko², I.L. Vovchuk¹, S.A. Petrov¹

¹Mechnykov Odessa National University, Odessa, Ukraine

²Odessa National Medical University, Odessa, Ukraine

The paper presents the results of determining the amount of reduced glutathione, glutathione reductase and glutathione peroxidase activity at transplantation of muscle tissue taken from rats from the same litter. During the work 2 surgical interventions were carried out: transplantation of muscle tissue taken from the same litter of rats, and operation without replanting. Transplantation was performed on nonlinear white male rats weighing 180–300 g. The animals were taken out of the experiment by passing electric current through the *medulla oblongata*. For donor transplants males from the same litter were used. In adult donor rats abdominal muscle tissue was extracted and transplanted to homologous tissue of the recipient rat. The same procedure was carried out with femoral muscle tissue. Operation without replanting was used to compare the effects of changes in the number of investigated parameters of the surgical exposure. Tissue not subject to any surgery served as a control. Parameters under study were determined on the first, third and seventh day after transplantation. Glutathione levels in tissues were determined by E. Butler, A. Dyubona, B. Kelly. Determination of glutathione reductase is based on the reduction of NADPH registration. Glutathione peroxidase activity was determined by accumulation of oxidized glutathione. Surgery is known to lead to expression of oxidative stress in the organs operated. Special role in antioxidant protection of the body is given to thiols. Expressed hydrophilic properties provide their high content in water fraction of cells and ability to protect biologically important molecules

Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова, Шампанський провулок, 2а, Одеса, 65069, Україна
Mechnykov Odesa National University, Champagne Lane, 2a, Odessa, 65069, Ukraine

Одеський національний медичний університет, вул. Ольгіївська, 4, Одеса, 65069, Україна
Odesa National Medical University, Olgievskaya str., 4, Odessa, 65069, Ukraine
E-mail: evkulibaba@gmail.com

(enzymes, nucleic acids, hemoglobin) from oxidative damage. Property of thiol compounds is known to inhibit both fermented and not fermented free radical oxidation. For the first time it was found that transplantation of muscle tissue taken from animals from the same litter lead to significant reduction of glutathione in the femoral muscle of the recipient and abdominal muscle tissue of the donor and recipient and to significant increase in glutathione reductase activity in the femoral muscle tissue of the donor and in the abdominal muscle tissue of the donor and recipient.

Keywords: transplantation; reduced glutathione; glutathione reductase; glutathione peroxidase

Вступ

Стрес – один з активно досліджуваних фізіологічних станів організму, який впливає на всі рівні його організації й, у першу чергу, клітинний. Велику увагу у сучасній фізіології клітин приділяють реакціям молекулярних систем, які забезпечують стійкість клітин і тканин до дії стрес-факторів (Meerson, 1981). Особливої актуальності набувають дослідження антиоксидантного захисту організму. Питання змін показників антиоксидантної системи в трансплантології м'язових тканин не з'ясоване.

Антиоксидантна система (АОС) – потужний механізм, що запобігає розвитку вільнорадикальних і перекисних реакцій в організмі (Menshikova, 2006). Ця система організму діє завдяки наявності антиоксидантів, у складі яких міститься рухливий атом водню, що лабільно з'єднаний із вуглецем (С-Н) або сіркою (S-H). У результаті реакцій між молекулами антиоксидантів та вільними радикалами утворюються сполуки, які не є потужними окислювачами, не можуть продовжувати перебіг вільнорадикальних реакцій окиснення. Антиоксиданти знешкоджують вільні радикали ще до моменту реалізації їх руйнівної дії. Таким чином, основна функція антиоксидантної системи – це зменшення кількості вільних радикалів до мінімально можливого рівня (Havinson, 2003).

Однією з важливих систем є система обміну глутатіону (Luzhnikov, 2000). Вона бере участь у реалізації низки найважливіших фізіологічних процесів: детоксикації та антиоксидантного захисту, біохімічних перетворень вітамінів С, Е, ліпоєвої кислоти та убіхінону, у регуляції тиол-дисульфідної рівноваги, у процесі транспорту амінокислот, у регуляції вуглеводного, ліпідного, білкового та нуклеїнового обмінів, у підтриманні гемоглобіну еритроцитів у відновленому стані та оптимального стану і функцій біологічних мембран, у регуляції клітинної проліферації, в обміні ряду ейкозаноїдів – простагландинів і лейкотрієнів. Глутатіон виступає як резерв цистину в клітині, бере участь у регуляції функціональної активності лімфоцитів і забезпеченні імунної відповіді організму (Luzhnikov, 1988).

Посттравматичне відновлення скелетних м'язів – актуальна медико-біологічна проблема. Як правило, після глибоких м'язових пошкоджень повноцінного відновлення тканини не відбувається. Формується грубоволокнистий рубець, що спричинює порушення функціонування органа. Існуючі технології корекції даних дефектів – м'язова аутопластика, алопластика, ксенопластика, клітинні технології та генна терапія трудомісткі, травматичні та пов'язані з ускладненнями (Bulyakova, 2009). У разі використання галогенного губчастого матеріалу спостерігалось відновлення скелетної м'язової тканини на місці втраченої, у той час як у контрольній групі без застосування біоматеріалу відбувалося

формування неповноцінного сполучно-жировотканинного регенерату (Lebedeva, 2014).

В останнє десятиліття в імунології, ембріології та трансплантології успішно розробляють методи трансплантації ембріональних тканин і клітин, які мають унікальні властивості, характерні тільки для клітин і тканин, що перебувають на ранніх стадіях цитогенетичного розвитку (Repin, 1996). Терапія за допомогою ембріональних тканин включає специфічні (замісні) та неспецифічні механізми, які ґрунтуються на модуляції процесів регенерації, репарації, проліферації та диференціювання та реалізуються на генетичному та епігеномному рівнях. Розкриття цих механізмів може бути вирішальною умовою для розробки нових методів терапії патологічних станів, пов'язаних із порушенням морфогенезу, і, насамперед, онкологічних захворювань (Rodionov, 1996).

Функціонування глутатіонметаболізувальної системи в умовах трансплантації скелетної м'язової тканини у щурів, узяті з одного посліду, не з'ясоване, тому метою нашого дослідження було з'ясувати зміни вмісту відновленого глутатіону, активності глутатіонредуктази та глутатіонпероксидази в цих умовах.

Матеріал і методи досліджень

Проведено два види операційного втручання: трансплантація м'язових тканин, узятих з одного посліду у щурів, та операція без підсадки. Експерименти проводили на базі лабораторії кафедри біохімії ОНУ. Трансплантацію здійснювали на білих нелінійних щурах-самцях масою 180–300 г. У роботі дотримано вимог Європейської конвенції про захист тварин, які використовуються з експериментальною метою. Тварин виводили з експерименту шляхом пропускання електричного струму через довгастий мозок.

Хірургічне втручання виконували у стерильних умовах. Операційне поле обробляли розчином йодобака. Для отримання донорів для трансплантації використано самців з одного посліду. У дорослих щурів-донорів витягали черевну м'язову тканину, яку підшивали до гомологічної тканини щура-реципієнта. Таку саму процедуру проводили зі стеговою м'язовою тканиною. Операцію без підсадки здійснювали для порівняння впливу змін кількості досліджуваних показників від хірургічного впливу. Контролем слугувала тканина, яка не підлягала ніяким хірургічним втручанням.

У тканинах визначали рівень відновленого глутатіону методом Е. Батлера, О. Дюбона, Б. Келлі (Goguyachkovsky, 2005). Відновлений глутатіон за взаємодії з реактивом Елмана (5',5-дитіобіс-2-нітробензойна кислота) утворює сполуку (2-нітро-6-меркаптобензойна кислота), забарвлену у жовтий колір, інтенсивність забарвлення пропорційна вмісту глутатіону. У дослідну пробірку доливали 2,5 мл Na_2HPO_4 , 0,3 мл реактиву

Елмана та 0,2 мл безбілкового центрифугату. Через 5 хв дослідну пробу спектрофотометрували проти контрольної проби (що не містить безбілкового фільтрату) за довжини хвилі 480 нм.

Визначення активності глутатіонредуктази основане на реєстрації зменшення НАДФН (Pereslegina, 1989). Використовували реакційне середовище, яке містить 2 мл 0,05 М фосфатного буфера (рН 8,0), 0,2 мл 1мМ ЕДТА, 0,5 мл 7,5 мМ GSSG, 0,1 мл 1,2 мМ НАДФН, 0,05–0,2 мл KCl-супернатанта тканини. Активність ферменту визначали за зменшенням НАДФН протягом 5 хв за довжини хвилі 340 нм.

Активність глутатіонпероксидази визначали за накопиченням окисленого глутатіону (Pereslegina, 1989). До складу реакційного середовища входили 1 мл 0,3 М фосфатного буфера (рН 7,4), 12 мМ азид натрію та 6 мМ ЕДТА, 0,5 мл 2,5 мМ відновленого глутатіону, 0,5 мл 1,8 мМ H₂O₂, 20–200 мкл KCl-супернатанта тканини. Реакцію здійснювали внесенням перекису водню та зупиняли через 2 хв 1 мл 10% ТХУ. Після центрифугування за 3 000 об./хв 15 хвилин визначали екстинкцію окисненого глутатіону за довжини хвилі 260 нм.

Для порівняння результатів досліджень розраховували середнє арифметичне (М) та середньоквадратичне відхилення (SD). Результати вважали достовірними за P < 0,05.

Результати та їх обговорення

Зареєстровано достовірне зниження рівня відновленого глутатіону у стегновій м'язовій тканині реципієнта на сьому добу після трансплантації відносно контролю (табл. 1). У стегновій м'язовій тканині донора достовірних змін відносно контролю не відбувалося. Якщо порівняти рівень відновленого глутатіону між стегноюю м'язовою тканиною донора та реципієнта, то достовірні зміни досліджуваного показника відбувалися лише на сьому добу, після трансплантації.

Розглядаючи кількість відновленого глутатіону при трансплантації черевної м'язової тканини, можна помітити, що як у тканині донора, так і в тканині реципієнта його рівень достовірно знижувався відносно контролю в усі терміни дослідження. У стегновій м'язовій тканині цей показник достовірно збільшувався відносно контролю на сьому добу дослідження (табл. 2).

Таблиця 1

Рівень відновленого глутатіону за умов трансплантації м'язової тканини, взятої у щурів з одного посліду (мМ/г тканини, М ± SD, n = 6)

Доба	Стегнова м'язова тканина реципієнта	Стегнова м'язова тканина донора	Черевна м'язова тканина реципієнта	Черевна м'язова тканина донора
Контроль (без підсадки)	0,075 ± 0,019	0,075 ± 0,019	0,055 ± 0,001	0,055 ± 0,001
Перша доба	0,040 ± 0,001	0,049 ± 0,005	0,035 ± 0,003*	0,031 ± 0,001*
Третя доба	0,043 ± 0,003	0,031 ± 0,012	0,023 ± 0,008*	0,015 ± 0,001*
Сьома доба	0,017 ± 0,002*	0,036 ± 0,003**	0,023 ± 0,008*	0,021 ± 0,003*

Примітки: * – достовірна різниця відносно контролю, P < 0,05; ** – достовірна різниця між тканинами донора та реципієнта, P < 0,05.

Таблиця 2

Рівень відновленого глутатіону за умов операції без підсадки (мМ/г тканини, М ± SD, n = 6)

Доба	Стегнова м'язова тканина дорослої тварини	Черевна м'язова тканина дорослої тварини
Контроль (без підсадки)	0,075 ± 0,019	0,055 ± 0,001
Перша доба	0,033 ± 0,003	0,023 ± 0,007*
Третя доба	0,055 ± 0,009	0,037 ± 0,007*
Сьома доба	0,201 ± 0,002*	0,220 ± 0,015*

Примітка: * – достовірна різниця відносно контролю, P < 0,05.

У черевній м'язовій тканині щурів за умов операції без підсадки на першу та третю добу досліду відбувається достовірне зменшення рівня досліджуваного показника, а на сьому добу – збільшення відносно контролю. Таким чином, трансплантація м'язових тканин, узятих у щурів з одного посліду на сьому добу досліду викликає зменшення рівня відновленого глутатіону у

стегновій м'язовій тканині реципієнта та у черевній м'язовій тканині донора та реципієнта. На сьому добу досліду у разі операції без підсадки рівень відновленого глутатіону збільшувався у стегновій та черевній м'язовій тканині. У наступній серії дослідів ми вивчали вплив трансплантації на активність глутатіонпероксидази у м'язовій тканині щурів донора та реципієнта (табл. 3).

Таблиця 3

Активність глутатіонпероксидази за умов трансплантації м'язової тканини, взятої у щурів з одного посліду (у.о./хв/мг білка, М ± SD, n = 6)

Доба	Стегнова м'язова тканина реципієнта	Стегнова м'язова тканина донора	Черевна м'язова тканина реципієнта	Черевна м'язова тканина донора
Контроль (без підсадки)	0,052 ± 0,004	0,052 ± 0,004	0,074 ± 0,005	0,074 ± 0,005
Перша доба	0,011 ± 0,002*	0,022 ± 0,006*	0,093 ± 0,015	0,052 ± 0,012
Третя доба	0,033 ± 0,004*	0,023 ± 0,004*	0,052 ± 0,003*	0,021 ± 0,006*
Сьома доба	0,031 ± 0,009	0,051 ± 0,004	0,091 ± 0,015	0,073 ± 0,005

Примітки: див. табл. 1.

Трансплантація стегнової м'язової тканини викликає достовірне зменшення активності глутатіонпероксидази відносно контролю як у тканині донора, так і у тканині акцептора на першу – третю добу дослідження (табл. 3). При трансплантації черевної м'язової тканини на третю добу дослідження відбувається достовірне зменшення активності глутатіонпероксидази відносно контролю як у тканині донора, так і у тканині реципієнта. Якщо порівняти активність досліджуваного показника між

тканинами донора та реципієнта, то достовірні зміни відбувалися лише в черевній м'язовій тканині донора на третю добу дослідження (приблизно удвічі активність глутатіонпероксидази донора перевищувала таку у черевній м'язовій тканині реципієнта). У стегновій м'язовій тканині на першу добу після операції без підсадки активність глутатіонпероксидази утричі перевищує контрольні значення, але на третю – сьому добу досліду достовірних змін не відбувалося (табл. 4).

Таблиця 4

Активність глутатіонпероксидази за умов операції без підсадки (у.о./хв/мг білка, $M \pm SD$, $n = 6$)

Доба	Стегнова м'язова тканина дорослої тварини	Черевна м'язова тканина дорослої тварини
Контроль (без підсадки)	0,052 ± 0,004	0,074 ± 0,005
Перша доба	0,110 ± 0,015*	0,141 ± 0,015*
Третя доба	0,054 ± 0,008	0,053 ± 0,010
Сьома доба	0,053 ± 0,005	0,024 ± 0,005*

Примітка: див. табл. 2.

У черевній м'язовій тканині при операції без підсадки відбувалося достовірне збільшення досліджуваного показника відносно контролю на першу добу дослідження, на сьому добу активність знизилася на 72% відносно контролю. У таблиці 5 наведено результа-

ти активності глутатіонредуктази при трансплантації м'язової тканини, взятої у щурів з одного посліду. З наведених даних можна відмітити достовірне збільшення активності глутатіонредуктази відносно контролю у стегновій м'язовій тканині донора.

Таблиця 5

Активність глутатіонредуктази за умов трансплантації м'язової тканини, взятої у щурів з одного посліду (у.о./хв/мг білка, $M \pm SD$, $n = 6$)

Доба	Стегнова м'язова тканина реципієнта	Стегнова м'язова тканина донора	Черевна м'язова тканина реципієнта	Черевна м'язова тканина донора
Контроль (без підсадки)	0,10 ± 0,04	0,10 ± 0,04	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Перша доба	0,08 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,48 ± 0,03*	0,23 ± 0,03* **
Третя доба	0,10 ± 0,01	0,17 ± 0,01**	0,40 ± 0,02*	0,31 ± 0,01* **
Сьома доба	0,15 ± 0,01	0,21 ± 0,01***	0,35 ± 0,05*	0,70 ± 0,05***

Примітки: див. табл. 1.

У черевній м'язовій тканині активність глутатіонредуктази збільшувалася як у тканині донора, так і в тканині реципієнта відносно контролю в усі досліджувані строки. Якщо порівняти активність глутатіонредуктази між м'язовими тканинами донора та реципієнта, можна

відмітити, що в усіх досліджуваних тканинах донора активність достовірно перевищує активність глутатіонредуктази тканин реципієнта на третю – сьому добу дослідження. У таблиці 6 наведено результати активності глутатіонредуктази у випадку операції без підсадки.

Таблиця 6

Активність глутатіонредуктази за умов операції без підсадки (у.о./хв/мг білка, $M \pm SD$, $n = 6$)

Доба	Стегнова м'язова тканина дорослої тварини	Черевна м'язова тканина дорослої тварини
Контроль (без підсадки)	0,10 ± 0,04	0,02 ± 0,01
Перша доба	0,31 ± 0,04*	0,67 ± 0,03*
Третя доба	0,17 ± 0,02	0,36 ± 0,05*
Сьома доба	0,13 ± 0,01	0,28 ± 0,02*

Примітка: див. табл. 2.

Операція без підсадки викликає достовірне збільшення активності глутатіонредуктази відносно контролю у стегновій м'язовій тканині дорослої тварини лише на першу добу дослідження. У черевній м'язовій тканині таке збільшення активності спостерігалось на всі строки дослідження.

Оперативне втручання, як відомо, спричинює виникнення у прооперованих органах стану оксидативного стресу (Hebert, 2001). В антиоксидантному захисті

організму особливе місце посідають тіоли. Виражені гідрофільні властивості забезпечують їх високий вміст у водній фракції клітин і можливість захисту біологічно важливих молекул (ферментів, нуклеїнових кислот, гемоглобіну) від окисного ушкодження. Відома властивість тіолових речовин інгібувати як ферментне, так і неферментне вільнорадикальне окиснення (Ferdinand, 2001). Перевагою тіол-дисульфідної системи є здатність тіолів проявляти як антирадикальну, так і антиперекисну дію, а

також оборотність реакції окиснення сульфгідрильних груп у дисульфідні (Ruggenti, 2000). Велику роль у неспроможності ферментативної антиоксидантної системи відіграє дефіцит мікроелементів – міді та цинку (Ferrar, 2002). Інтенсифікація процесів вільнорадикального окиснення ліпідів і білків викликає зміни складу клітинних мембран, порушення їх проникності, дисбалансу електронів K, Na, Ca, Mg (Anderson, 1998; Ruggenti, 2000; Adamszak, 2002). Особливу роль у системі антиоксидантного захисту відіграють глутатіон, глутатіонредуктаза та глутатіонпероксидаза. Аналогічні зміни цих показників за оксидативного стресу спостерігалися при нефропатії, гіпертензії і деяких інших хворобах.

Висновки

Уперше встановлено, що трансплантація м'язової тканини, взятої у тварин з одного посліду, зумовлює:

- достовірне зменшення кількості відновленого глутатіону у стегновій м'язовій тканині реципієнта та черевній м'язовій тканині донора та реципієнта;
- достовірне збільшення активності глутатіонредуктази у стегновій м'язовій тканині донора та черевній м'язовій тканині донора та реципієнта;
- рівновагу активності глутатіонпероксидази у черевній м'язовій тканині донора та реципієнта.

Бібліографічні посилання

Adamszak, M., Zeiler, M., Dikow, R., 2002. Kidney and hypertension. *Kidney Int.* 61(80), 62–67.

Anderson, O.K., Neldam, S., 1998. The antihypertensive effect and tolerability of candesartan cilexetil, a new generation angiotensin II antagonist in comparison with losartan. *Blood Press.* 7, 53–59.

Bulyakova, N.V., Azarova, V.S., 2009. Morfofunktionalnye osobennosti timusa i mushechnyh regeneratov pri vozdeystvii lazernogo izlycheniya i alloplastiki myshechnoy tkani vzroslogo jivotnogo v oblast mushechnoy travmu [Morphological and functional characteristics of the thymus and muscle regenerates when exposed to laser radiation and alloplasty muscle tissue of adult animals to muscle injury]. *Izvestiya FAN. Seriya Biologicheskaya* 1, 18–26.

Ferdinand, K.C., 2001. Update in pharmacologic treatment of hypertension. *Clin. Cardiol.* 19, 601–621.

Ferrar, P., Hens, A., Marti, P., 2002. Additive antiproteinuric effect of combined ACE – inhibition and angiotensin II receptor blockade. *J. Hypertens.* 20(1), 125–130.

Goryachkovsky, A.M., 2005. *Klinicheskaya biohimiya v laboratornoy diagnostice* [Clinical biochemistry in laboratory diagnostics]. *Medicina, Moscow* (in Russian).

Havinson, V.H., Barinov, V.A., Arutynyan, A.V., Malinin, V.V., 2003. *Svobodnoradikalnoe okislenie i starenie* [Free radical oxidation and aging]. *Nauka, Moscow* (in Russian).

Hebert, L.A., Wilmer, W.A., Falkenhain, M.E., 2001. Renoprotection: One or many therapies. *Kidney Int.* 59, 1211–1226.

Lebedeva, A.I., Muslimov, S.A., Musina, L.A., Shcherbakov, D.A., 2014. Regeneraciya skeletnoy myshechnoy tkani eksperimentalnih jivotnih, inducirovannaya biomaterialom Alloplant [Regeneration of skeletal muscle tissue of the experimental animals induced Alloplant biomaterial]. *International Journal of Experimental Education* 3, 68–71 (in Russian).

Lujnikov, E.A., Goldfarb, J.S., Musselnus, S.G., 2000. *Detoksikacionnaya terapiya* [Detoxification therapy]. *Medicina, Moscow* (in Russian).

Lujnikov, E.A., Dagaev, V.N., 1988. *Kriticheskie rasstroystva gomeostaza pri ostruh otravleniyah* [Critical disorder homeostasis in acute poisoning]. *NII Skoroy Pomoshi* 74, 5–14 (in Russian).

Menshikova, E.B., Lankin, V.Z., Zenkov, N.K., 2006. *Okislitelnyy stress. Prooksidantu i antioksidantu* [Oxidative stress. Pro-oxidants and antioxidants]. *Slovo, Moscow* (in Russian).

Meerson, F.Z., 1981. *Adaptaciya, stress i profilaktika* [Adaptation, stress and prevention]. *Nauka, Moscow* (in Russian).

Pereslegina, I.A., 1989. *Aktivnost antioksidantnyh fermentov sluni zdorovuh detey* [The activity of antioxidant enzymes saliva of healthy children]. *Laboratornoe Delo* 11, 20–23 (in Russian).

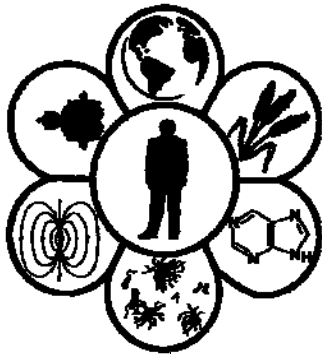
Repin, V.S., 1996. *Medicinskaya kletchnaya biologiya: Novue fundamentalnye i prikladnye issledovaniya* [Medical cell biology: New fundamental and applied research]. *Transplantaciya Fetalnih Tkaney i Kletok Cheloveka* 1, 19–27 (in Russian).

Rodionov, S.J., Plyaskin, K.P., Pak, N.A., Masucheva, V.I., 1996. *Opyt primeneniya biologicheskii aktivnyh soedineniy iz fetalnyh tkaney cheloveka v lechenii onkologicheskikh zabolevaniy* [Experience in the use of biologically active compounds from human fetal tissues in the treatment of cancer]. *Transplantaciya Fetalnyh Tkaney i Kletok Cheloveka* 1, 90–92 (in Russian).

Ruggenti, P., Remuzzi, G., 2000. Nephropathy of type I and type II diabetes: Diverse pathophysiology, same treatment [Nefropatiya tipa I i diabeta II tipa: Razlichnaya patofiziologiya, takoy je rejum]. *Nephrol. Dial. Transpl.* 15, 1900–1902.

Wendell, P.Z., 1968. Distribution of glutathione reductase and detection of glutathione-cystine transhydrogenase in rat tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 159, 179–181.

Надійшла до редколегії 11.02.2015



УДК 577.164.12

Вплив трансплантації м'язової тканини в одноплідних щурів на загальну кількість флавінів та ФАД

С.М. Кобильник¹, І.Л. Вовчук¹, О.О. Дузенко², С.М. Козишкурт¹, Д.В. Морозова¹, С.А. Петров¹

¹Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова, Одеса, Україна

²Одеський національний медичний університет, Одеса, Україна

Досліджено баланс рибофлавіну та його метаболітів у м'язових тканинах до та після трансплантації в одноплідних щурів та за умов операції без підсадки. В основу визначення флавінів покладено метод Юденфренда. В експерименті трансплантацію проводили на білих нелінійних щурах-самцях масою 180–300 г. Тварин виводили з експерименту шляхом пропускання електричного струму через довгастий мозок. В одноплідних щурів-донорів брали черевну м'язову тканину, яку підшивали до гомілкової м'язової тканини реципієнта. Таку саме процедуру проведено зі стегною м'язовою тканиною. У разі операції без підсадки проведено такі самі маніпуляції, виключаючи етап трансплантації (для визначення впливу хірургічного втручання). Контролем слугувала тканина, яка не підлягала хірургічним втручанням. Досліджувані показники визначали на першу, третю та сьому добу після трансплантації. Трансплантація м'язових тканин не викликала змін кількості загальних флавінів. Уміст РФ + ФМН під час трансплантації м'язової тканини в одноплідних щурів зумовлював достовірне зменшення цього показника у стегновій м'язовій тканині донора та у черевній м'язовій тканині реципієнта на третю добу дослідження відносно контролю. Трансплантація м'язових тканин одноплідних щурів викликала збільшення кількості ФАД на третю добу експерименту у стегновій м'язовій тканині донора та реципієнта. Таким чином, трансплантація стегнової м'язової тканини одноплідних щурів сприяє прискоренню синтезу ФАД з рибофлавіну та ФМН.

Ключові слова: трансплантація; рибофлавін; ФМН; ФАД

Effect of transplantation of muscle tissue in rats from the same litter on total number of flavins and FAD

S.N. Kobylnik¹, I.L. Vovchuk¹, O.O. Dosenko², S.N. Kozishkurt¹, D.V. Morosova¹, S.A. Petrov¹

¹Mechnikov Odessa National University, Odessa, Ukraine

²Odessa National Medical University, Odessa, Ukraine

Riboflavin is a member of redox enzymes involved in fatty acid oxidation and energy generation. Important role of this vitamin is in reproductive function. Exchange of transformation of riboflavin in animal tissues and cells of microorganisms include reactions that lead to synthesis and subsequent collapse of FMN and FAD. It is involved in enhancing antitumor activity of many anticancer drugs, as well as activation of the immune system to kill tumor cells. Issues of transport of riboflavin and its derivatives in animals have been studied enough. Investigations of changes of the balance of riboflavin and its metabolites in muscular tissues before transplantation in rats from one litter and at operation without replanting were conducted, based on the Udenfriend method of flavin determination. Transplantation in the experiment was carried out on white non-linear male rats weighing 180–300 g. Animals were taken out of the experiment by passing electric current through the medulla. Belly muscular tissue was taken from donor rats of the same litter, and that tissue was sewn to homological muscular tissue of the recipient. The same procedure was carried out with femoral muscular tissue. In the course of operation without replanting the same manipulations have been made except for transplantation stage (for determination of the effect of surgical intervention). Tissue not subject to any surgical intervention served as a control. Parameters of the study were measured on the first, third and seventh days after

Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова, Шампанський провулок, 2а, Одеса, 65069, Україна
Mechnykov Odesa National University, Champagne Lane, 2a, Odessa, 65069, Ukraine

Одеський національний медичний університет, вул. Ольгіївська, 4, Одеса, 65069, Україна
Odessa National Medical University, Olgievskaya str., 4, Odessa, 65069, Ukraine
E-mail: Kobylnik71@mail.ru

transplantation. Transplantation of muscular tissue caused no changes in total flavin amount. Content of RF + FMN after transplantation of muscular tissue in rats of the same litter decreased in femoral muscular tissue of the recipient. Transplantation of muscular tissues in rats from the same litter lead to increase in FAD amount in femoral muscular tissue of the donor and recipient on the third day of the experiment. Transplantation of femoral muscular tissue lead to acceleration of FAD synthesis from riboflavin and FMN.

Keywords: transplantation; riboflavin; FMN; FAD

Вступ

Вітамін В₂ (рибофлавін) входить до складу двох коферментів: флавінмононуклеотиду (ФМН) та флавінаденіндинуклеотиду (ФАД), що є компонентами таких ензимів як сукцинатдегідрогенази, цитохромредуктази, жовтого дихального ферменту, діафори, оксидаз амінокислот тощо. Рибофлавін входить до складу окисно-відновних ферментів, що беруть участь в окисненні жирних кислот і утворенні енергії (Shpichka, 2011). Також важлива роль цього вітаміну у репродуктивній функції (Shinagava, 1956). Беручи участь у тканинному диханні, вітамін В₂ забезпечує нормальне функціонування безсудинних (епітеліальних) тканин, кришталика та тканин, найчутливіших до нестачі кисню (наприклад мозкових). Рибофлавін необхідний для утворення (входить до складу гідроксилази фенілаланіну) та руйнування (регулює активність моноаміноксидази) моноамінів як у ЦНС, так і у периферійних тканинах. Вітамін В₂ сприяє синтезу еритропоєтину, через утворення якого нервова та ендокринна системи регулюють кровотворення. Активована рибофлавіном піридоксалькіназа перетворює піридоксин (вітамін В₆) на його активну форму – піридоксальфосфат.

Останнім часом все більше місця в медико-біологічній практиці посідають різноманітні методи тканинної терапії. Доведено, що скелетна м'язова тканина, так само як і деякі інші органи, має властивість до репаративної регенерації (Danilov, 2007). Питання розподілу рибофлавіну та його похідних при трансплантації м'язової тканини одноплідних щурів майже не досліджені.

Мета даної статті – оцінити баланс рибофлавіну та його похідних до та після трансплантації м'язових тканин в одноплідних щурів за умов операції без підсадки.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження виконані на базі лабораторії кафедри біохімії ОНУ ім. І.І. Мечникова. Трансплантацію проводили на білих безпорідних щурах-самцях масою 180–360 г. У роботі дотримано вимог Європейської конвенції про захист тварин, яких використовують з експериментальною метою. Донорами м'язової тканини виступали щури з одного посліду. У щурів-донорів вилучено стегнову м'язову тканину та підшито до стегнової м'язової тканини щурів-реципієнтів. Аналогічну процедуру проведено з червону м'язовою тканиною. Операцію без підсадки виконано для порівняння впливу хірургічного втручання на досліджувані показники. Контролем слугувала тканина, яка не підлягала хірургічним втручанням.

В основу визначення флавінів покладено метод Юденфренда (Judenfreund, 1967) зі змінами, що виникли в результаті його адаптації до умов нашого експерименту. Весь аналіз (за винятком гідролізу) проводили на холоді, за температури 0...–4 °С. Свіжу тканину гомогенізували

на фізіологічному розчині (10 мл/г тканини). 1 мл гомогенату переносили у пробірку, що містила 4 мл 11% ТХУ, перемішували та через 15 хв центрифугували за 3 000 обертів/хв. Одну аліквотну пробу (А₁), що містила 2 мл надосадової рідини, переносили в іншу пробірку з 8 мл 0,2 М розчину КН₂РО₄, після перемішування рН розчину становила 6,8. Цю суміш витримували у темряві протягом ночі. Іншу аліквотну пробу (А₂), яка так само містила 2 мл звільненого від білка екстракту, переносили у пробірку та зберігали протягом ночі у темряві за 38 °С для того, щоб відбувся гідроліз ФАД; після цього до суміші додавали 8 мл 1 М розчину К₂НРО₄. Після нейтралізації флавіни дуже чутливі до світла, тому до вимірювань їх зберігали у темряві.

Стандарти готували, використовуючи 2 мл відомого розчину рибофлавіну (містить 0,03–2 мкг рибофлавіну).

Для приготування контролю замість гомогенату брали 2 мл дистильованої води. Викликану флуоресценцію визначали за допомогою відповідних фільтрів.

Після вимірювань флавіни відновлювали, додаючи 0,01 мл 10% розчину NaHSO₃ у 5% NaHCO₃. Залишкова не флавінова флуоресценція зазвичай була виражена; її віднімали від отриманих величин. Концентрація ФАД у кожній пробірці дорівнює (А₂–А₁)/0,85. Коефіцієнт 0,85 уведений тому, що інтенсивність флуоресценції ФАД складає лише 15% інтенсивності флуоресценції рибофлавіну. Порівняння з аналогічно обробленим стандартом рибофлавіну дає вміст ФАД за рибофлавіном. А₂ – еквівалент загальної кількості флавінів. Загальні флавіни, за винятком ФАД, – вміст вільного рибофлавіну разом із ФМН (далі позначається як фракція РФ + ФМН). Для порівняння результатів досліджень розраховували середнє арифметичне (М) та середньоквадратичне відхилення (SD).

Результати та їх обговорення

Визначаючи вміст загальних флавінів за умов трансплантації м'язових тканин одноплідних щурів, установили, що трансплантація не впливає на цей показник (табл. 1). Для порівняння впливу трансплантації м'язових тканин одноплідних щурів проведено операції без підсадки. У цьому випадку не спостерігалось достовірних змін концентрації загальних флавінів відносно контролю.

У таблиці 2 наведено результати визначення кількості РФ + ФМН у випадку трансплантації м'язових тканин в одноплідних щурів та в разі операції без підсадки. Можна відмітити достовірне зменшення показників відносно контролю у стегнової м'язової тканині донора на третю добу дослідження. У черевній м'язовій тканині реципієнта достовірних змін кількості РФ + ФМН відносно контролю не відбувається. Досліджуючи вплив операції без підсадки м'язової тканини, спостерігали достовірне зменшення РФ + ФМН на третю добу дослідження як у стегнової, так і в черевній м'язовій тканині.

Таблиця 1

Концентрація загальних флавінів за умов підсадки тканини одноплідних щурів та без підсадки (мМ/г тканини, M ± SD, n = 6)

Вид операції	Вид скелетної м'язової тканини	Контроль (без підсадки)	Перша доба	Третя доба	Сьома доба
Підсадка тканини одноплідних щурів	Стегнова м'язова тканина донора	11,1 ± 1,2	10,3 ± 2,2	11,2 ± 1,1	13,3 ± 3,2
	Стегнова м'язова тканина реципієнта	11,1 ± 1,2	12,1 ± 1,3	15,2 ± 2,3	13,3 ± 2,1
	Черевна м'язова тканина донора	10,2 ± 2,1	10,4 ± 2,2	11,2 ± 1,2	11,2 ± 2,1
	Черевна м'язова тканина реципієнта	10,2 ± 2,1	11,1 ± 1,3	10,1 ± 1,0	12,2 ± 4,1
Без підсадки	Стегнова м'язова тканина	11,1 ± 1,2	9,2 ± 3,1	9,2 ± 1,3	14,2 ± 2,3
	Черевна м'язова тканина	10,2 ± 2,1	12,2 ± 3,1	6,1 ± 1,2	16,3 ± 7,2*

Примітка: * – достовірні відмінності відносно контролю, P < 0,05.

Таблиця 2

Кількість РФ + ФМН за умов підсадки тканини одноплідних щурів і без підсадки (мМ/г тканини, M ± SD, n = 6)

Вид операції	Вид скелетної м'язової тканини	Контроль (без підсадки)	Перша доба	Третя доба	Сьома доба
Підсадка тканини одноплідних щурів	Стегнова м'язова тканина донора	10,1 ± 1,3	7,1 ± 1,3*	5,2 ± 1,2*	9,3 ± 2,1
	Стегнова м'язова тканина реципієнта	10,1 ± 1,3	8,1 ± 2,2	8,2 ± 2,2	7,2 ± 2,3
	Черевна м'язова тканина донора	11,2 ± 2,3	4,1 ± 1,3	7,1 ± 1,3	7,2 ± 2,2
	Черевна м'язова тканина реципієнта	11,2 ± 2,3	5,2 ± 1,4*	6,2 ± 1,1*	6,3 ± 1,2*
Без підсадки	Стегнова м'язова тканина	10,1 ± 1,3	6,2 ± 2,2	5,2 ± 1,3*	9,2 ± 1,2
	Черевна м'язова тканина	11,2 ± 2,3	11,3 ± 4,2	3,4 ± 1,2*	10,2 ± 7,2

Примітка: див. табл. 1.

У таблиці 3 наведено результати визначення кількості ФАД у разі трансплантації м'язових тканин у щурів одного плідку та впливу операції без підсадки м'язової тканини на кількість ФАД. Кількість ФАД у стегновій м'язовій тканині донора та реципієнта достовірно збільшувалась відносно контролю на третю добу дослідження. У черевній м'язовій тканині донора та

реципієнта достовірних змін не спостерігалось. За умов операції без підсадки спостерігається достовірне збільшення концентрації ФАД у стегновій м'язовій тканині відносно контролю лише на сьому добу дослідження. У черевній м'язовій тканині на третю добу дослідження відбувалося достовірне зменшення концентрації ФАД відносно контрольного показника.

Таблиця 3

Кількість ФАД за умов підсадки тканини одноплідних щурів і без підсадки (мМ/г тканини, M ± SD, n = 6)

Вид операції	Вид скелетної м'язової тканини	Контроль (без підсадки)	Перша доба	Третя доба	Сьома доба
Підсадка тканини одноплідних щурів	Стегнова м'язова тканина донора	4,1 ± 1,3	4,1 ± 1,2	7,2 ± 1,3*	5,2 ± 2,3
	Стегнова м'язова тканина реципієнта	4,1 ± 1,3	5,2 ± 1,3	9,2 ± 2,1*	7,2 ± 2,1
	Черевна м'язова тканина донора	7,2 ± 2,1	7,3 ± 1,3	5,3 ± 1,2	5,2 ± 2,3
	Черевна м'язова тканина реципієнта	7,2 ± 2,1	7,3 ± 1,2	7,2 ± 1,1	7,3 ± 1,2
Без підсадки	Стегнова м'язова тканина	4,1 ± 1,3	6,2 ± 2,2	5,2 ± 1,3	9,4 ± 1,2*
	Черевна м'язова тканина	7,2 ± 2,1	8,3 ± 2,1	2,2 ± 0,4	7,2 ± 1,3

Примітка: див. табл. 1.

Обмінні перетворення рибофлавіну у тканинах тварин і клітинах мікроорганізмів включають реакції, що викликають синтез і подальший розпад ФМН і ФАД (Ochoa, 1939). Рибофлавін також бере участь у різних метаболічних окисно-відновних реакціях, метаболізмі одновуглецевих сполук, які являють собою мережу взаємопов'язаних біохімічних шляхів, генерують одновуглецеві групи, необхідні для фізіологічних процесів (Ziegler, 2007). Порушення одного метаболізму вуглецю може перешкодити реплікації, репарації ДНК і регуляції експресії генів за допомогою метилювання, що може спричинити канцерогенез (Kim, 2004). Дефіцит рибофлавіну відіграє важливу роль у прогресуванні різних видів раку, а також підвищенні вразливості клітин до раку (Webster, 1996). Крім того, він бере участь у підвищенні активності багатьох протипухлинних препаратів, а також активації імунної системи. Питання

транспорту рибофлавіну та його похідних в організмі тварин досліджені недостатньо.

Висновки

Трансплантація м'язових тканин одноплідних щурів не викликає достовірних змін кількості загальних флавінів. За умов трансплантації м'язових тканин одноплідних щурів уміст РФ + ФМН у стегновій м'язовій тканині донора та черевній м'язовій тканині реципієнта на третю добу дослідження достовірно зменшується відносно контролю. Трансплантація м'язових тканин одноплідних щурів зумовлює збільшення концентрації ФАД у стегновій м'язовій тканині донора та реципієнта на третю добу експерименту. Таким чином, трансплантація стегнової м'язової

тканини одноплідних щурів сприяє прискоренню синтезу ФАД із рибофлавіну та ФМН.

Бібліографічні посилання

- Danilov, R.K., 2007. Gistologija. Jembriologija. Citologija [Histology. Embryology. Cytology]. Medicine, Moscow (in Russian).
- Kim, Y.I., 2004. Folate and DNA methylation. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13, 511–519.
- Kuznecov, S.L., 2001. Skeletnye myshci. Rukovodstvo po gistologii [Skeletal muscles. Guide to histology]. SpecLit, SPb (in Russian).
- Lebedeva, N.B., 1992. Strukturno-biohimicheskie osnovy sokratitel'nyh svojstv razlichnyh tipov skeletnyh myshechnykh volokon [Structure-biochemical bases of properties of various types of skeletal muscle fibers]. *Morfologija* 102(4), 122–133 (in Russian).
- Ochoa, S., Rossiter, R.J., 1939. Flavin-adeninedinucleotide in rat tissues. *Biochem. J.* 33(12), 2008–2016.
- Rokitskij, P.F., 1967. Biologicheskaja statistika [Biological statistics]. Vysshaja Shkola, Minsk (in Russian).
- Judenfreund, S., 1969. Fluoriscentnye metody v biologii i medicine [Fluorescent methods in biology and medicine]. Mir, Moscow (in Russian).
- Shubnikova, E.A., 2001. Myshechnye tkani [Muscular tissue]. Medicina, Moscow (in Russian).
- Shpichka, A.I., Semenova, E.F., Kuznetsova, A.V., 2011. K voprosu opredelenija riboflavina v biotekhnologicheskom syr'e [On the determination of riboflavin in biotechnological materials]. *Sovremennye Problemy Nauki i Obrazovaniia* 1, 30–32 (in Russian).
- Shinagawa, T., 1956. Influences of the overdose of thiamine on the urinary excretion of pyridoxine and riboflavine. *Vitamin (Kyoto)* 11, 467–469.
- Webster, R.P., Gawde, M.D., Bhattacharya, R.K., 1996. Modulation of carcinogen induced DNA damage and repair enzyme activity by dietary riboflavin. *Cancer Lett.* 98, 129–135.
- Ziegler, R.G., Lim, U., 2007. One-carbon metabolism, colorectal carcinogenesis, chemoprevention – with caution. *J. Natl. Cancer. Inst.* 99(16), 1214–1215.

Надійшла до редколегії 28.01.2015



УДК 577.27:57.083.33:543.54

Удосконалення методики отримання Fc-фрагментів IgA людини

О.Ю. Галкін¹, Ю.В. Горшунов², В.Ф. Соловйова³

¹Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут», Київ, Україна

²Науково-дослідний та конструкторсько-технологічний інститут міського господарства, Київ, Україна

³Український науково-дослідний інститут харчування, біотехнології та фармації, Київ, Україна

Мета статті – висвітлити удосконалення методики отримання та виділення Fc-фрагментів IgA людини. Для цього оптимізовано умови гідролізу імуноглобулінів із подальшим виділенням і очищенням Fc-фрагментів. Розроблено удосконалену методику одержання Fc-фрагментів IgA людини, яка передбачає папаїновий гідроліз імуноглобулінів у середовищі азоту упродовж 4 год, що дозволяє досягти максимального виходу Fc-фрагментів без їх подальшої деградації, виділення та очищення Fc-фрагментів IgA шляхом одноетапної гель-фільтрації на сефадексі G-100, контроль чистоти цільового продукту в електрофорезі у поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію та імунодифузії за Оухтерлоні. Застосування запропонованої схеми дозволяє одержувати Fc-фрагменти IgA людини високого ступеня чистоти. Вихід Fc-фрагментів після всіх етапів очищення склав близько 18% початкової кількості імуноглобулінів у препараті. Молекулярна маса одержаних Fc-фрагментів IgA людини склала близько 70 кДа.

Ключові слова: IgA людини; Fc-фрагменти; фрагментація; папаїн; гель-фільтрація; електрофорез

Improvement of the method of obtaining human IgA Fc-fragments

O.Y. Galkin¹, Y.V. Gorshunov², V.F. Solovjova³

¹National Technical University of Ukraine "Kyiv Polytechnic Institute", Kyiv, Ukraine

²Research and Design Institute of Urban Planning, Kyiv, Ukraine

³Ukrainian Research Institute of Nutrition, Biotechnology and Pharmacy, Kyiv, Ukraine

To address a number of fundamental and applied problems in immunology, molecular and cellular biology and biotechnology it is necessary to obtain Fc-fragments of immunoglobulins. Fc-fragments may be used for studying of the effector functions of antibodies which are mediated by these areas. They are often used as an immunogen to produce anti-specie (based on so-called secondary antibody) conjugate in the development of serological tests for diagnostics (predominantly such conjugate based on monoclonal antibodies). The work is aimed to develop improved methods of obtaining and allocation of Fc-fragments of human IgA. To achieve this objective, optimization of hydrolysis of IgA with subsequent purification of Fc-fragments have been carried out. Improved method of obtaining Fc-fragments of IgA provides: papain hydrolysis of immunoglobulin in the environment of nitrogen for 4 h, allowing to achieve maximum output of Fc-fragments without their further degradation: isolation and purification of Fc-fragments of human IgA by one-stage gel filtration on sephadex G-100; control of purity of the target product by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate and Ouchterlony immunodiffusion. Enzymatic hydrolysis was carried out at the optimal temperature of papain (37 °C). As the oxygen in the air may have inhibitory effect on enzymatic hydrolysis reaction, the reaction mixture was incubated in the nitrogen atmosphere to prevent inactivation of papain. To reduce the incident degradation of immunoglobulin molecules, papain hydrolysis was carried out without using an enzyme activator (cysteine). Usage

Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут», пр. Перемоги, 37, Київ, 03056, Україна
National Technical University of Ukraine "Kyiv Polytechnic Institute", Peremohy Ave., 37, Kyiv, 03056, Ukraine
Tel.: +380-67-234-86-42. E-mail: alexfbt@mail.ua

Науково-дослідний та конструкторсько-технологічний інститут міського господарства, вул. Урицького, 35, Київ, 03035, Україна
Research and Technology Institute of Urban Development, Urytskogo Str., 35, Kyiv, 03035, Ukraine
Tel.: +380-44-502-79-00. E-mail: alexfax@mail.ru

Український науково-дослідний інститут харчування, біотехнології та фармації, вул. Чигоріна, 18, Київ, 01042, Україна
Ukrainian Research Institute of Nutrition, Biotechnology and Pharmacy, Chygorina Str., 18, Kyiv, 01042, Ukraine
Tel.: +380-44-284-53-65. E-mail: soloviova_yvv@mail.ru

of the proposed scheme allows obtaining Fc-fragments of human IgA of high purity. Outcome of Fc-fragments after all stages of purification was about 18% of the initial amount of IgA in the preparation. Molecular weight from Fc-fragments of human IgA was equal to approximately 70 kDa.

Keywords: human IgA; Fc-fragments; fragmentation; papain; gel filtration; electrophoresis

Вступ

До імуноглобулінів належать білки тварин і людини, які мають активність антитіл, а також імуноглобулінові рецептори лімфоцитів та білки, подібні до антитіл за хімічною структурою та антигенною специфічністю – мієломні білки, білки Бенс-Джонса та субодиниці імуноглобулінів. Первинна функція антитіл – взаємодія з комплементарною структурою антигену – антигенною детермінантою, а вторинні (ефекторні) – фіксація комплексу, опсонізувальний вплив, цитотоксична, імунорегуляторна дії тощо (Delves et al., 2011). Структурні ділянки молекул імуноглобулінів, відповідальні за ефекторну активність, просторово віддалені від антигензв'язувальних центрів і містяться, головним чином, у Fc-області. Ізотипова мінливість молекул імуноглобулінів також зумовлена антигенними детермінантами Fc-фрагментів (Yakobysyak, 2004).

Для виконання низки фундаментальних та прикладних завдань імунології, молекулярної та клітинної біології та біотехнології виникає потреба в одержанні Fc-фрагментів імуноглобулінів. Наприклад, Fc-фрагменти можливо застосовувати для вивчення ефекторних функцій імуноглобулінів, які опосередковані даними областями. Часто їх використовують як імуноген для одержання антивидового кон'югату (у тому числі на основі моноклональних антитіл) під час розроблення тестів для серологічної діагностики. Отримані при розщепленні імуноглобулінів Fc-фрагменти можливо використовувати також для аналізу антивидових моноклональних антитіл, одержання імуоафінних сорбентів. Аналіз літературних даних свідчив про наявність декількох підходів до розщеплення IgA людини ферментами з метою отримання відповідних Fc-фрагментів. Найчастіше вони базуються на використанні папаїну (Paster et al., 1989), також застосовується пепсин та трипсин (Ketti, 1991). Папаїнова фрагментація дозволяє отримати стабільніші результати (Wilson, 1971; Beale, 1985; Josi and Lim, 2001). Незважаючи на велику кількість модифікацій методики, значна частина з них погано відтворюється, часто бракує достовірних способів контролю за ферментативним розщепленням. Дані різних авторів у багатьох випадках містять суттєві розбіжності.

Мета цієї статті – висвітлити удосконалення методики отримання та виділення Fc-фрагментів IgA людини.

Матеріал і методи досліджень

Препарат IgA людини отримано згідно з методикою (Nikolaenko et al., 2005). Чистота препарату перевірена за допомогою імунодифузії за Оухтерлоні та електрофорезу у поліакриламідному гелі (ПААГ) з додецилсульфатом натрію (ДСН). IgA переводили у реакційний буферний розчин гель-фільтрацією на колонці 1,5 × 20 см із сефадексом G-25. Колонку зрівноважували 0,1 М фосфатним буфером з рН 7,0, який містив 0,001 М

цистеїну та 0,001 М ЕДТА (Svehag et al., 1969). Концентрацію одержаних після гель-фільтрації IgA вимірювали на спектрофотометрі за довжини хвилі 280 нм (Paster et al., 1989). Уміст імуноглобулінів довели реакційним буфером до 10 мг/мл.

Папаїновий гідроліз IgA людини. Для проведення ферментативного розщеплення використано папаїн (Sigma, США) у вигляді кристалічної суспензії в 0,05 М ацетатному буфері з рН 4,5 із додаванням 0,01% тимоли. Реакцію розщеплення проводили у 0,01 М фосфатному буфері, рН 6,5, який містив 0,002 М Na₂-ЕДТА. У реакційну суміш на 100 мг IgA вносили 1 мг папаїну та інкубували за 37 °С в атмосфері азоту для запобігання інактивації папаїну киснем повітря. З метою віднаходження оптимального часу інкубування з реакційної суміші відбирали проби через 30 хв, 1, 2, 4 та 6 год. від початку реакції. Ферментативний гідроліз у пробах зупиняли шляхом їх заморожування.

Гель-фільтрація. Використовували колонку із сефадексом G-100, розмірами 1,0 × 100 см, яку переводили у 0,05 М фосфатний буфер із 0,15 М NaCl із рН 7,2. Елюцію проводили зі швидкістю 2 мл/хв, збираючи колектором фракції, об'ємом 4 мл. Об'єднували ті з них, які відповідали виходу піків. Концентрацію білка вимірювали на спектрофотометрі за довжини хвилі 280 нм (Paster et al., 1989).

Електрофорез проводили у вертикальній камері у 15% ПААГ за присутності ДСН (Laemmli, 1970). Як маркери молекулярної маси (ММ) застосовували овотрансферин (78,0 кДа), альбумін (66,3 кДа), овальбумін (42,7 кДа), карбоангідразу (30,0 кДа), міоглобін (16,9 кДа) (Sigma, США). Білки у гелі фарбували Coomassie Blue R-250.

Імунодифузія за Оухтерлоні. Імунодифузію проводили в 1,25% агарозному гелі, приготованому на боратному буфері (рН 8,6). Використано моноспецифічні сироватки проти імуноглобуліну людини, λ_L- та κ_L-ланцюгів імуноглобулінів (Предприятие по производству бактериальных препаратов Центрального НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Росія). У центральні лунки вносили імунні сироватки, у периферійні – розчин антигену у серійних розведеннях. Для фарбування та фіксації гелю брали розчин амідочорного. Відмивання проводили 2% розчином оцтової кислоти (Mihaylov and Simirskiy, 1991).

Результати та їх обговорення

Оскільки, за даними різних авторів (Wilson, 1971; Beale, 1985; Josi and Lim, 2001), більш відтворювані результати одержують при папаїновому гідролізі імуноглобулінів, ми обрали саме даний варіант ферментативного розщеплення IgA людини. На першому етапі визначали оптимум часу інкубування IgA з папаїном. Температурний оптимум гідролітичної активності папаїну складає близько 37 °С (Ketti, 1991), тому інкубацію IgA людини та ферменту проводили саме за цієї температури.

ри. Оскільки кисень повітря може чинити інгібувальний вплив на реакцію ферментативного гідролізу (Galkin, 2012), реакційну суміш інкубували в атмосфері азоту для запобігання інактивації папаїну. За даними різних авторів (Harlow and Lane, 1988; Goding, 1996), задля зменшення неконтрольованої деградації молекул імуноглобулінів їх папаїновий гідроліз краще проводити без використання активатора ферменту – цистеїну. Дані різних авторів щодо оптимального часу такого протеолізу відчутно різняться (Wilson, 1971; Beale, 1985; Harlow and Lane, 1988; Goding, 1996; Josi and Lim, 2001). Відтак із метою віднаходження оптимального часу інкубування з реакційної суміші відбирали проби через 30 хв, 1, 2, 4 та 6 год. від початку постановки реакції. Ферментативний гідроліз у пробах зупиняли шляхом їх заморожування. Процес ферментативного гідролізу контролювали за допомогою вертикального електрофорезу у ПААГ з ДСН (рис. 1).

У редуруючих умовах імуноглобуліни розпадалися на важкі (H) та легкі (L) ланцюги, формуючи дві чіткі смуги на рівні 55 і 25 кДа. На електрофореграмі проб із реакційної суміші з'являлися ще дві смуги – на рівні 35 кДа (відповідає Fc-фрагментам важких ланцюгів IgA₁) та 20 кДа (відповідає фрагменту важкого ланцюга IgA₂, що містить домени CH₁-VH). Коли збільшували час інкубації з папаїном до 6 год., поступово зникала смуга, зумовлена присутністю важких ланцюгів. Це підтверджувало перебіг фрагментації імуноглобулінів. Зважаючи на ту обставину, що збільшення часу гідролізу понад 4 год. не викликає значного збільшення виходу Fc-фрагментів і зростає ймовірність утворення низькомолекулярних фрагментів унаслідок подальшого гідролізу отриманих фрагментів імуноглобуліну (Galkin, 2012), прийнято рішення проводити розщеплення IgA протягом 4 год.

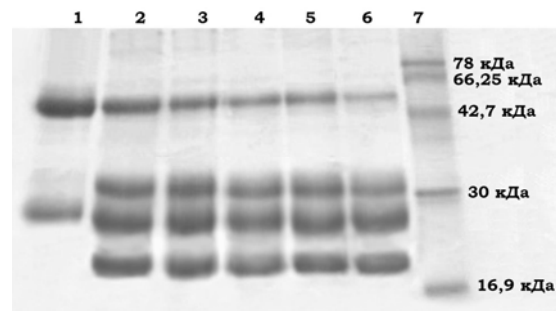


Рис. 1. Електрофореграма проб із реакційної суміші та нативного IgA людини:
1 – препарат IgA; 2, 3, 4, 5, 6 – проби, відібрані з реакційної суміші відповідно через 30 хв, 1, 2, 4 та 6 год. після початку розщеплення; 7 – маркери ММ

Після фрагментації IgA проводили виділення та очищення Fc-фрагментів IgA. Це завдання виконували послідовним вилученням Fab-фрагментів, мономерних Fc-фрагментів IgA людини. За даними літератури та власним досвідом (Goding, 1996), у цьому випадку ефективніше застосовувати гель-фільтрацію. Отже, після 4 год. ферментативного гідролізу реакційну суміш пропускали через колонку із сефадексом G-100 (рис. 2). Як видно із хроматограми, реакційна суміш розділилася на шість фракцій. Першими з колонки мали виходити нефрагментовані IgA, які мають найбільшу ММ – 160 кДа, другий пік, імовірно, утворювали Fc-фрагменти IgA із ММ близько 70 кДа, третій – два легкі ланцюги IgA₂ ММ 50 кДа, четвертий – Fab-фрагменти IgA₁ та IgA₂ ММ близько 45 кДа, п'ятий – частина важкого ланцюга IgA₂, що містить домени CH₁-VH ММ близько 20 кДа. Шостий пік формували, імовірно, низькомолекулярні фрагменти, що є продуктами небажаної фрагментації імуноглобулінів.

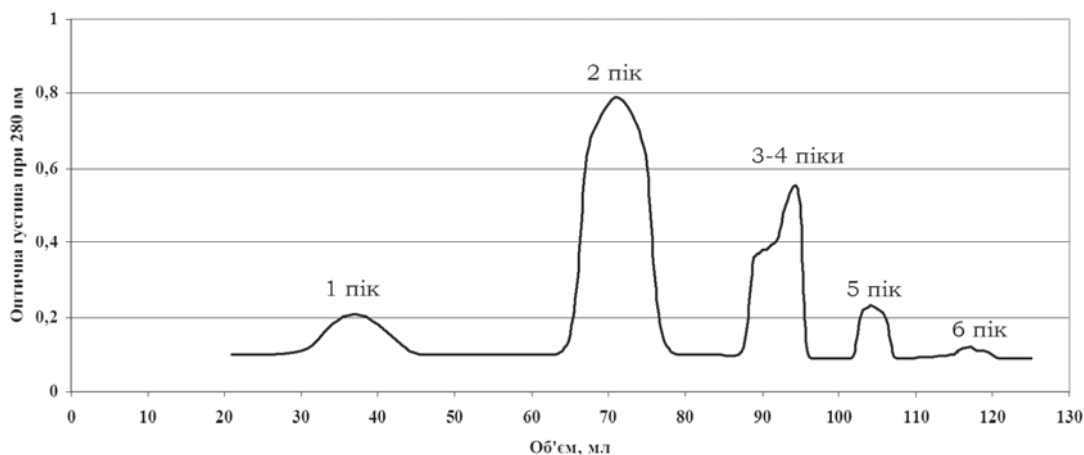


Рис. 2. Гель-фільтрація реакційної суміші на сефадексі G-100

Для аналізу перших трьох фракцій застосовано вертикальний електрофорез у ПААГ із ДСН (рис. 3). Як видно з електрофореграми, фракції першого піка відповідають дві смуги на рівні 55 та 25 кДа, які утворені, відповідно, важкими (H) та легкими (L) ланцюгами IgA. Фракції другого піка утворювали одну смугу на рівні 35 кДа, що відповідає молекулярній масі Fc-фрагментів IgA. Об'єднана фракція третього та четвертого піків утворювала дві близькі за молекулярною масою смуги на рівні

20–25 кДа, що співвідноситься з припущенням щодо їх вмісту (легкі ланцюги IgA₂ та Fab-фрагменти IgA). Фракція п'ятого піку формувала одну смугу на рівні 20 кДа, що підтверджувало наше припущення щодо вмісту даної фракції (частина важкого ланцюга IgA₂, що містить домени CH₁-VH).

Вміст фракцій, отриманих після гель-фільтрації, досліджували також за допомогою імунодифузії. Фракція першого піка утворювала лінії преципітації з

імуниними сироватками до цільних молекул IgA, λ_1 - та κ_1 -ланцюгів, що додатково підтверджує припущення щодо її вмісту (нефрагментовані IgA). У той же час фракція другого піку утворювала лінії преципітації лише із сироваткою до цільної молекули IgA. Це підтверджує наявність Fc-фрагментів IgA у фракції другого піка. Фракція третього та четвертого піків давала позитивні реакції аналогічно до фракції першого піка, що підтверджувало припущення щодо вмісту у ній легких ланцюгів IgA₂ та Fab-фрагментів IgA. Фракція п'ятого піка проявляла імунологічну активність, аналогічну фракції другого піка, проте інтенсивність лінії преципітації була помітно меншою, що підтверджувало присутність у даній фракції антигенних детермінант важкого ланцюга та свідчило про коректність висловлених нами припущень щодо вмісту у даній фракції частини важкого ланцюга IgA₂, що містить домени CH₁-VH.

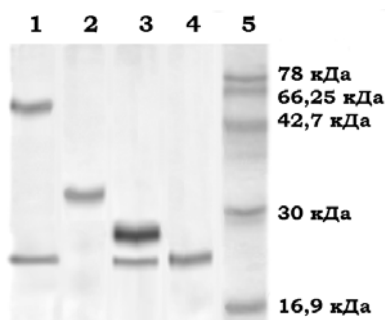


Рис. 3. Електрофореграма фракцій після гель-фільтрації реакційної суміші на сефадексі G-100:
1 – фракція першого піка; 2 – фракція другого піка; 3 – фракція третього та четвертого піків;
4 – фракція п'ятого піка; 5 – маркери MM

Чистота отриманих Fc-фрагментів IgA була задовільною вже після першого етапу очищення, а вихід останніх після всіх етапів очищення склав близько 18% початкової кількості імуноглобулінів у препараті. Молекулярна маса одержаних Fc-фрагментів IgA склала близько 70 кДа.

Висновки

Розроблено удосконалену методику одержання Fc-фрагментів IgA людини, яка передбачає:

- папаїновий гідроліз імуноглобулінів у середовищі азоту упродовж 4 год., що дозволяє досягти максимального виходу Fc-фрагментів без їх подальшої деградації;
- виділення та очищення Fc-фрагментів IgA шляхом одноетапної гель-фільтрації на сефадексі G-100;

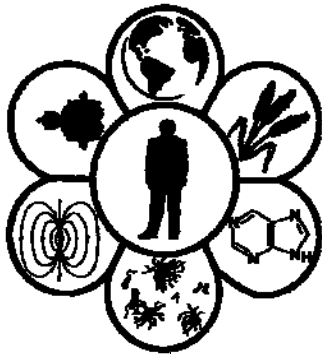
– контроль чистоти цільового продукту в електрофорезі в ПААГ з ДСН та імунодифузії за Оухтерлоні.

Застосування запропонованої схеми дозволяє одержувати Fc-фрагменти IgA людини високого ступеня чистоти. Вихід Fc-фрагментів після всіх етапів очищення склав близько 18% початкової кількості імуноглобулінів у препараті. Молекулярна маса одержаних Fc-фрагментів IgA людини склала близько 70 кДа.

Бібліографічні посилання

- Beale, D., 1985. Differences in fragmentation between bound and unbound bovine secretory component suggest a model for its interaction with polymeric immunoglobulin. *Biochem J.* 229(3), 759–763.
- Delves, P.J., Martin, S.J., Burton, D.R., Roitt, I.M., 2011. *Essential Immunology*, 12th Edition. Wiley-Blackwell, Hoboken.
- Galkin, O.Y., 2012. Rozroblennya udoskonalenoyi metodyky otrymannya Fc-frahmentiv IgM lyudyny [Developing of improved method of obtaining of human IgM Fc-fragments]. *Research Bulletin of National Technical University of Ukraine "Kyiv Polytechnic Institute"* 3, 7–11 (in Ukrainian).
- Goding, J., 1996. *Monoclonal antibodies. Principles and practice.* Acedemic press, San Diego.
- Harlow, E., Lane, D., 1988. *Antibodies. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor, New York.
- Josi, D., Lim, Y.P., 2001. Analytical and preparative methods for purification of antibodies. *Food Technol. Biotechnol.* 39(3), 215–226.
- Ketti, D., 1991. *Antitela. Metody: Kniga 1* [Antibodies. Methods: Book 1]. Mir, Moscow (in Russian).
- Laemmli, U.R., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680–685.
- Mihaylov, A.T., Simirskiy, V.N., 1991. *Metodyi immunohimicheskogo analiza v biologii razvitiya* [Immunoassay methods in developmental biology]. Nauka, Moscow (in Russian).
- Nikolayenko, I.V., Galkin, O.Y., Grabchenko, N.I., Spivak, M.Y., 2005. Preparation of highly purified human IgG, IgM, and IgA for immunization and immunoanalysis. *Ukrainica Bioorganica Acta* 2(2), 3–11.
- Paster, E.U., Ovod, V.V., Pozur, V.K., Vykhod', N.E., 1989. *Immunologiya: Praktikum* [Immunology: Workshop]. Vyisshaya Shkola, Kiev (in Russian).
- Svehag, S.E., Bloth, B., Seligmann, M., 1969. Ultrastructure of papain and pepsin digestion fragments of human IgM globulins. *J. Exp. Med.* 130(4), 691–705.
- Wilson, I.D., 1971. Studies on the products of peptic digestion of IgA. *Immunol.* 20, 327–339.
- Yakobysyak, M., 2004. *Imunolohiya* [Immunology]. Nova Knyha, Vinnytsya (in Ukrainian).

Надійшла до редколегії 21.02.2015



УДК 636.5/.6+612.176:017

Вплив імуномодуляторів природного походження на показники клітинного імунітету крові курчат-бройлерів в умовах стресу

С.С. Грабовський¹, О.С. Грабовська²

¹Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького, Львів, Україна

²Інститут біології тварин НААН, Львів, Україна

Досліджено відносну кількість Т- і В-лімфоцитів у крові курчат-бройлерів у випадку застосування імуномодуляторів тваринного походження за умов передзабійного стресу. Птиці дослідних груп за п'ять днів до забою додатково до основного раціону вводили аерозольним методом екстракт селезінки (70° спиртовий розчин об'ємом 1,4 мл на курча), одержаний із застосуванням і без застосування ультразвуку. Курчатам-бройлерам контрольної групи за п'ять днів до забою до корму додавали 70% розчин етанолу в аналогічному об'ємі. У цільній крові визначали відносну кількість Т- і В-лімфоцитів та їх окремих популяцій у реакції спонтанного розеткоутворення з еритроцитами барана, проводили диференційований підрахунок розеткотвірних лімфоцитів із різним ступенем функціональної активності. Уведення курчатам-бройлерам імуномодуляторів природного походження мало стимулювальний вплив на кількість Т- і В-лімфоцитів і функціональну активність Т- і В-клітинного імунітету. Як імуномодулятори та антистресори, поліаміни з екстракту селезінки мали найбільший вплив на деякі показники Т- і В-клітинного імунітету – зростання відносної кількості Т-хелперних клітин (за рахунок середньоавідних та високоавідних) у крові курчат-бройлерів перед їх забоем. Результати, отримані нами в експерименті на курчатах-бройлерах, можуть бути використані у дослідженнях показників клітинного імунітету у сільськогосподарських тварин із метою підвищення резистентності організму, корекції передзабійного стресу.

Ключові слова: передзабійний стрес; екстракти селезінки; Т- і В-лімфоцити; поліаміни; путресцин; спермідин; спермін

Influence of immunomodulators of natural origin on cellular immunity indices in blood of broiler chicken under stress

S. Grabovsky¹, O. Grabovska²

¹S.Z. Gzhytskyj National University of Veterinary Medicine and Biotechnology, Lviv, Ukraine

²Institute of Animal Biology of NAAS, Lviv, Ukraine

The paper deals with researching of T- and B-lymphocytes relative quantity and functional activity in broiler chicken blood after using of animal origin immunomodulators in conditions of pre-slaughter stress. The authors determined the relative amount of T- and B-lymphocytes and their individual populations in the reaction of spontaneous rosetting with the sheep erythrocytes in blood. Besides, the differentiated count of rosetting lymphocytes with the various degree of functional activity was conducted. The spleen extract (70% alcohol solution in volume of 1.4 ml per chicken) was added to the diet of broiler chicken of experimental groups by aerosol method. This extract was obtained with/ without ultrasound application. 70% alcohol solution in the same volume and using the same method was added to the diet of broiler chicken of the control group five days before slaughter. The authors have not established probable increase of T-lymphocytes general quantity in broiler chicken blood in both experimental groups. It is shown that pre-slaughter stress in broiler chicken caused by weaning has immuno-suppressive effect on T- and B-lymphocytes in blood, which is accompanied by their quantity and functional activity decrease. T- and B-lymphocytes amount and functional activity of T- and B-cell immunity was stimulated after adding immunomodulators of natural

Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, вул. Пекарська, 50, Львів 79010, Україна

Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named after S.Z. Gzhytskyj, 50, Pekarska St., Lviv, 79010, Ukraine
Tel.: +38-096-950-00-01. E-mail: grbss@ukr.net

Інститут біології тварин НААН, вул. В. Стуса, 38, Львів, 79034, Україна
Institute of Animal Biology of NAAS, V. Stus str., 38, Lviv, 79034, Ukraine
Tel.: +38-096-279-26-33. E-mail: alice_grb@ukr.net

origin to broiler chicken diet. Spleen extract polyamines as immunomodulators and antistressors most effectively influenced on some of cell immunity indices before slaughter – it is necessary to note the increase in T-helper lymphocytes in the broiler chickens blood caused by lymphocytes with medium (6–10) – by 18% ($P < 0.05$) and high density receptors (M) – by 35% ($P < 0.05$) compared to the control. It is shown that decrease of T-lymphocytes quantity in broiler chicken blood is caused by lymphocytes with low (3–5) – by 22% ($P < 0.01$) and high (M) – by 11% ($P < 0.05$) density receptors with increase of medium density receptors (6–10) – by 15% ($P < 0.05$) compared to the control. The results obtained in the experiment can be used in the investigations of cell immunity indices of farm animals in order to increase the organism resistance and to correct their pre-slaughter stress.

Keywords: pre-slaughter stress; spleen extracts; T- and B-lymphocytes; polyamines; putrescin; spermine; spermidine

Вступ

Із літературних джерел відомо про вплив стресу різного характеру (Palme et al., 2000; Bristow et al., 2007) на T- і B-клітинний імунітет (Kiseljova et al., 2012; Groer et al., 2013), про механізм розвитку реакцій гомеостатичних систем на зовнішній подразник (Nezhinskaja et al., 2006; Kaminska et al., 2008). Складний комплекс імуннокомпетентних клітин – основа імунної системи. T-лімфоцити здатні розрізняти тільки короткі пептидні фрагменти білкових антигенів, а B-лімфоцити здатні розпізнавати антигени в розчині і зв'язувати білкові, полісахаридні та ліпопротеїдні розчинні антигени (Larovets et al., 2014).

Автори (Hermans et al., 2012; Maroufyan et al., 2012; Rowland et al., 2015) досліджували вплив інфекційних і неінфекційних захворювань на імунну відповідь різних генетичних ліній курчат. Інші роботи присвячені впливу біологічно активних речовинами на імунний статус курей із використанням дріжджів (Paul et al., 2013), аргініну та вітаміну E (Liu et al., 2014), пробіотиків (Kim et al., 2011), β -глюкану (Paul et al., 2012) та різних імунomodляторів (Ganguly et al., 2009, 2010).

У модельному експерименті на щурах ми вивчали вплив передзабійного стресу на клітинний імунітет. Внесення у корм щурам імунomodляторів природного походження мало стимулювальний вплив на функціональну активність T- і B-клітинної ланки імунітету (Grabovskyi, 2014). У контролі вродженої імунної відповіді у вищих хребетних важливу роль відіграють поліаміни (спермідин, спермін та путресцин), які можуть сприяти розвитку відповідної адаптивної імунної реакції (Minois et al., 2011; Maslyanko et al., 2013), поглинатися T- і B-лімфоцитами тощо. Вірогідно більший вміст поліамінів був у крові, печінці та грудному м'язі у курчат-бройлерів, яким до основного раціону вводили екстракт селезінки, отриманий із застосуванням ультразвуку, що дозволило використати цей субстрат як імунomodлятор та з'ясувати його дію ще й як антистресора (Grabovskyi, 2013, 2014).

У літературі недостатньо висвітлені питання про вплив передзабійного стресу тварин на окремі показники імунітету. У дослідженнях ми використали біологічно активні речовини природного походження (екстракт селезінки) для нівелювання стресу. Метою роботи було встановити, чи впливає екстракт селезінки на імунітет курчат-бройлерів в умовах передзабійного стресу.

Матеріал і методи досліджень

Дослід провели на 15 курчатах-бройлерах, яких утримували на стандартному раціоні ТзОВ «Великолюбін-

ське» смт. Великий Любінь Городоцького району Львівської області. Для дослідження сформували три групи птиці одномісячного віку (по п'ять курчат у кожній).

Як біологічно активні речовини у передзабійний період (за п'ять діб до забою) використовували спиртовий екстракт селезінки, одержаний із застосуванням ультразвуку (I група) та без застосування ультразвуку (II група). Екстракти наносили на комбікорм аерозольним методом (70% спиртовий розчин об'ємом 1,4 мл). Птиці контрольної групи аналогічно додавали до корму 70% розчин етанолу у такому ж об'ємі. Контроль за поїданням комбікорму здійснювали щоденно. Забій птиці проводили у ранковий час.

Утримання, годівлю, догляд та усі маніпуляції з птицею здійснювали згідно з Європейською конвенцією «Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і наукових цілей» (Страсбург, 1986 р.) і «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001). Експерименти проводили з дотриманням принципів гуманності, викладених у директиві Європейської Спільноти (DIRECTIVE 2010/63/EU).

У цільній крові курчат-бройлерів визначали відносну кількість T- і B-лімфоцитів та їх окремих популяцій у реакції спонтанного розеткоутворення з еритроцитами барана. За кількістю еритроцитів, адсорбованих одним лімфоцитом, судять про ступінь активності лімфоцитів. Визначали відносну кількість загальних (TE-РУЛ – загальні розеткотвірні лімфоцити) та активних T-лімфоцитів (ТА-РУЛ – активні розеткотвірні лімфоцити). Для відмивання лімфоцитів використовували забуферений фізіологічний розчин (рН розчину – 7,2–7,4 (7,3)). Мононуклеарну фракцію клітин виділяли з гепаринізованої крові курчат-бройлерів. Мазки висушували, фіксували метанолом, фарбували 7–10 хв за Романовським – Гімза. Мікроскопію мазків робили під імерсією за збільшення 90 x 7. Лімфоцити за кількістю приєднаних еритроцитів: нульові – не приєднали жодного, малодиференційовані (низькоавідні або клітини з малою щільністю поверхневих рецепторів) – приєднали 3–5 еритроцитів, середньоавідні субпопуляції – 6–10 еритроцитів, високодиференційовані (високоавідні) – розетки з понад 10 еритроцитів (M – морула).

Визначення відносної кількості теофілінрезистентних лімфоцитів (T-хелперів, Th) ґрунтується на тому, що ці клітини несуть на своїй поверхні рецептори до імуноглобулінів класу M, а T-супресори – до імуноглобулінів класу G. Хелперні лімфоцити здатні формувати розетки після їх інкубації з теофіліном (теофілінрезистентні клітини). Кількість теофілінчутливих лімфоцитів (T-супресорів, Ts) визначали за різницею між кількістю TE-РУЛ та T-хелперів.

Визначали відносну кількість B-лімфоцитів, метод ідентифікації яких ґрунтується на наявності у них

мембранних імуноглобулінових рецепторів, що забезпечує приєднання до В-лімфоцитів індикаторних клітин, які на своїй поверхні містять комплемент-антиген-комплекс (ЕАС-РУЛ). Як індикаторні клітини використовували еритроцити барана, сенсibiliзовані антитілами та комплементом. Для приготування комплемент-антиген-комплексу використовували готову рідку гемолітичну сироватку (титр 1 : 1200) та готовий сухий комплемент морської свинки (Vlizlo et al., 2012).

Статистичну обробку результатів виконували за допомогою пакета програм Statistica 6.0. Вірогідність різниці середніх оцінювали за t-критерієм Стьюдента.

Результати та їх обговорення

Аналізуючи отримані результати досліджень окремих показників імунного статусу організму курчат-бройлерів, не встановили вірогідних різниць кількості загальних і активних Т-лімфоцитів у крові курчат-бройлерів обох дослідних груп (табл.). Відмічено зменшення кількості активних Т-лімфоцитів із низькою щільністю рецепторів, тобто низькоавідних (малодиференційованих) (3–5) на 22% ($P < 0,01$) та з високою щільністю рецепторів, тобто високоавідних (М) – на 11% ($P < 0,05$) при збільшенні середньоавідних (6–10) на 15% ($P < 0,05$).

Таблиця

Кількість Т- і В-лімфоцитів та їх функціональна активність у крові курей (од., $M \pm m$, $n = 5$)

Показники	Група тварин		
	I	II	контрольна
Т-загальні (ТЕ-РУЛ), %	23,6 ± 0,52	24,8 ± 1,36	23,8 ± 1,39
недиференційовані (0)	76,4 ± 0,52	75,2 ± 1,32	76,2 ± 1,35
низькоавідні (3–5)	6,0 ± 2,71	5,2 ± 1,13	4,6 ± 1,53
середньоавідні (6–10)	11,4 ± 0,63	12,8 ± 0,46	14,2 ± 1,81
високоавідні (М)	6,2 ± 1,66	6,8 ± 0,81	5,0 ± 1,02
Т-активні (ТА-РУЛ), %	47,2 ± 1,18	48,0 ± 4,04	48,2 ± 1,37
недиференційовані (0)	52,8 ± 1,19	52,0 ± 4,08	49,8 ± 3,38
низькоавідні (3–5)	11,4 ± 0,51**	14,0 ± 2,52	14,6 ± 2,71
середньоавідні (6–10)	27,2 ± 1,13*	23,8 ± 2,44	23,0 ± 2,33
високоавідні (М)	8,6 ± 0,51*	10,2 ± 3,46	10,6 ± 0,91
Т-хелпери (Th), %	34,6 ± 0,61	33,2 ± 1,91	33,2 ± 2,35
недиференційовані (0)	65,4 ± 0,53	66,6 ± 2,18	66,8 ± 2,38
низькоавідні (3–5)	7,6 ± 2,22	8,0 ± 1,09	10,4 ± 1,81
середньоавідні (6–10)	18,2 ± 0,45*	14,6 ± 2,13	15,0 ± 1,02
високоавідні М	9,8 ± 1,64*	10,6 ± 2,48	6,4 ± 0,55
Т-супресори (Ts), %	12,6 ± 0,51**	14,8 ± 4,08	15,0 ± 1,91
В-лімфоцити, %	53,6 ± 0,51**	52,2 ± 2,85	52,0 ± 1,43
недиференційовані (0)	46,4 ± 0,62**	47,8 ± 2,81	48,0 ± 1,48
низькоавідні (3–5)	21,0 ± 2,73	20,2 ± 3,05	20,6 ± 1,53
середньоавідні (6–10)	23,8 ± 1,61	23,6 ± 2,52	22,4 ± 1,71
високоавідні М	8,8 ± 1,62	8,4 ± 1,18	9,0 ± 1,45

Примітки: статистична вірогідність різниці * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$ порівняно з контролем; Т-лімфоцити малодиференційовані (низькоавідні або клітини з малою щільністю поверхневих рецепторів) приєднали 3–5 еритроцитів; Т-лімфоцити середньоавідні (6–10) або клітини з середньою щільністю поверхневих рецепторів приєднали 6–10 еритроцитів; Т-лімфоцити високодиференційовані (високоавідні) утворили розетки з понад 10 еритроцитів (М – морула).

Слід відмітити зростання відносної кількості Т-хелперних клітин (Th) за рахунок середньоавідних (6–10) на 18% ($P < 0,05$) та високоавідних на 35% ($P < 0,05$). Спостерігали незначне зменшення відсотка Т-супресорів (Ts) у крові курчат-бройлерів дослідної групи (на 3%, $P < 0,05$) і тенденцію до збільшення кількості В-лімфоцитів за рахунок низькоавідних і середньоавідних клітин. Із цих даних випливає, що внесення екстракту селезінки у корм курчатам-бройлерам дослідних груп має вплив на функціональні властивості Т-лімфоцитів крові, зокрема, на рецепторний апарат клітин, про що повідомляють автори (Abbas et al., 2008), котрі у разі ін'єкції АКТГ спостерігали істотне зменшення лімфоцитів у крові. Отримані дані відрізняються від повідомлень (Gunchak et al., 2012), де випоювання курчатам-бройлерам настою з евкаліпту з додаванням вітаміну С стимулювало активність Т-В-клітинної ланки імунітету.

Виявлено більшу кількість Т- і В-лімфоцитів та вищу функціональну активність імункомпетентних клітин за рахунок перерозподілу авідності рецепторного апарату

Т- і В-лімфоцитів: збільшення кількості лімфоцитів із низькою та середньою щільністю рецепторів і зменшення недиференційованих у функціональному відношенні клітин у крові гусенят та індичат, яким до раціону вводили вітамін Е. Токоферол мав стимулювальний вплив на бластогенез Т-лімфоцитів крові індичат і гусенят (Mudrak et al., 2012).

Подібні дослідження проведено Liu et al. (2014), де використано для стимулювання імунітету аргінін, який є субстратом поліамінів (путресцину, сперміну та спермідину). У наших дослідженнях запропоновано використовувати власне поліаміни, які проявили імунотулювальну дію.

Висновки

Біологічно активні речовини і, зокрема, поліаміни з екстракту селезінки як імунотулюатори та антистресори впливають на показники Т- і В-клітинного імунітету крові курчат-бройлерів перед їх забоем, підвищують

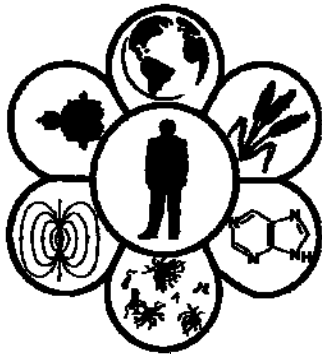
резистентність організму, коригують та нівелюють вплив стресу перед забоєм тварин.

Перспективою подальших розвідок стане дослідження показників клітинного імунітету у крові свиней та великої рогатої худоби у разі використання імуномодуляторів та антистресорів, які містяться в екстракті селезінки, за умов передзабійного стресу.

Бібліографічні посилання

- Abbas, A.O., El-Dein, A.A., Desoky, A.A., Galal, M.A., 2008. The effects of photoperiod programs on broiler chicken performance and immune response. *Int. J. Poultry Sci.* 7(7), 665–671.
- Bristow, D.J., Holmes, D.S., 2007. Cortisol levels and anxiety-related behaviors in cattle. *Physiol. Behav.* 90, 626–628.
- Ganguly, S., Paul, I., Mukhopadhyay, S.K., 2009. Immunostimulants-their significance in finfish culture. *Fishing Chimes* 29(7), 49–50.
- Ganguly, S., Paul, I., Mukhopadhyay, S.K., 2010. Immunostimulant, probiotic and prebiotic – their applications and effectiveness in aquaculture: A Review. *Isr. J. Aquacult. Bamid.* 62(3), 130–138.
- Grabovskiy, S.S., 2013. Jekstragirovanie biologicheskii aktivnykh veshchestv selezenki s ispolzovaniem ultrazvuka [Extracting of biologically active substances of spleen with the application an ultrasound]. *Sbornik Nauchnykh Trudov SWorld.* Markova A.D., Ivanovo 4(49), 3–6 (in Russian).
- Grabovskiy, S.S., 2014. Vmest poliaminiv ta yikh korektsiya u krovi ta tkanyakh kurchat-broyleriv za umov stresu [Polyamines content and its correction in broiler chickens blood and tissues at pre-slaughter stress]. *Bioloziya Tvaryn* 16(2), 18–25 (in Ukrainian).
- Grabovskiy, S.S., 2014. Vplyv imunomodulyatoriv pryrodnoho pokhodzhennya na pokaznyky klitynnoho imunitetu i riven kortyzolu v krovi shchuriv za umov stresu [Effect of natural immunomodulators influence on cellular immunity indices and cortisol level in rat's blood at pre-slaughter stress]. *Biolozhichni Studiyi* 8(1), 93–102 (in Ukrainian).
- Groer, M., Wolfe, S., Park, C.R., 2013. Reduction of hair glucocorticoid levels in an animal model of post-traumatic stress disorder (PTSD). *Brain Behav. Immun.* 68(32), e20.
- Gunchak, A.V., Ratuch, I.B., Kaminska, M.V., 2012. Sklad mikroflory slipykh kyshok ta pokaznyky klitynnoho imunitetu u kurchat-broyleriv za diyi fitopreparatu [Composition of cecum microflora and indices of cellular immunity in broiler chickens under the action of phytomedication]. *Bioloziya Tvaryn* 14(1–2), 518–523 (in Ukrainian).
- Hermans, D., Pasmans, F., Heyndrickx, M., Van Immerseel, F., Martel, A., Van Deun, K., Haesebrouck, F.A., 2012. Tolerogenic mucosal immune response leads to persistent *Campylobacter jejuni* colonization in the chicken gut. *Crit. Rev. Microbiol.* 38(1), 17–29.
- Kaminska, M.V., Nechay, H.I., Tsepko, N.I., Kolisnyk, H.V., 2008. Vplyv karotynovmisnoyi biomasy drizhdzhiv ta β -karotynu na sklad mikroflory ta imunnyy status shchuriv [Influence carotenecontaining yeast biomass and β -carotene on the microfloras composition and immune status of rats]. *Bioloziya Tvaryn* 10(1–2), 261–265 (in Ukrainian).
- Kim, G.B., Seo, Y.M., Kim, C.H., Paik, I.K., 2011. Effect of dietary probiotic supplementation on the performance, intestinal microflora, and immune response of broilers. *Poultry Sci.* 90(1), 75–82.
- Kiseljova, N.M., Kuzmenko, L.H., Nkane Nkoza, M.M., 2012. Stress i limfocity [Stress and lymphocytes]. *Pediatrics* 91(1), 137–143 (in Russian).
- Lapovets, L.Y., Lutsyk, B.D., Lebed, H.B., 2014. Posibnyk z laboratornoyi imunolohiyi [Handbook of laboratory immunology]. FOP Kravetsky R.P., Lviv (in Ukrainian).
- Liu, X., Byrd, J.A., Farnell, M., Ruiz-Feria, C.A., 2014. Arginine and vitamin E improve the immune response after a *Salmonella challenge* in broiler chicks. *Poultry Sci.* 93(4), 882–890.
- Maroufyan, E., Kasim, A., Ebrahimi, M., Loh, T.C., Bejo, M.H., Zerihun, H., Hosseini, F., Goh, Y.M., Farjam, A.S., 2012. Omega-3 polyunsaturated fatty acids enrichment alters performance and immune response in infectious bursal disease challenged broilers. *Lipids Health Dis.* 11(1), 1–10.
- Masyanko, R.P., Grabovskiy, S.S., Grabovska, O.S., 2013. Suchasni uyavleniya pro fahotsytoz [Modern notion of phagocytosis]. *Bioloziya Tvaryn* 15(3), 63–69 (in Ukrainian).
- Mudrak, D.I., Vishchur, O.I., Broda, N.A., Ohorodnyk, N.Z., Solovodzinska, I.Y., 2012. Stan T- i V-klitynnoyi lanok imunitetu v indykyv ta husey za riznoho rivnya vitaminu E u ratsioni [State T- and B-cell immunity in parts of turkeys and geese for various levels of vitamin E the diet]. *Bioloziya Tvaryn* 14(1–2), 535–539 (in Ukrainian).
- Minois, N., Carmona-Gutierrez, D., Madeo, F., 2011. Polyamines in aging and disease. *Aging (Albany NY)* 3(8), 716–732.
- Nezhinskaja, G.I., Petrova, N.N., 2006. Rol stimuljacii B-limfocitov v profilaktike stress-inducirovannykh jazv zheludka u kryv linii vistar [Role of B-lymphocytes incentive in prevention of stress-inducible stomach ulcers in Wistar rats]. *Citokiny i vospalenie* 5(1), 34–36 (in Russian).
- Official Journal of the European Union L276/33, 2010. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. 86/609/EC. 20.10.2010.
- Palme, R., Robia, C., Baumgartner, W., Möstl, E., 2000. Transport stress in cattle as reflected by an increase in faecal cortisol metabolites. *Vet. Rec.* 146, 108–109.
- Paul, I., Isore, D.P., Joardar, S.N., Samanta, I., Biswas, U., Maiti, T.K., Mukhopadhyay, S.K., 2012. Orally administered β -glucan of edible mushroom (*Pleurotus florida*) origin upregulates innate immune response in broiler. *Indian J. Anim. Sci.* 82(7), 745–748.
- Paul, I., Isore, D.P., Joardar, S.N., Roy, B., Aich, R., Ganguly, S., 2013. Effect of dietary yeast cell wall preparation on innate immune response in broiler chickens. *Indian J. Anim. Sci.* 83(3), 307–309.
- Rowland, K., Kaiser, M.G., Lamont, S.J., 2015. Simulated bacterial infection in three diverse lines of chickens causes different immune responses: Changes in body temperature and gene expression levels. *Animal Industry Report* 661(1), 57.
- Vlizlo, V.V., Fedoruk, R.S., Ratych, I.B., 2012. Laboratorni metody doslidzhen u bioloziyi, tvarynnytsvtvi ta veterynarniy medytsyni [Laboratory methods of investigation in biology, stock-breeding and veterinary]. Spolom, Lviv (in Ukrainian).

Надійшла до редколегії 14.03.2015



УДК 579.266.4+579.26:631.461

Дисиміляційна сульфатредукція у бактерій *Desulfovibrio desulfuricans* ІМВ К-6 за впливу гербіцидів Ураган і Раундап

Г.І. Звір, О.М. Мороз, С.О. Гнатуш

Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів, Україна

З'ясовано здатність сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfovibrio desulfuricans* ІМВ К-6 рости та відновлювати сульфат-іони до гідроген сульфід у впливу гербіцидів Ураган і Раундап. Нагромадження біомаси бактеріями у контролі та за впливу гербіцидів було найвищим на четверту – шосту добу культивування, після чого бактерії переходили у стаціонарну фазу росту. За впливу гербіцидів біомаса *D. desulfuricans* ІМВ К-6 була вищою порівняно з контролем. Нагромадження біомаси змінювалося відповідно до зростання концентрації гербіцидів у середовищі. Сульфатвідновлювальні бактерії *D. desulfuricans* ІМВ К-6 за наявності сульфатів та органічних сполук у середовищі здійснюють відновлення сульфат-іонів до гідроген сульфід (дисиміляційна сульфатредукція). У контрольному середовищі процес відновлення сульфат-іонів бактеріями *D. desulfuricans* ІМВ К-6 був найінтенсивнішим упродовж перших чотирьох діб. За цих умов у середовищі виявлено максимальну концентрацію гідроген сульфід. Внесення гербіцидів у середовище культивування стимулювало процес відновлення сульфат-іонів і утворення гідроген сульфід сульфатвідновлювальними бактеріями *D. desulfuricans* ІМВ К-6. Здатність *D. desulfuricans* ІМВ К-6 нагромаджувати вищі рівні біомаси та здійснювати дисиміляційну сульфатредукцію за впливу Урагану та Раундапу може бути зумовлена наявністю у цих гербіцидах невисоких концентрацій інертних компонентів (сульфатів), що можуть бути використані бактеріями як акцептори електронів у сульфатному диханні.

Ключові слова: сульфатвідновлювальні бактерії; дисиміляційна сульфатредукція; сульфат-іони; гідроген сульфід

Dissimilatory sulfate reduction in bacteria *Desulfovibrio desulfuricans* IMV K-6 upon influence of Uragan and Raundup herbicides

G.I. Zvir, O.M. Moroz, S.O. Hnatush

Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, Ukraine

Objects of the study were sulfate-reducing bacteria *Desulfovibrio desulfuricans* IMV K-6, isolated from Yavorivske lake. This strain is kept in the collection of microorganisms at the Department of Microbiology of Ivan Franko National University. Bacteria were grown in the Kravtsov-Sorokin's liquid medium with the following composition (g/l): $\text{Na}_2\text{SO}_4 \times 10\text{H}_2\text{O} - 0.5$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - 0.3$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 0.5$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - 0.2$, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0.1$, $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3\text{Na} - 2.0$. The bacteria were grown for 10 days at 30 °C under anaerobic conditions. In order to study the sensitivity of the sulfate reducing bacteria to action of Uragan and Raundup herbicides, the cells of *D. desulfuricans* IMV K-6 were grown at the concentrations of herbicides as follows: 0,28 mM, 2,8 mM (concentration recommended for use) and 5,6 mM. Biomass was determined by photometric method. Concentration of hydrogen sulfide in the culture medium was determined by photo-colorimetric method. Concentration of sulfate-ions in the medium was determined by turbidimetric method. Capacity of sulfate reducing bacteria *D. desulfuricans* IMV K-6 to grow, reducing sulfates to hydrogen sulfide upon influence of Uragan and Raundup herbicides was studied. Accumulation of bacterial biomass in the control and upon influence of herbicides was the highest on the fourth-sixth day of cultivation, and after that the stationary growth phase began. It was shown that sulfate reducing bacteria upon influence of herbicides grew more intensively compared with the control. It was discovered that the level of biomass changed depending on the increasing concentration of Uragan or Raundup herbicides in the medium. Sulfate reducing bacteria *D. desulfuricans* IMV K-6 could reduce sulfates to hydrogen sulfide in the presence of sulfates and organic compounds in the medium (dissimilatory sulfate reduction). Stimulatory influence of Uragan and Raundup on the dissimilatory sulfate reduction process of *D. desulfuricans* IMV K-6 has been discovered. The formation of hydrogen sulfide correlates with the usage of sulfate ions. The capacity of sulfate reducing bacteria *D. desulfuricans* IMV K-6 to grow, reducing sulfate ions to hydrogen

sulfide upon influence of Uragan and Raundup may be caused by presence of inert components (sulfates) in these herbicides that can be used by microorganisms as electron acceptors during sulfate respiration.

Key words: sulfate reducing bacteria; dissimilatory sulfate reduction; sulfate ions; hydrogen sulfide

Вступ

Упродовж останніх років серед гербіцидів за обсягами використання на землях сільськогосподарського та несільськогосподарського призначення домінують препарати на основі гліфосату. Гліфосат – один із найпоширеніших неселективних системних гербіцидів, який застосовують для боротьби з бур'янами, особливо багаторічними. Препарати на основі гліфосату пригнічують синтез білка у клітинах рослин, унаслідок чого відбувається інгібування синтезу хлорофілу з наступним відмиранням рослин (Kuznetsova and Chmil, 2001; Shushkova et al., 2012).

Гліфосат малотоксичний для теплокровних тварин і людини (Evans and Batty, 1986; Lund-Hoie and Friestad, 1986; Kuznetsova and Chmil, 2001; Nikolaichik et al., 2011), проте завдає шкоди комахам, риbam і птахам, знижує життєздатність азотфіксуювальних бактерій, інгібуючи активність ферментів, що беруть участь у синтезі амінокислот, пригнічує ріст мікоризи, підвищує чутливість рослин до збудників хвороб, спричиняє канцерогенний вплив (Kuznetsova and Chmil, 2001; Saratovskich et al., 2007; Nedopytanska, 2011; Poznyak, 2011; Belokon and Sklyar, 2012). Впливаючи на ґрунтову мікробіоту, гліфосат може змінювати перебіг природних процесів в екосистемах і навіть у біосфері в цілому.

В Україні зареєстровано понад 50 різних препаративних форм на основі гліфосату, наприклад Ураган, Гліфосат, Антибур'ян, Гліфовіт, Торнадо тощо, які відрізняються складом. Крім діючої речовини вони містять так звані «інертні компоненти». Наприклад, Раундап містить ізопропіламіну та сорбінову кислоти, натрій сульфат, калій гідроксид, метилпіролідіон, ізобутан, 3-йодо-2-пропінілбутилкарбамат, амоній сульфат і поліетоксилат талоамін (Poznyak, 2011). Незалежні дослідження, проведені у деяких європейських країнах, Японії та США, показали, що гербіцид Раундап токсичніший, ніж його діюча речовина – гліфосат. Через високу біологічну активність, широке застосування збільшується вірогідність негативного впливу гербіцидів на урожай і стан навколишнього середовища (Kuznetsova and Chmil, 2001; Poznyak, 2011).

Незважаючи на те, що біодеградація пестицидів вивчається досить інтенсивно, залишаються малодослідженими закономірності формування стійкості мікроорганізмів ґрунту, зокрема, бактерій циклу сульфуру, до токсичної дії засобів захисту рослин. Тому мета нашого дослідження – з'ясувати вплив гербіцидів Ураган і Раундап, діючою речовиною яких є гліфосат, на ріст і процес дисиміляційної сульфатредукції сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfovibrio desulfuricans* IMB K-6.

Матеріал і методи досліджень

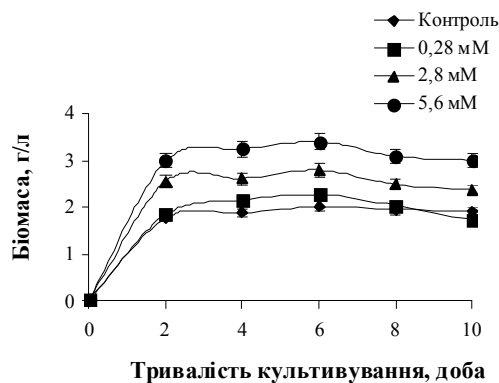
Об'єкт дослідження – сульфатвідновлювальні бактерії *Desulfovibrio desulfuricans* IMB K-6. Бактерії вирощували у середовищі Кравцова – Сорокіна такого складу (г/л):

$\text{Na}_2\text{SO}_4 \times 10\text{H}_2\text{O} - 0,5$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - 0,3$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 0,5$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - 0,2$, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0,1$, $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3\text{Na} - 2,0$. Перед посівом у середовище вносили 0,05 мл стерильного розчину $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$ (1%). рН середовища дорівнювала 7,2. Бактерії вирощували упродовж 10 діб у термостаті за температури 30 °С й анаеробних умов у пробірках об'ємом 25 мл, доверху заповнених середовищем. Густина засіву була 0,05 г/л. Із метою дослідження чутливості сульфатвідновлювальних бактерій до дії гербіцидів Ураган і Раундап вносили у пробірки у концентраціях 0,28, 2,8 мМ (рекомендована до використання концентрація) та 5,6 мМ. Контролем було середовище без гербіцидів. Біомасу вимірювали через 2, 4, 6, 8, 10 діб культивування фотометруванням на фотоелектроколориметрі КФК-3 за $\lambda = 340$ нм у кюветі з оптичним шляхом 3 мм і розраховували за формулою: C (г/л) = $E_{340} \times n \div K$, де E_{340} – екстинкція за довжини хвилі 340 нм, n – розведення, K – коефіцієнт перерахунку, отриманий за калібрувальною кривою залежності екстинкції від сухої маси клітин. Для *D. desulfuricans* IMB K-6 коефіцієнт перерахунку становить 0,19. Концентрацію гідроген сульфід у культуральній рідині визначали фотоколориметричним, сульфат-іонів – турбідиметричним методом (Gudz et al., 2014). Статистичне опрацювання результатів здійснювали за допомогою програми Origin Pro 7.0.

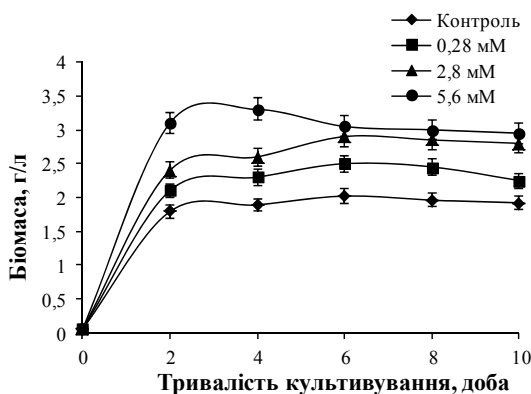
Результати та їх обговорення

Сульфатвідновлювальні бактерії роду *Desulfovibrio*, які відновлюють сульфати до гідроген сульфід, – важлива ланка у колообігу сполук сульфуру у природі. Вони не лише ростуть у середовищах, забруднених важкими металами та іншими ксенобіотиками, а й можуть бути використані для ремедіації довкілля, оскільки розкладають токсичні сполуки складної структури до малотоксичних речовин (Petrova et al., 2003; Butorova et al., 2010). Досліджено чутливість бактерій *D. desulfuricans* IMB K-6 до дії гербіцидів Ураган і Раундап у різних концентраціях (рис. 1 А, Б).

Упродовж перших двох діб культивування *D. desulfuricans* IMB K-6 у середовищі, яке не містило гербіцидів, біомаса зростає з $0,05 \pm 0,004$ до $1,79 \pm 0,20$ г/л. Найбільшою біомаса була на шосту добу росту ($2,02 \pm 0,03$ г/л). Внесення гербіцидів у середовище культивування стимулювало ріст *D. desulfuricans* IMB K-6. Криві, що відображають ріст бактерій *D. desulfuricans* IMB K-6 за впливу гербіцидів, схожі з контрольним варіантом, проте біомаса була вищою в кожній точці, в якій проводили вимірювання. За впливу Урагану у концентрації 0,28 мМ нагромадження біомаси зросло на 13% порівняно з контролем. Збільшення концентрації Урагану до 2,8 мМ стимулювало нагромадження біомаси в 1,6 раза порівняно з контролем. У випадку збільшення концентрації гербіциду до 5,6 мМ біомаса майже удвічі перевищила контрольні величини. Отже, внесення у середовище культивування *D. desulfuricans* IMB K-6 гербіциду Ураган стимулювало нагромадження біомаси відповідно до концентрації гербіциду.



А



Б

Рис. 1. Нагромадження біомаси *D. desulfuricans* IMB К-6 у середовищі Кравцова – Сорокіна за впливу Урагану (А) та Раундапу (Б)

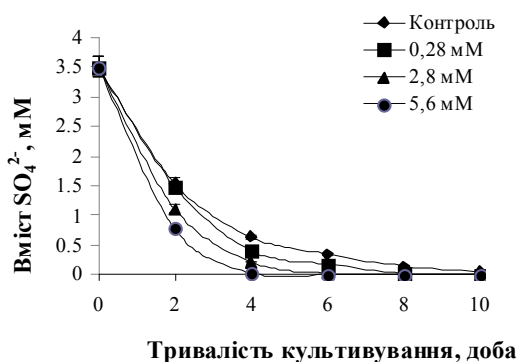
Раундап, як і Ураган, стимулював ріст *D. desulfuricans* IMB К-6 відповідно до концентрації. Внесення у середовище культивування Раундапу за концентрації 0,28 мМ стимулювало зростання біомаси на 24%. За збільшення концентрації гербіциду до 2,8 мМ біомаса зростає в 1,4 раза порівняно з контролем. Найбільшу біомасу бактерії нагромаджували за внесення 5,6 мМ Раундапу на четверту добу культивування ($3,30 \pm 0,28$ г/л).

Стимулювання росту сульфатвідновлювальних бактерій за впливу гербіцидів на основі гліфосату може бути зумовленим здатністю цих бактерій розкладати молекули гліфосату до простих органічних речовин із подальшим використанням їх як донорів електронів і джерел карбону, нітрогену чи фосфору, або спричинятися тим, що гербіциди містять незначну кількість сульфат-іонів, як це показано для бактерій *Desulfotomobium* sp. CRR3 (Sholiak, 2014). Адже до складу Раундапу входять натрій сульфат, амоній сульфат, які можуть бути використані дослідженими бактеріями як акцептори електронів у процесі сульфатного дихання.

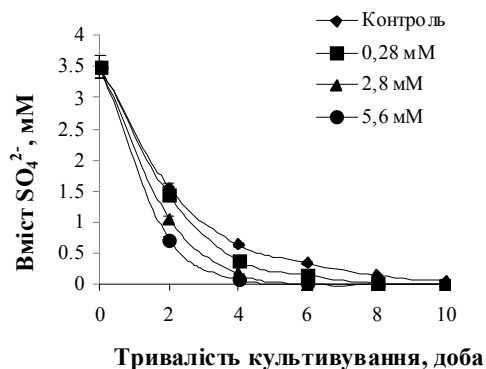
Сульфатвідновлювальні бактерії *D. desulfuricans* IMB К-6 за наявності сульфатів і органічних сполук у середовищі здійснюють дисиміляційну сульфатредукцію. Вони використовують сульфат як кінцевий акцептор електронів, відновлюючи його до гідроген сульфід (Peretyatko et al., 2006; Kushkevych, 2012).

Під час вирощування бактерій у середовищі, яке не містило гербіцидів, найінтенсивніший процес відновлення сульфат-іонів спостерігали упродовж перших чотирьох діб, унаслідок чого вміст сульфат-іонів у середовищі знизився на другу добу у 2,4 раза, на четверту – у 3,4 раза (рис. 2 А, Б). За цих умов у середовищі виявлено максимальну концентрацію гідроген сульфід (приблизно 2,1 мМ на четверту добу) (рис. 3).

Аналогічну закономірність виявлено і за умови додавання до середовища культивування гербіцидів. Внесення гербіцидів у середовище культивування стимулювало процес відновлення сульфат-іонів і утворення гідроген сульфід сульфатвідновлювальними бактеріями *D. desulfuricans* IMB К-6 (рис. 2, 3).



А



Б

Рис. 2. Вміст сульфат-іонів у середовищі Кравцова – Сорокіна у процесі вирощування *D. desulfuricans* IMB К-6 за впливу Урагану (А) та Раундапу (Б)

За впливу Урагану вміст сульфат-іонів у середовищі культивування бактерій *D. desulfuricans* IMB К-6 уже на другу добу знизився у 2,3, 3,1 та 4,5 раза, за впливу Раундапу – у 2,4, 3,3 та 4,9 раза відповідно до кон-

центрації гербіциду. Вміст гідроген сульфід у середовищі з Ураганом зріс, порівняно з контролем, у 1,2–1,4 раза, із Раундапом – у 1,2–1,3 раза відповідно до концентрації гербіциду.

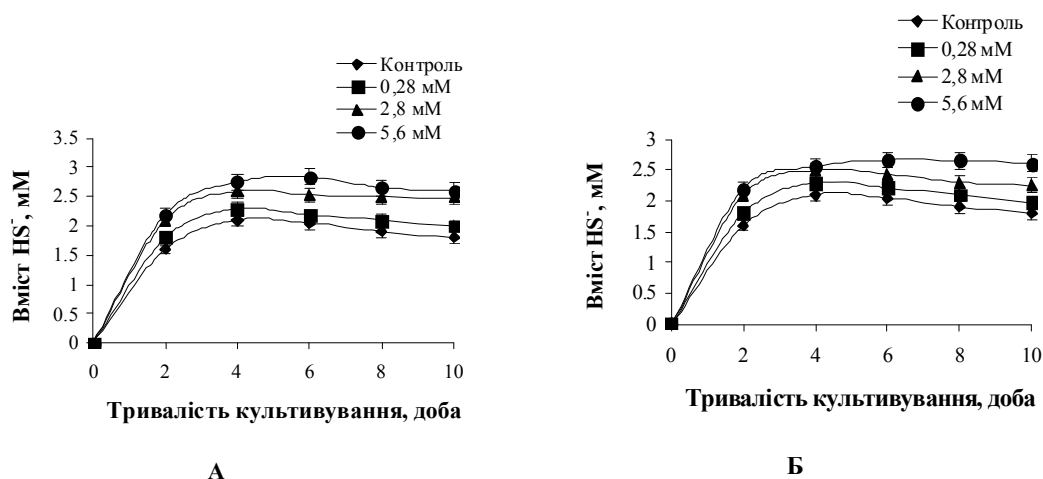


Рис. 3. Вміст гідроген сульфід у середовищі Кравцова – Сорокіна у процесі вирощування *D. desulfuricans* IMB K-6 за впливу Урагану (А) та Раундапу (Б)

Подібні зміни кривих росту та процесу дисиміляційної сульфатредукції за впливу гербіцидів на основі гліфосату можуть свідчити про наявність у їх складі сульфат-іонів, які стимулюють ріст *D. desulfuricans* IMB K-6 та відновлення клітинами сульфат-іонів до гідроген сульфід. Утворений сульфатвідновлювальними бактеріями гідроген сульфід високотоксичний для живих організмів (Beauchamp et al., 1984; Peretyatko et al., 2006; Kushkevych, 2012). Механізм дії гідроген сульфід полягає у пошкодженні метало- та дисульфідумісних протеїнів, деполаризації мітохондріальних мембран еукаріот тощо. Гідроген сульфід пригнічує люмінесценцію у *Vibrio fischeri*, інгібує ріст архебактерій та ціанобактерій (Beauchamp et al., 1984). Тому неконтрольоване внесення у ґрунт гербіцидів може мати непередбачуваний негативний вплив на ґрунтову мікробіоту більшою мірою через стимулювальний вплив їх складових на сульфідогенну активність бактерій, ніж через токсичність діючої речовини препаратів (гліфосату). Зростання чисельності сульфатвідновлювальних бактерій може бути індикатором погіршення екологічного стану біогеоценозів унаслідок антропогенного навантаження.

Висновки

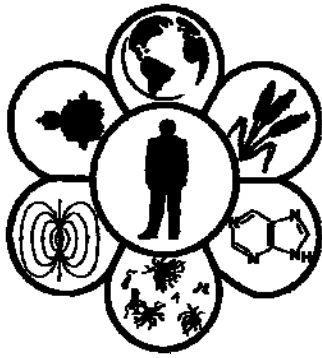
За умови інтенсивного застосування гербіцидів виникає небезпека накопичення у ґрунті їх діючої речовини гліфосату чи його метаболітів, які можуть впливати на життєдіяльність деяких груп мікроорганізмів. Внесення у середовище препаратів на основі гліфосату стимулювало нагромадження біомаси сульфатвідновлювальними бактеріями *D. desulfuricans* IMB K-6. Досліджені мікроорганізми відновлювали сульфат-іони до гідроген сульфід не лише за впливу рекомендованих до використання концентрацій гербіцидів, а й удвічі вищих. Стимулювання процесу дисиміляційної сульфатредукції *D. desulfuricans* IMB K-6 за впливу Урагану та Раундапу пов'язане, на нашу думку, з наявністю сульфатів у складі цих препаратів. Утворений сульфатвідновлювальними бактеріями гідроген сульфід може мати більший негативний вплив на ґрунтову мікробіоту, ніж гліфосат та продукти його розщеплення.

Бібліографічні посилання

- Beauchamp, R.O.Jr., Bus, J.S., Popp, J.A., 1984. A critical review on the literature on hydrogen sulfide toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 13, 25–97.
- Belokon, S.V., Sklyar, V.S., 2012. Genotoksychnyj efekt gerbicydiv i ploduchist' *Drosophila melanogaster* [Genotoxic effect of herbicides and fecundity of *Drosophila melanogaster*]. *Visn. Odes. Nac. Univ. Ser. Biol.* 17(4), 57–61 (in Ukrainian).
- Butorova, O.P., Kozlova, A.V., Gerasimchuk, A.L., 2010. Obrazovanie sul'fidov medi *Desulfovibrio sp.* R2 v optimal'nyh temperaturnyh uslovijah [For motion of copper sulfides by *Desulfovibrio sp.* R2 under optimal temperature conditions]. *Vest. Tom. Gos. Univ.* 2, 19–28 (in Russian).
- Gudz, S.P., Hnatysh, S.O., Yavorska, G.V., Bilinska, I.S., Borsukevych, B.M., 2014. *Praktykum z mikrobiologii'* [Workshop on microbiology]. Lviv. Nac. Univ. imeni Ivana Franka. Ser. Biol. Stud., Lviv (in Ukrainian).
- Evans, D.D., Batty, M.J., 1986. Effects of high dietary concentrations of glyphosate on a species of bird, marsupial and rodent indigenous to Australia. *Env. Toxicol. Chem.* 5, 399–401.
- Kushkevich, I.V., 2012. Sul'fatvidnovljuval'ni bakterii' kyshechnyky lyudyny. I. Dysymiljacijne vidnovlennja sul'fatu [Sulfate-reducing bacteria of human intesting. I. Dissimilatory sulfate reduction]. *Boil. Stud.* 6(1), 149–180 (in Ukrainian).
- Kuznetsova, E.M., Chmil, V.D., 2001. Glifosat: Povedenie v okruzhajushhej srede i urovni ostatkov [Glyphosate: Environmental fate and levels of residues]. *Sovremennye Problemy Toksikologii* 1, 87–95 (in Russian).
- Lund-Hoie, K., Friestad, N.O., 1986. Photodegradation of the herbicide glyphosate in water. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 723–729.
- Nedopytanska, N.M., 2011. Problema kancerogennoi' nebezpeky glifosatu: Novi dani [The problem of cancerogenous danger of glyphosate: New data]. *Suchasni Problemy Toksykologii'* 1–2, 5–15 (in Ukrainian).
- Nikolaichik, Y.A., Guschinskaya, N.N., Evtushenkov, A.N., 2011. Konstruirovaniye variantov bakterial'nogo gena APO A so snizhennoj chuvstvitel'nost'ju k gerbicide glifosatu [Construction of bacterial gene ARO A variants with lower sensitivity to herbicide glyphosate]. *Tr. Bel. Gos. Univ.* 6(1), 174–180 (in Russian).
- Peretyatko, T.B., Hnatysh, S.O., Gudz, S.P., 2006. Sul'fatvidnovljuval'ni bakterii' vodojm Javorivskogo Sirkovogo Ro-

- dovyshha [Sulfate-reducing bacteria from Yavoriv Sulfur Deposit Reservoir]. Mikrob. Zh. 68(5), 87–93 (in Ukrainian).
- Petrova, O.E., Davydova, M.N., Tarasova, N.B., Muhytova, F.K., 2003. Sul'fatreducirujushhie bakterii v biologicheskoy pererabotke promyshlennyh othodov, sodержashhiih nitrocelljulozu [Sulfate-reducing bacteria in biological processing of industrial wastes containing nitrocellulose]. Vest. Mosk. Univ. Ser. Him. 44(1), 43–45 (in Russian).
- Poznyak, V., 2011. Total'nyj vynyshhuvach [Total destroyer]. Agrobiznes S'ogodni 9, 42–43 (in Ukrainian).
- Saratovskich, E.A., Glazer, V.M., Kostromina, N.Y., Kotelevtsev, S.V., 2007. Genotoksichnost' pesticidov v teste Jejmsa i ih sposobnost' k obrazovaniju kompleksov s DNK [Genotoxicity of pesticides in Ames test and its ability to formation of complex with DNA]. Ekol. Genet. 5(3), 46–54 (in Russian).
- Sholiak, K., Hnatush, S, Peretyatko, T., Gudz, S., 2014. Vidnovlennja hromat- i sul'fat-ioniv sul'fatvidnovljuval'nyh bakterijamy *Desulfomicrobium sp. CRR3* za vplyvu organichnyh rehovyn – zabrudnjuvachiv navkolyshn'ogo seredovyshha [Chromate- and sulfate-iones reducing bacteria *Desulfomicrobium sp. CRR3* under the influence of various organic compounds – environmental pollutants]. Visn. Lviv. Univ. Ser. Biol. 65, 266–272 (in Ukrainian).
- Shushkova, T.V., Ermakova, I.T., Sviridov, A.V., Leontevsky, A.A., 2012. Biodestrukcija glifosata pochvnyimi bakterijami: Optimizacija processa kul'tivirovanija i sposob hranenija aktivnoj biomassy [Biodestruction of glyphosate by soil bacteria: Optimization of cultivation process and method of active biomass storage]. Mikrobiol. 81(1), 48–55 (in Russian).

Надійшла до редколегії 26.02.2015



УДК 575.113.2:616.858-008.6+616.8-056.76

Генетические факторы риска развития болезни Паркинсона в Украине

А.К. Коляда¹, Т.В. Плетнева^{1,2}, А.С. Соседко³, М.А. Чивликлий¹, А.М. Вайсерман¹, И.Н. Карабань¹

¹Государственное учреждение «Институт геронтологии им. Д.Ф. Чеботарева НАМН Украины», Киев, Украина

²Частное высшее учебное заведение «Киевский медицинский университет УАИМ», Киев, Украина

³Институт высоких технологий Киевского национального университета им. Т. Шевченко, Киев, Украина

Обследовано 516 человек, из которых 300 составляли контрольную группу (средний возраст $67,0 \pm 0,4$ лет, 200 мужчин и 100 женщин), а 216 – пациенты с диагностированной болезнью Паркинсона (БП) (средний возраст $65,0 \pm 0,7$ лет, 116 мужчин и 100 женщин). Проанализированы частоты полиморфных вариантов генов CYP1A1, GSTM1 и APOE в группе пациентов и группе неврологически здоровых людей сопоставимого возраста. Поскольку риск развития болезни Паркинсона зависит как от генетических факторов, так и от факторов окружающей среды, процессы биотрансформации ксенобиотиков играют немаловажную роль в патогенезе заболевания. Гены CYP1A1 и GSTM1 определяют белки, участвующие в метаболизме ксенобиотиков. Продукт гена APOE участвует в процессах старения нейронов, что также играет немаловажную роль как фактор риска заболевания. Исследуемые группы отличались частотами генотипов по гену CYP1A1. При этом OR для аллеля А был 1,76. Для гена GSTM1 показано влияние нулевого генотипа на риск развития болезни. Критерий соотношения шансов составил 1,72. Также установлено наличие повышенного риска развития заболевания у носителей $\epsilon 4$ аллеля гена APOE. OR для аллеля $\epsilon 4$ составил 1,97.

Ключевые слова: ген цитохрома P450; ген аполипопротеина E; ген глутатион-S-трансферазы

Genetic risk factors for Parkinson's disease in Ukraine

A.K. Koliada¹, T.V. Pletneva^{1,2}, A.S. Sosedko³, M.A. Chyvlyklyj¹, A.M. Vaiserman¹, I.N. Karaban¹

¹D.F. Chebotarev State Institute of Gerontology NAMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

²“Kyiv Medical University of UAFM” Private Higher Educational Establishment, Ukraine

³Institute of High Technologies, Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

The paper focuses on the genetic risk factors for Parkinson's disease (PD) such as polymorphisms in genes CYP1A1, GSTM1 and APOE. A total number of 516 people were examined. 300 persons were in the control group (mean age $67,0 \pm 0,4$ years; 200 males and 100 females) and 216 persons were patients with PD (mean age $65,0 \pm 0,7$ years, 116 males and 100 females). Whole blood samples collected from each person were genotyped using PCR-RFLP. Amplification and restriction results were assessed by conducting vertical agarose gel electrophoresis. The study analyzed marker c.2452C>A in the CYP1A1 gene. In the control group, allele C frequency was 0.79, and allele A frequency – 0.21. Genotype frequencies were: CC – 0.61, AC – 0.36, AA – 0.03. In the group of patients alleles C and A frequencies were 0.64 and 0.36 correspondingly. Genotype frequencies were: CC – 0.35, AC – 0.58, AA – 0.07. There was a significant difference between both groups in allele A frequency. It is considered that 0/0 genotype for the GSTM1 gene is a risk factor for PD. In the controls, +/+ and 0/0 genotypes frequencies were 0.67 and 0.33 correspondingly. In the group of patients +/+ genotype frequency was 0.55 and 0/0 genotype frequency – 0.45. The difference was statistically significant. In the control group genotype frequencies for the APOE gene were 0.715 (E3/E3), 0.077 (E3/E4), 0.009 (E4/E4), 0.167 (E2/E3), 0.031 (E2/E4) and 0.000 (E2/E2). In the group of patients with PD they

Государственное учреждение «Институт геронтологии им. Д.Ф. Чеботарева НАМН Украины», ул. Вышгородская, 67, Киев, 04114, Украина

D.F. Chebotarev State Institute of Gerontology NAMS of Ukraine, Vyshgorodskaya str., 67, Kyiv, 04114, Ukraine

Частное высшее учебное заведение «Киевский медицинский университет УАИМ», ул. Льва Толстого, 9, Киев, 01004, Украина
Private Higher Educational Establishment «Kyiv Medical University of UAFM», Lva Tolstogo str., 9, Kyiv, 01004, Ukraine

Институт высоких технологий Киевского национального университета им. Т. Шевченко, просп. Глушкова, 4-г, Киев, 02033, Украина
Institute of High Technologies, Taras Shevchenko National University of Kyiv, Glushkova ave., 4-g, Kyiv, 02033, Ukraine
E-mail: alex.genetic@gmail.com

were 0.634 (E3/E3), 0.148 (E3/E4), 0.032 (E4/E4), 0.157 (E2/E3), 0.023 (E2/E4) and 0.000 (E2/E2). E3/E4 genotype frequency was significantly higher in the group of patients with PD than in the control group. Pathogenic allele c.2452C>A of the CYP1A1 gene is associated with increased risk of PD (OR = 1.72). 0/0 genotype carriers have higher risk to develop PD (OR = 1.72). Allele ϵ 4 of the APOE gene may be associated with increased risk of PD. Risk of the disease is higher in ϵ 2 allele carriers (OR = 2.35) and ϵ 4 allele carriers (OR=1.97). People with genotype E4/E4 have chances to be affected by PD 3.48 times higher (OR = 3.48). Associations revealed in the different human populations between genetic factors and PD may vary that is associated with the genetic heterogeneity and proportion of environmental factors which affect people. Despite the results are sometimes controversial, they can be helpful in developing DNA-tests for early diagnosis of PD.

Keywords: cytochrome P450 gene; apolipoprotein E gene; glutathione-S-transferase gene

Введение

Патогенез болезни Паркинсона, как и других нейрогенных заболеваний, обусловлен комплексом патологических процессов, включающих митохондриальную дисфункцию, оксидативный и протеолитический стрессы, локальное воспаление, апоптоз (Karaban', 2011; Carelli et al., 2015). В развитии болезни Паркинсона определенную роль играет и лизосомальная дисфункция (Bae et al., 2015). Сейчас известно, что БП является распространённым нейродегенеративным заболеванием, которое поражает одного человека из ста в возрастной группе старше 60 лет. Исследователи прогнозируют значительное увеличение числа больных БП в ближайшее десятилетие (Suhoverskaja, 2011). Предполагается, что в основе развития заболевания лежат возрастные, генетические и средовые факторы. На степень проявления симптомов влияют не только окружающая среда, но и питание (Satake et al., 2009; Gopalai et al., 2014), в частности, такие вещества как витамины, флавоноиды, кофеин, алкоголь и др. (Agim and Cannon, 2015).

В настоящее время БП рассматривается как мультифакториальное заболевание, на развитие которого влияют разнообразные генетические особенности, а также факторы окружающей среды (Verstraeten et al., 2015). До 60% идиопатических случаев БП может быть объяснено влиянием генотипа (Hamza and Payami, 2010). Однако до сих пор до конца не установлена точная молекулярная структура наследственных форм болезни Паркинсона (Abramuycheva et al., 2012).

В то время как при нормальном старении отмечается дегенерация меланинсодержащих нейронов черной субстанции, иногда обнаруживаются тельца Леви, снижается уровень стриарного дофамина и дофаминергических рецепторов (Tuckocki et al., 2013), у больных БП наблюдается прогрессирующая гибель нейронов, вырабатывающих дофамин, и образование большого количества телец Леви. В связи с этим у паркинсоников синтезируется недостаточное количество дофамина, вследствие чего базальные ганглии влияют на кору головного мозга, нарушая деятельность двигательных центров, центров речи, зрения и памяти (Jahno and Shtul'man, 2001). Таким образом, дофаминергическая система играет важную роль в осуществлении социального взаимодействия человека (Straulino et al., 2015). Поскольку процессы, происходящие в головном мозге при нормальном старении и при БП, во многом сходны, существует мнение, что болезнь Паркинсона может быть локально выраженным старением популяций клеток, которые наиболее уязвимы для этого процесса (имеют большое количество синапсов и митохондрий, немиелинизированные аксоны и др.) (Rodriguez et al., 2015).

Проведено множество эпидемиологических исследований с целью выяснить влияние факторов окружающей среды и образа жизни на развитие болезни. Риск развития БП растет при длительном контакте с пестицидами (гербициды, инсектициды) (Punia et al., 2011). Американские исследователи выяснили, что для фермеров, которые используют пестициды, риск заболевания БП повышается на 70%, а для лиц, которые используют инсектициды для борьбы с домашними насекомыми, – в два раза (Williams, 1991).

БП имеет неравномерный характер распределения в разных географических районах, что может быть связано как с трудностями диагностики заболевания в развивающихся странах, так и с условиями окружающей среды. Наблюдался более высокий уровень заболеваемости БП в сельской местности, что можно объяснить применением различных удобрений (Паркват, Ротенон), а также длительным употреблением воды, насыщенной соединениями железа. Такие химические соединения, как известно, приводят к уменьшению активности процессов окислительного фосфорилирования, возникновению окислительного стресса и гибели дофаминергических нейронов (Karaban', 2011).

Так как в развитии БП важную роль играют генетические факторы, ведется активный поиск генов и их аллелей, связанных с развитием болезни. В данное время определено около 16 генов-кандидатов, полиморфизмы которых ассоциированы с БП (Bagueva, 2009). Наиболее важными в патогенезе семейных случаев болезни Паркинсона считаются гены SNCA, PARK2, PINK1, PARK7 и LRRK2, для которых обнаружены около 500 вариантов ДНК (Nuytemans et al., 2010). Также выделены более 25 генетических факторов риска БП (Verstraeten et al., 2015). Однако исследователи продолжают поиск мутаций, которые могут быть связаны с разными звеньями патогенеза заболевания (Giljazova, 2004).

Одной из характерных черт нейродегенеративных заболеваний, в том числе и БП, является митохондриальная дисфункция, которая может привести к возникновению окислительного стресса, что, в свою очередь, приводит к повреждению нейронов (Fischer and Maier, 2015). Важную роль при окислительном стрессе играет эффективность устранения супероксидных радикалов, детерминированная генетически. Большинство исследований сфокусированы на источнике формирования свободных радикалов в мозге пациентов с БП, в то время как изучению восприимчивости клеток к перекислению и изменениям липидного состава уделяется недостаточно внимания. Состав жирных кислот в определенных участках коры значительно различается у здоровых людей и у людей с болезнью Паркинсона (Abbott et al., 2015).

Для большинства генов метаболизма ксенобиотиков не обнаружено четкой связи с развитием БП или эта связь слабая (Alonso-Navarro et al., 2014). Чувствительность к токсинам окружающей среды, обусловленная генетически и возникающая в связи с уменьшением активности ферментов детоксикации, может играть значительную роль в патогенезе БП. Нами исследовано два гена: CYP1A1 – ген I фазы метаболизма ксенобиотиков и GSTM1 – ген, кодирующий фермент II фазы биотрансформации. CYP1A1 – один из первых найденных цитохромов, который метаболизирует обширный спектр веществ, включая такой известный канцероген как бензпирен (Baranov et al., 2000). Изучаемый нами полиморфизм гена обусловлен точечной мутацией в седьмом экзоне, приводящей к замене изолейцина на валин в полипептидной цепи белка.

Ген GSTM1 относится к семейству генов глутатион-S-трансфераз, принимающих участие в процессе детоксикации мутагенов и других ксенобиотиков. Глутатион-S-трансфераза катализирует взаимодействие глутамата с атомами углерода, азота, серы и кислорода в широком спектре соединений.

Не менее интересной представляется роль липидов в патогенезе заболевания. Первые данные, свидетельствующие о возможной связи БП и липидного обмена, получены в результате ретроспективного исследования индекса массы тела у пациентов с БП в финской когорте (Hu et al., 2008). В другом крупном проспективном исследовании установлено, что повышенное потребление холестерина повышает риск развития БП (Vance, 2012). Эти данные могут говорить о связи метаболизма липидов с патогенезом заболевания. Поэтому интересным для нас видится изучение полиморфизма генов (особенно гена аполипопротеина E), вовлеченных в липидный обмен в выборках пациентов с нейродегенеративными процессами.

Предположение о важной роли гена аполипопротеина E (APOE) в механизмах старения нейронов обусловило многочисленные исследования, направленные на анализ генетических ассоциаций между различными полиморфными вариантами гена APOE и некоторыми нейродегенеративными заболеваниями (Mata et al., 2014; Bras et al. 2014). APOE – богатый аргинином гликопротеид, состоящий из 299 аминокислотных остатков, ген которого содержит полиморфизм в 4-м экзоне, обусловленный двумя нуклеотидными заменами, что приводит к заменам аминокислот цистеина и аргинина в положениях 112 и 158 полипептидной цепи. Предполагается, что изоформа белка, экспрессируемая с E4 аллеля, обладает более выраженным амилоидогенным потенциалом благодаря высокому сродству к бета-амилоиду (Schmechel et al., 1993; Weisgraber et al., 1994; Schellenberg, 1995).

Цель нашего исследования – оценить частоту встречаемости полиморфизмов генов CYP1A1, GSTM1 и APOE, являющихся факторами риска развития БП, в группе пациентов и группе неврологически здоровых людей.

Материал и методы исследований

Генотипирование проводили методом ПДРФ-ПЦР. Использовали образцы крови 216 пациентов с БП (сред-

ний возраст $65,0 \pm 0,7$ лет, 116 мужчин и 100 женщин) и контрольной группы из 300 человек (средний возраст $67,0 \pm 0,4$ лет, 200 мужчин и 100 женщин). Выделение ДНК проводили из цельной крови с помощью набора «ДНК-Сорб В» (Россия). Амплификацию изученных локусов осуществляли с использованием сайт-специфических праймеров на амплификаторе «CorbettResearch PCR ThermalCycler» производства компании «Corbett LifeScience». Рестрикцию полученных ампликонов проводили в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя специфических рестриктаз (Fermentas). Результаты амплификации и рестрикции оценивали путем проведения вертикального электрофореза в 3% агарозном геле.

Математическую обработку результатов исследования проводили с использованием пакетов статистических программ Statistica 5.5 [StatSoft Inc., USA]. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателей отношения шансов (odds ratio, OR). Фактическую (H_e) и теоретическую (H_o) гетерозиготность популяций вычисляли при помощи метода Россета – Раймонда. Панмиктичность популяции рассчитывали по формуле равновесия Харди – Вайнберга. Для определения разницы между частотами аллелей в контрольной и опытной группах использовали критерий χ^2 .

Результаты и их обсуждение

Изучены полиморфные маркеры в трех генах: CYP1A1, GSTM1 и APOE. Первый исследованный ген – CYP1A1 – отвечает за синтез цитохрома P450 – белка, вовлеченного в первую фазу биотрансформации ксенобиотиков (Gasser, 2005). Проведено генотипирование по полиморфному маркеру с.2452C>A. В контрольной группе частота аллеля C составила 0,79, частота аллеля A – 0,21, а частоты генотипов – 0,61 (CC), 0,36 (AC) и 0,03 (AA) (табл.). В группе пациентов с БП частота встречаемости аллелей C и A составила – 0,64 и 0,36 соответственно, а частоты встречаемости генотипов – 0,35 (CC), 0,58 (AC) и 0,07 (AA). Различие между частотой встречаемости аллеля A в контрольной и исследованной группах составляет 15,4%. Проверка по критерию χ^2 показала, что разница между контрольной и опытной группами существует ($df = 2$, $P < 0,05$), а разница между теоретическими и практическими значениями верна. То есть популяция непанмиктическая, что указывает на репрезентативность выборки. Проверка популяции на инбридинг дала такие результаты: значение F меньше 0 ($F(k) = -0,096$, $F(pd) = -0,26$), значит, инбридинг в популяции отсутствовал. После чего обе популяции подлежали проверке на гетерозиготность. Тест Россета – Раймонда показал, что фактическая гетерозиготность популяции (H_e) составляет 45,4%, а теоретическая (H_o) – 38,4%. Разница статистически верна, что подтверждает малая дисперсия ($V = 0,0004$). Таким образом, доказано влияние патогенного аллеля на развитие болезни. Риск заболеваемости при наличии аллеля A составляет $OR = 1,72$ (95% CI: 1,30, 2,39; $P = 0,003$).

Наши данные подтверждают ранее полученные результаты японских ученых, изучивших 126 пациентов с БП и 176 здоровых людей. Частота аллеля A была зна-

чительно выше у пациентов, чем в контроле (44,4% и 34,9% соответственно). Риск развития БП у пациентов с генотипом АА был в 6,54 раза выше, чем у носителей нормального генотипа СС ($P < 0,001$). В то же время при изучении связи БП с полиморфизмом гена CYP1A1 среди жителей Китая некоторыми исследователями не было обнаружено достоверных различий (Wang et al., 2000; Chan et al., 2002). В британском исследовании при генотипировании 176 больных со спорадической формой БП и 30 пациентов с семейной формой заболевания по сравнению с контрольной группой также не выявили различий (Nicholl et al., 1999).

Гены семейства глутатион-S-трансфераз могут принимать участие в патогенезе БП, поскольку данные ферменты являются антиоксидантами (Hayes and Strange, 1995), а при БП важную роль играет устранение ферментами супероксидных радикалов и, кроме того, ген GSTM1, как полагают, связан с метаболизмом дофамина (Baez et al., 1997), обмен которого особенно нарушается при патологии. Поэтому исследуемым нами геном был GSTM1, кодирующий фермент глутатион-S-

трансферазу. Этот энзим принимает участие во второй фазе детоксикации ксенобиотиков. Принято выделять два генотипа по данному гену (+/+ и 0/0), при этом считается, что носительство 0/0 генотипа повышает риск различных заболеваний дыхательных путей, невынашивания беременности, развития опухолей, а также повышается вероятность развития БП (Ahmadi et al., 2000; Carlsten et al., 2008). Результаты генотипирования показали, что частота встречаемости генотипа +/- в контрольной группе составила 0,67, а генотипа 0/0 – 0,33. При этом у группы пациентов с БП показатели значительно отличались: встречаемость носителей аллелей +/- и 0/0 составила 0,55 и 0,45 соответственно. Достоверность разницы проверялась критерием χ^2 ($df = 2$, $P < 0,05$). По результатам анализа соответствия фактических и теоретических частот установлено, что в данной популяции имеет место случайное распределение генотипов в соответствии с законом равновесия Харди – Вайнберга. Также подсчитано, что риск заболеваемости у носителей генотипа 0/0 составляет $OR = 1,72$ (95% CI: 1,20, 2,49; $P = 0,0032$).

Таблица

Частоты встречаемости генотипов и аллелей генов в исследуемых выборках

Ген	Полиморфизм	Генотип	Контроль, число людей (%)	БП, число людей (%)	χ^2 ($df = 2$), P	OR (95% CI), границы, P
CYP1A1	1382C>A	CC	184 (61,3)	75 (34,7)	3,69 P = 0,0023	1,76 (1,30–2,39), P = 0,0030
		AC	108 (36,0)	26 (58,3)		
		AA	8 (2,7)	15 (6,9)		
GSTM1	+/, 0/0	+/+	146 (67,5)	164 (54,7)	64,44 P = 0,008	1,72 (1,20–2,49), P = 0,0032
		0/0	70 (32,5)	134 (45,3)		
APOE	E4/E4	E 3/3	231 (71,5)	137 (63,4)	54,55, P = 0,007	1,97 (1,23–3,16), P = 0,0470
		E 3/4	25 (7,7)	32 (14,8)		
		E 4/4	3 (0,9)	7 (3,2)		
		E 2/3	54 (16,7)	34 (15,7)		
		E 2/4	10 (3,1)	6 (2,8)		
		E 2/2	0 (0,0)	0 (0,0)		

В большинстве работ зарубежных авторов ассоциации нулевого генотипа с развитием БП обнаружено не было (Tison et al., 1994; Bandmann et al., 1997). В исследовании же Ahmadi et al. (2000) выявлено, что у пациентов с нормальным генотипом +/- возраст проявления заболевания был значительно выше (68 лет), в то время как пациенты с генотипом 0/0 имели более ранний возраст манифестации заболевания (57 лет) (Ahmadi et al., 2000).

Изучаемый нами ген APOE кодирует важный белок в метаболизме нервной ткани – аполипопротеин E, который отвечает за миелинизацию нервных волокон. Синтез этого белка обуславливает экспрессия гена APOE. Полиморфизм E4/E4 этого гена приводит к нарушению нервной проводимости, а также считается, что аллель $\epsilon 4$ играет модифицирующую роль в развитии таких дегенеративных заболеваний как болезнь Альцгеймера и БП, но данные о роли аллеля $\epsilon 4$ в развитии болезни Паркинсона до сих пор противоречивы (Harhangi et al., 2000; Tan et al., 2000). Частоты генотипов по гену APOE контрольной группы были представлены такими значениями – 0,715 (E3/E3), 0,077 (E3/E4), 0,009 (E4/E4), 0,167 (E2/E3), 0,031 (E2/E4) и 0,000 (E2/E2). А для группы пациентов с БП – 0,634 (E3/E3), 0,148 (E3/E4), 0,032 (E4/E4), 0,157 (E2/E3), 0,023 (E2/E4) и 0,000 (E2/E2). Частота встречае-

мости носителей генотипов E3/E4 была существенно выше в группе пациентов с БП, что, возможно, свидетельствует о связи редкого аллеля $\epsilon 4$ с риском развития БП. Проверка на гетерозиготность популяции по критерию Россета – Раймонда показала, что гетерозиготность контрольной группы меньше, чем группы пациентов ($H_0 = 0,2987 \pm 0,0291$ и $H_e = 0,4801 \pm 0,0291$ соответственно), что дает основания полагать, что гетерозиготность влияет на формирование исследуемого признака. Различия достоверны по критерию χ^2 ($df = 2$, $P < 0,05$).

Исходя из полученных нами результатов, риск заболевания повышен у носителей аллеля $\epsilon 2$ ($OR = 2,35$, 95% CI: 1,23, 3,16; $P = 0,0047$) и $\epsilon 4$ ($OR = 1,97$, 95% CI: 1,23, 3,16; $P = 0,0047$). У носителей генотипа E4/E4 шансы развития заболевания повышены в 3,48 раза ($OR = 3,48$, 95% CI: 1,23, 3,16; $P = 0,0047$).

Литературные данные по анализу связи БП с геном APOE противоречивы. По некоторым данным, аллель $\epsilon 2$ является генетическим фактором повышенного риска БП (Harhangi et al., 2000). В исследовании, проведенном во Франции, прогенотипировано 57 пациентов с семейной формой и 46 со спорадической формой БП. Частота аллеля $\epsilon 4$ была одинаковой в контрольной и опытной группах, в то время как аллель $\epsilon 2$, был значительно бо-

лее частым среди спорадической формы БП, чем в контроле. Другая группа исследователей (Tang et al., 2002) при изучении 68 случаев спорадической БП и 160 контрольных случаев обнаружила, что в популяции Китая генотип E 2/4 является генотипом риска для развития БП (OR = 12,62). Анализ частот аллелей и генотипов в данном гене у больных с БП в финской популяции не выявил каких-либо достоверных отличий по сравнению с группой неврологически здоровых пациентов (Eerola et al., 2002).

Зафиксированные в одних популяциях генетические ассоциации с БП не во всех случаях могут быть подтверждены при исследовании других популяций, что, вероятно, связано с существованием межпопуляционных различий аллельных частот исследованных генов, а также с отличиями удельного веса разных генетических и внешних факторов в патогенезе БП (Williams et al., 1991). Хотя результаты ассоциативных исследований иногда спорны, они позволяют выяснить, какой вклад делают определенные гены и полиморфные локусы в манифестацию и развитие болезни, а также помогают разработать набор ДНК-тестов для медико-генетического консультирования в разных группах (Punia et al., 2011).

Выводы

В результате исследования среди пациентов с болезнью Паркинсона обнаружены носители полиморфных аллелей по генам CYP1A1, GSTM1 и APOE.

Контрольная и опытная группы отличались частотами генотипов по гену CYP1A1. В контроле частоты генотипов составили 2,67% (AA), 36,00% (AC), 61,33% (CC), а в опытной группе – 6,94% (AA), 58,33% (AC) и 34,72% (CC). При этом OR для аллеля A был равен 1,76 (95% CI: 1,30, 2,39; P = 0,003).

Для гена GSTM1 доказано влияние мутантного нулевого генотипа на риск развития болезни. В контрольной группе частота встречаемости генотипа 0/0 была ниже (32,5% (0/0), 67,5% (+/+)), чем в опытной (45,3% (0/0), 54,7% (+/+)). Критерий соотношения шансов для нулевого генотипа составил 1,72 (95% CI: 1,20, 2,49, P = 0,0032).

Исследование мутаций гена APOE показало значительную разницу частот генотипов контрольной группы (0,92% (E4/E4), 3,09% (E2/E4), 7,73% (E3/E4), 16,7% (E2/E3), 71,51% (E3/E3)) и опытной (2,27% (E2/E4), 3,24% (E4/E4), 14,81% (E3/E4), 15,74% (E2/E3), 63,42% (E3/E3)). OR для аллеля ε4 составил 1,97 (95% CI: 1,23, 3,16; P = 0,047).

Библиографические ссылки

Abbott, S.K., Jenner, A.M., Spiro, A.S., Batterham, M., Halliday, G.M., Garner, B., 2015. Fatty acid composition of the anterior cingulate cortex indicates a high susceptibility to lipid peroxidation in Parkinson's disease. *J. Parkinsons Dis.* 5(1), 175–185.

Abramycheva, N.J., Fedotova, E.J., Stepanova, M.S., Illarionovskiy, S.N., 2012. Mutacionnyj skринing gena GBA s analizom klinicheskikh fenotipov bolezni Parkinsona, associirovannyh s mutacijami [Mutational screening of the GBA gene with the analysis of clinic phenotypes of Parkinson's disease associated with the mutations]. *Nauchnyj Centr Nevrologii RAMN (Moskva). Annotirovannye Doklady, Chast' 1* (in Russian).

Agim, Z.S., Cannon, J.R., 2015. Dietary factors in the etiology of Parkinson's disease. *Biomed. Res. Int.* 2015:672838.

Ahmadi, A., Fredrikson, M., Jerregård, H., Akerbäck, A., Fall, P.A., Rannug, A., Axelson, O., Söderkvist, P., 2000. GSTM1 and mEPHX polymorphisms in Parkinson's disease and age of onset. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269(3), 676–680.

Alonso-Navarro, H., Jimenez-Jimenez, F.J., Garcia-Martin, E., Agundez, J.A., 2014. Genomic and pharmacogenomic biomarkers of Parkinson's disease. *Curr. Drug Metab.* 15(2), 129–181.

Bae, E.J., Yang, N.Y., Lee, C., Lee, H.J., Kim, S., Sardi, S.P., Lee, S.J., 2015. Loss of glucocerebrosidase 1 activity causes lysosomal dysfunction and α-synuclein aggregation. *Exp. Mol. Med.* 47, e153.

Baez, S., Segura-Aguilar, J., Widersten, M., 1997. Glutathione transferase catalyse the detoxication of oxidised metabolites (o-quinones) of catecholamines and may serve as an antioxidant system preventing degenerative cellular processes. *Biochem. J.* 324, 25–28.

Bagyeva, G.K., 2009. *Kliniko-geneticheskij i biohimicheskij analiz bolezni Parkinsona: Mehanizmy predraspolozhennosti, jeksperimental'nye modeli, podhody k terapii* [Clinicogenetic and biochemical analysis of Parkinson's disease: Mechanisms of predisposition, experimental models, approaches to a therapy]. *Dis. ... kand. biol. nauk, Moscow* (in Russian).

Bandmann, O., Vaughan, J., Holmans, P., Marsden, C.D., Wood, N.W., 1997. Association of a slow acetylator genotype for N-acetyltransferase 2 with familial Parkinson's disease. *Lancet* 350, 1136–1139.

Baranov, V.S., Baranova, E.V., Yvashhenko, T.E., Aseev, M.V., 2000. *Genom cheloveka y geny «predraspolozhennosty»* [Human genome and predisposition genes]. *Intermedyka, Sankt-Peterburg* (in Russian).

Bras, J., Guerreiro, R., Darwent, L., Parkkinen, L., Ansorge, O., Escott-Price, V., Hernandez, D.G., Nalls, M.A., Clark, L.N., Honig, L.S., Marder, K., Van Der Flier, W.M., Lemstra, A., Scheltens, P., Rogaeva, E., St George-Hyslop, P., Londo, E., Zetterberg, H., Ortega-Cubero, S., Pastor, P., Ferman, T.J., Graff-Radford, N.R., Ross, O.A., Barber, I., Braae, A., Brown, K., Morgan, K., Maetzler, W., Berg, D., Troakes, C., Al-Sarraj, S., Lashley, T., Compta, Y., Revesz, T., Lees, A., Cairns, N., Halliday, G.M., Mann, D., Pickering-Brown, S., Dickson, D.W., Singleton, A., Hardy, J., 2014. Genetic analysis implicates APOE, SNCA and suggests lysosomal dysfunction in the etiology of dementia with Lewy bodies. *Hum. Mol. Genet.* 23(23), 6139–6146.

Carelli, V., Musumeci, O., Caporali, L., Zanna, C., La Morgia, C., Del Dotto, V., Porcelli, A.M., Rugolo, M., Valentino, M.L., Iommarini, L., Maresca, A., Barboni, P., Carbonelli, M., Trombetta, C., Valente, E.M., Paternani, S., Giorgi, C., Pinton, P., Rizzo, G., Tonon, C., Lodi, R., Avoni, P., Liguori, R., Baruzzi, A., Toscano, A., Zeviani, M., 2015. Syndromic parkinsonism and dementia associated with OPA1 missense mutations. *Ann. Neurol.* doi: 10.1002/ana.24410.

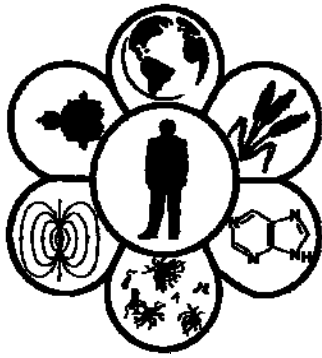
Carlsten, C., Sahoo, G.S., Frodsham, A.J., Burke, W., Higgins, J.P., 2008. Glutathione S-Transferase M1 (GSTM1) polymorphisms and lung cancer: A literature-based systematic HuGE review and meta-analysis. *Am. J. Epidemiol.* 167(7), 759–774.

Chan, D.K., Mellick, G.D., Buchanan, D.D., Hung, W.T., Ng, P.W., Woo, J., Kay, R., 2002. Lack of association between CYP1A1 polymorphism and Parkinson's disease in a Chinese population. *J. Neural. Transm.* 109(1), 35–39.

Eerola, J., Launes, J., Hellstrom, O., Tienari, P.J., 2002. Apolipoprotein E (APOE), parkin and catechol-O-methyltransferase (COMT) genes and susceptibility to sporadic Parkinson's disease in Finland. *Neurosci. Lett.* 330(3), 296–298.

- Fischer, R., Maier, O., 2015. Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: role of TNF. *Oxid. Med. Cell Longev.* doi: 10.1155/2015/610813.
- Gasser, T., 2005. Genetics of Parkinson's disease. *Curr. Opin. Neurol.* 18(4), 363–369.
- Giljazova, I.R., 2004. Molekuljarno-geneticheskoe izuchenie bolezni Parkinsona v Bashkortostane [Molecular-genetic study of Parkinson's disease in Bashkortostan]. *Dis. ... kand. biol. nauk, Ufa (in Russian).*
- Gopalai, A.A., Lim, S.Y., Chua, J.Y., Tey, S., Lim, T.T., Mohamed Ibrahim, N., Tan, A.H., Eow, G.B., Abdul Aziz, Z., Puvanarajah, S.D., Viswanathan, S., Looi, I., Lim, S.K., Tan, L.P., Chong, Y.B., Tan, C.T., Zhao, Y., Tan, E.K., Ahmad-Annuar, A., 2014. LRRK2 G2385R and R1628P mutations are associated with an increased risk of Parkinson's disease in the Malaysian population. *BioMed Res. Int.* Article ID 867321.
- Hamza, T.H., Payami, H., 2010. The heritability of risk and age at onset of Parkinson's disease after accounting for known genetic risk factors. *J. Hum. Genet.* 55, 241–243.
- Harhangi, B.S., de Rijk, M.C., van Duijn, C.M., Van Broeckhoven, C., Hofman, A., Breteler, M.M., 2000. APOE and the risk of PD with or without dementia in a population-based study. *Neurology* 54(6), 1272–1276.
- Hayes, J.D., Strange, R.C., 1995. Potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress. *Free Radic. Res.* 22(3), 193–207.
- Hu, G., Antikainen, R., Jousilahti, P., Kivipelto, M., Tuomilehto, J., 2008. Total cholesterol and the risk of Parkinson disease. *Neurology* 70(21), 1972–1979.
- Jahno, N.N., Shtul'man, D.R., 2001. Bolezni nervnoj sistemy [Diseases of nervous system]. *Medicina, Moscow (in Russian).*
- Karaban', N.V., 2011. Rol' genealogicheskikh faktorov v patogeneze BP [The role of genealogical factors in Parkinson's disease pathogenesis]. *Nevrologicheskij Zhurnal* 44(6), 23–25 (in Russian).
- Mata, I.F., Leverenz, J.B., Weintraub, D., Trojanowski, J.Q., Hurtig, H.I., Van Deerlin, V.M., Ritz, B., Rausch, R., Rhodes, S.L., Factor, S.A., Wood-Siverio, C., Quinn, J.F., Chung, K.A., Peterson, A.L., Espay, A.J., Revilla, F.J., Devoto, J., Hu, S.C., Cholerton, B.A., Wan, J.Y., Montine, T.J., Edwards, K.L., Zabetian, C.P., 2014. APOE, MAPT, and SNCA genes and cognitive performance in Parkinson disease. *JAMA Neurol.* 71(11), 1405–1412.
- Nicholl, D.J., Bennett, P., Hiller, L., Bonifati, V., Vanacore, N., Fabbrini, G., Marconi, R., Colosimo, C., Lamberti, P., Stocchi, F., Bonuccelli, U., Vieregge, P., Ramsden, D.B., Meo, G., Williams, A.C., 1999. A study of five candidate genes in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. *Neurology* 53(7), 1415–1421.
- Nuytemans, K., Theuns, J., Cruts, M., Van Broeckhoven, C., 2010. Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: A mutation update. *Hum. Mutat.* 31(7), 763–780.
- Punia, S., Das, M., Behari, M., Dihana, M., Govindappa, S.T., Muthane, U.B., Thelma, B.K., Juyal, R.C., 2011. Leads from xenobiotic metabolism genes for Parkinson's disease among north Indians. *Pharmacogenet. Genomics* 21(12), 790–797.
- Rodriguez, M., Rodriguez-Sabate, C., Morales, I., Sanchez, A., Sabate, M., 2015. Parkinson's disease as a result of aging. *Aging Cell.* doi: 10.1111/acel.12312.
- Satake, W., Nakabayashi, Y., Mizuta, I., Hirota, Y., Ito, C., Kubo, M., Kawaguchi, T., Tsunoda, T., Watanabe, M., Takeda, A., Tomiyama, H., Nakashima, K., Hasegawa, K., Obata, F., Yoshikawa, T., Kawakami, H., Sakoda, S., Yamamoto, M., Hattori, N., Murata, M., Nakamura, Y., Toda, T., 2009. Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nature Genetics* 41(12), 1303–1308.
- Schellenberg, G.D., 1995. Genetic dissection of Alzheimer disease, a heterogeneous disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92(19), 8552–8559.
- Schmechel, D.E., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Crain, B.J., Hulette, C.M., Joo, S.H., Pericak-Vance, M.A., Goldgaber, D., Roses, A.D., 1993. Increased amyloid β -peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90(20), 9649–9653.
- Straulino, E., Scaravilli, T., Castiello, U., 2015. Social intentions in Parkinson's disease patients: A kinematic study. *Cortex.* doi: 10.1016/j.cortex.2015.02.012.
- Suhoverskaja, O., 2011. Bolezn' Parkinsona i parkinsonicheskie sindromy: Diagnostika i lechenie [Parkinson's disease and parkinsonian syndromes: Diagnosis and treatment]. *Nevrologicheskij Zhurnal* 44(6), 31–34.
- Tan, E.K., Khajavi, M., Thoronby, J.L., Nagamitsu, S., Jankovic, J., Ashizawa, T., 2000. Variability and validity of polymorphism association studies in Parkinson's disease. *Neurology* 55(4), 533–538.
- Tang, G., Xie, H., Xu, L., Hao, Y., Lin, D., Ren, D., 2002. Genetic study of apolipoprotein E gene, alpha-1 antichymotrypsin gene in sporadic Parkinson disease. *Am. J. Med. Genet.* 114(4), 446–449.
- Tison, F., Coutelle, C., Henry, P., Cassaigne, A., 1994. Glutathione-S-transferase (class mu) phenotype in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 9, 117–118.
- Tyckocki, T., Kornakiewicz, A., Mandat, T., Nauman, P., 2013. Pain perception in patients with Parkinson's disease. *J. Clin. Neurosci.* 20(5), 663–666.
- Vance, J.E., 2012. Dysregulation of cholesterol balance in the brain: Contribution to neurodegenerative diseases. *Dis. Model. Mech.* 6(5), 746–755.
- Verstraeten, A., Theuns, J., Van Broeckhoven, C., 2015. Progress in unraveling the genetic etiology of Parkinson disease in a genomic era. *Trends Genet.* 31(3), 140–149.
- Wang, J., Liu, Z., Chen, B., 2000. Association between cytochrome P-450 enzyme polymorphisms and Parkinson's disease. *Nat. Lib. Med.* 80, 585–587.
- Weisgraber, K.H., Roses, A.D., Strittmatter, W.J., 1994. The role of apolipoprotein E in the nervous system. *Curr. Opin. Lipidol.* 5(2), 110–116.
- Williams, A., Steventon, G., Sturman, S., Waring, R., 1991. Xenobiotic enzyme profiles and Parkinson's disease. *Neurology* 41(5), 29–32.

Надійшла до редколегії 27.03.2015



УДК 543.544.5.068.7:616.2

Хроматографические спектры свободных олигосахаридов плазмы крови больных с сердечно-сосудистой недостаточностью

И.Ю. Письменецкая¹, Т.Д. Баттерс²

¹ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗУ», Днепропетровск, Украина

²Институт гликобиологии Оксфордского университета, Оксфорд, Великобритания

Свободные олигосахариды – структурные аналоги гликанов гликоконъюгатов, которые возникают на ранних этапах процесса N-гликозилирования в ходе ассоциированной с эндоплазматическим ретикуломом деградации aberrантных гликопротеинов и расщепления гликоконъюгатов в лизосомах. Ишемия и гипертензия вызывают стресс внутриклеточных органелл, что приводит к нарушению их функций. Данная работа посвящена анализу хроматографических спектров свободных олигосахаридов плазмы крови больных с сердечной недостаточностью. Показано, что ишемия и гипертензия вызывают изменения в спектрах свободных гликанов. Во фракции нейтральных олигосахаридов выявлены три маркерных пика, а во фракции заряженных (кислых) гликанов – характерное увеличение площади одного из двух главных пиков. Расшифровку структуры гликанов проводили с помощью ферментативной деградации, а также путем сравнения характеристик изучаемых спектров с хроматограммами внутриклеточных свободных олигосахаридов и со структурами гликанов гликоконъюгатов из электронных баз данных. Маркерные пики нейтральной фракции представлены полиманнозными гликанами с 5–7 остатками маннозы и 1–2 остатками N-ацетилглюкозамина, а один из главных пиков заряженной фракции – двухантенным комплексным N-гликаном с двумя остатками сиаловой кислоты. Исследование свободных олигосахаридов плазмы крови – новая область изучения нарушений гликозилирования при сердечно-сосудистых заболеваниях, которая открывает широкие перспективы для поиска ранних диагностических и прогностических маркеров сердечной недостаточности.

Ключевые слова: свободные олигосахариды; ВЭЖХ-спектры; плазма крови человека; сердечная недостаточность

Chromatographic profiles of blood plasma free oligosaccharides in patients with cardiovascular disease

I.U. Pismenetskaya¹, T.D. Butters²

¹ Dnepropetrovsk Medical Academy SI, Dnepropetrovsk, Ukraine

² Oxford Glycobiology Institute, University of Oxford, Oxford, OX13QU, UK

Free oligosaccharides (FOS) are unbound structural analogs of glycans of glycoconjugates. There are several sources of them inside the cell: 1) multistep pathways of N-glycosylation, 2) the cell quality control and endoplasmic reticulum-associated degradation of misglycosylated and/or misfolded glycoproteins, 3) lysosomal degradation of mature glycoconjugates. Some of these FOS are the earliest indicators of potential glycosylation alterations that would be revealed in the course of the cell quality control and the endoplasmic reticulum-associated degradation. Ischemia and hypertension cause stress of intracellular organelles leading to disruption of their functions. The main objective of the work was the characterization of free oligosaccharides (FOS) in plasma obtained from patients with cardiovascular diseases compared to those from healthy subjects to evaluate the potential of these compounds for diagnostics. Chromatographic profiles of FOS composed of 4–12 monosaccharides were obtained and analyzed for quantitative and qualitative differences between the samples. After plasma deproteinization and FOS purification the oligosaccharides were labelled with anthranilic acid (2-AA), separated into the neutral and charged with QAE Sephadex (Q25-120) chromatography and analysed using high-performance liquid chromatography (HPLC). Glucose

ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗУ», пл. Дзержинского, 9, Днепропетровск, 49044, Украина
SE “Dnepropetrovsk Medical Academy of Health Ministry of Ukraine”, Dzerzhinsky str., 9, Dnipropetrovsk, 49044, Ukraine

Институт гликобиологии Оксфордского университета, Оксфорд, OX13QU, Великобритания
Oxford Glycobiology Institute, University of Oxford, Oxford, OX13QU, UK
Tel.: +38-068-732-51-21. E-mail: ip01589@gmail.com

unit values were determined following comparison with a 2-AA-labelled glucose oligomer ladder derived from a partial hydrolysate of dextran as an external standard. The data were collected and processed using Empower software. The charged FOS were digested with the sialidase from *Arthrobacter ureafaciens*. 2-AA – labelled free oligosaccharides from transferrin were used as an external standard for the structure decoding. The profiles obtained were compared with intracellular free oligosaccharides of known structures and with the glycan structures and their descriptions in the databases GlycoBase and EUROCarbDB. These approaches allowed predicting a range of glycan structures for each of the main peaks of HPLC profiles of plasma free oligosaccharides and managing ways for their future experimental analysis. In the case of cardiovascular disorders, HPLC profiles of FOS revealed a changing pattern of heterogeneity, depending on the severity of the disease. Three main enlarged glycan species in the neutral fraction and one peak in the charged fraction distinguished the FOS of the patients from those of the healthy volunteers. It has been revealed that the neutral marker peaks were represented by polymannose glycans with 5–7 mannose residues and 1–2 residues of N-acetylglucosamine, and one of the major peaks of the charged fraction – by two-antennary complex N-glycan with two sialic acid residues. The study of free oligosaccharides of blood plasma is a new field of glycobiology allowing an evaluation of an organism state at the level of the cell organelle functional status and opening up broad prospects for finding early diagnostic and prognostic markers of cardiac insufficiency.

Keywords: free oligosaccharides; HPLC-profiles; human plasma; cardiovascular diseases

Введение

Процессы синтеза и распада гликоконъюгатов сопровождаются появлением так называемых свободных олигосахаридов – не связанных с белками или липидами аналогов углеводной части гликопротеинов или гликолипидов, их биосинтетических предшественников и продуктов деградации. Внутри клетки существует несколько источников свободных олигосахаридов: 1) синтез гликана-предшественника в процессе N-гликозилирования белков в эндоплазматическом ретикулуме (Suzuki and Harada, 2014); 2) ассоциированная с эндоплазматическим ретикулумом деградация вновь синтезируемых гликопротеинов, которые не прошли клеточный контроль фолдинга (Hirayama et al., 2010); 3) распад зрелых гликоконъюгатов в лизосомах (Winchester, 2005).

Образование гликана-предшественника на ранних этапах N-гликозилирования приводит к появлению свободных фосфорилированных или нефосфорилированных олигосахаридов полиманнозного типа в результате их отщепления от долинхлорфосфата на любом этапе биосинтеза (Harada et al., 2013b), как полагают, из-за лимитированного количества этого липида-носителя в мембране эндоплазматического ретикулума и необходимости его участия в других биосинтетических процессах (Peric et al., 2010). Так как синтез гликана-предшественника происходит на обеих сторонах мембраны, свободные олигосахариды могут оказаться и в цитоплазме, и внутри эндоплазматического ретикулума. Вклад во внутриэндоплазматическую фракцию свободных олигосахаридов может вносить также олигосахарилтрансфераза (EC 2.4.1.119), катализирующая перенос гликана-предшественника на растущую полипептидную цепь, так как, согласно последним исследованиям (Harada et al., 2013), она обладает, кроме трансферазной, еще и гидролитической активностью.

Особый интерес представляют свободные олигосахариды, возникающие при ассоциированной с эндоплазматическим ретикулумом деградации, которая необходима для разрушения синтезируемых в эндоплазматическом ретикулуме aberrantных белков, не прошедших клеточный контроль из-за неправильного гликозилирования, нарушенного фолдинга или сборки в полимерные комплексы (Brodsky, 2012; Leitman, 2013). Такие дефектные белки переносятся через мембрану эндоплазматического ретикулума в цитозоль, где, после отщепления гликана, разрушаются протеасомой S26 (Nakatsukasa,

2013; Lemus, 2014). Эти белки могут содержать гликаны с измененной структурой и в клетке они появляются раньше, чем гликопротеин с таким aberrantным гликаном окажется в месте функциональной активности (на поверхности клеток, в межклеточном пространстве или в биологических жидкостях). В норме этому препятствуют механизмы клеточного контроля фолдинга (Ruggiano, 2014), которые нарушаются при стрессе эндоплазматического ретикулума (Sano, 2013).

Различные факторы, такие как оксидативный стресс, ишемия, сбой кальциевого гомеостаза, избыточный синтез нормальных белков или белков с нарушенной конформацией, приводят к изменению и нарушению функций эндоплазматического ретикулума (Minamino and Kitakaze, 2010). Это вызывает ответную реакцию клетки, направленную на восстановление функции ретикулума, так называемый отклик неструктурированных белков (unfolded protein response) (Chakrabarti, 2011). Если же воздействие стресса слишком велико и функции невозможно восстановить, запускаются процессы апоптоза клетки (Sun, 2015). Появляется все больше убедительных доказательств того, что адаптивные и проапоптозные пути ответной реакции клеток на стресс эндоплазматического ретикулума играют фундаментальную роль в развитии и прогрессировании сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе сердечной недостаточности, ишемической болезни сердца и атеросклероза (Minamino et al., 2010; Guo, 2015; Li, 2015).

Лизосомы – главные участники аутофагии, эволюционно консервативного процесса деградации внутриклеточных компонентов, в том числе и растворимых макромолекул (белков, углеводов, липидов и нуклеиновых кислот) (Mei, 2015). Аутофагия важна для поддержания сердечного гомеостаза и механизмов выживания кардиоцитов во время стресса или голодания. Результаты исследований, полученные в последнее время, свидетельствуют о том, что дерегуляция или замедление аутофагии связаны с сердечной недостаточностью и старением. Активация аутофагии, как правило, является кардиозащитным механизмом, хотя чрезмерная аутофагия может привести к гибели клеток и атрофии сердечной мышцы (Gatica, 2015; Orogo, 2015).

Таким образом, регуляция адаптивных путей ответной реакции клеток на стресс эндоплазматического ретикулума и модуляция аутофагии могут стать привлекательными терапевтическими подходами в лечении сердечно-сосудистых заболеваний. Поэтому несомненный интерес представляет поиск молекулярных марке-

ров, отражающих состояние эндоплазматического ретикула и эндосомно-лизосомной системы, в биологических жидкостях.

Основной задачей данной работы стала характеристика хроматографических спектров свободных олигосахаридов плазмы крови больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями и их сопоставление с нормой для оценки потенциала этих спектров в исследованиях поведения клеточных органелл в стрессовых условиях при ишемии и гипертензии с целью дальнейшего их использования в диагностике, мониторинге и поиске механизмов-мишеней для лекарственной терапии сердечной недостаточности.

Материал и методы исследований

Плазма крови пациентов с сердечной недостаточностью и практически здоровых доноров была отобрана с согласия всех групп в соответствии с требованиями этического комитета в КУ «Днепропетровская областная клиническая больница имени Мечникова» и любезно предоставлена для исследований врачом-кардиологом А.А. Мирошниченко. Пациенты были разбиты на две группы:

1) с сердечной недостаточностью с сохранением систолической функции левого желудочка (фракция выброса > 45%) первых двух функциональных классов – гипертоническая болезнь в сочетании с ишемической болезнью сердца без хронической сердечной недостаточности (n = 10);

2) с сердечной недостаточностью со сниженной систолической функцией левого желудочка (фракция выброса < 45%) третьего функционального класса – гипертоническая болезнь в сочетании с ишемической болезнью сердца с хронической сердечной недостаточностью (n = 12).

Возраст практически здоровых доноров (n = 15) соответствовал возрастной категории больных исследуемых групп – от 41 до 65 лет.

Для нормальнофазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии использовали реактивы фирмы VWR International, остальные химические реагенты были получены от фирмы Sigma-Aldrich.

Удаление белков плазмы. Депротенинизацию нативной плазмы крови проводили путем осаждения белков 10% трихлоруксусной кислотой с последующим центрифугированием в течение 10 минут при 3 000 об./мин. (Pismenetska, 2012). Остатки белков удаляли с помощью фильтра с гидрофильной полифлуорэтиленовой мембраной (Millex-LH, 0.45 µm, Millipore Corp., США), в соответствии с методикой Alonzi et al. (2008).

Удаление глюкозы. Моносахариды из плазмы после депротенинизации удаляли адсорбционной хроматографией на пористом графите с использованием колонки PGC (Thermo Electron Corp., Runcorn, UK) на 1 мл (25 мг/мл), как описано в работе Alonzi et al. (2008).

Маркирование олигосахаридов флуоресцентной меткой. Свободные олигосахариды метили 2-аминобензойной (антраниловой) кислотой (Sigma – Poole, Dorset, UK) в соответствии с методикой, приведенной в статье Neville et al. (2004). Меченые гликаны очищали твердофазной экстракцией на колонках Speed SPE Cartridges Amide-2 (Applied Separations, США) (Alonzi et al., 2008).

Разделение маркированных гликанов на фракции в зависимости от заряда. Пул меченых антраниловой кислотой гликанов методом ионообменной хроматографии на QAE-сефадексе (Q25-120) разделяли на нейтральные (незаряженные) и отрицательно заряженные свободные олигосахариды. Раствор гликанов наносили на колонку, промывали водой и элюировали нейтральные олигосахариды уксусной кислотой, а заряженные – ацетатом аммония в соответствии с методикой (Neville et al., 2004).

Ферментативное расщепление сиалидазой. Для изучения структуры олигосахаридов заряженной фракции проводили обработку сиалидазой (*Artrobacter ureafaciens*, OGS, Великобритания) в соответствии с фирменной инструкцией к ферменту. 100 мкл 2-АА-маркированных гликанов высушивали в вакуумном концентраторе SPD SpeedVac (Thermo Scientific), ресуспендировали в 5 мкл фирменного буфера, добавляли 5 мкл сиалидазы и инкубировали при 37 °C не менее 18 часов. Очистку гликанов от сиалидазы проводили центрифугированием через колонку Microcon с фильтром Amicon® Ultra 0.5 ml Centrifugal Filter (Millipore). Колонку предварительно промывали 100 мл Milli-Q™ H₂O, центрифугировали 10 мин. при 15 000 об./мин. и переносили в чистую пробирку. К смеси гликанов с сиалидазой добавляли 90 мкл Milli-Q™ H₂O и полученный раствор переносили на колонку Microcon, центрифугировали 10 мин. при 15 000 об./мин. На колонку Microcon наносили дополнительные 100 мл Milli-Q™ H₂O и вновь центрифугировали 10 мин. при 15 000 об./мин. Образец высушивали вакуумным концентратором SPD SpeedVac (Thermo Scientific), а потом ресуспендировали в 100 мкл Milli-Q™ H₂O.

Нормальнофазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Олигосахариды анализировали методом нормальнофазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе фирмы Waters (Великобритания) с колонкой 4.6 x 250 mm TSK gel-Amide 80 (Anachem, Luton, Beds, Великобритания) в соответствии с методикой, приведенной в работах Neville et al. (2004, 2009). Пики хроматограмм выражали в глюкозных единицах (ГЕ) путем сравнения с хроматограммой внешнего стандарта – частично гидролизованного декстрана, как описано в статье Neville et al. (2004).

Компьютерная обработка данных. Для сбора хроматографических данных и их обработки использовали компьютерные программы Waters Millennium, Waters Empower, Peak Time.

Результаты и их обсуждение

В данной работе впервые были получены хроматографические спектры общего пула, нейтральных и заряженных (кислых) свободных олигосахаридов плазмы крови больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями и проведено их сравнение с нормой. Общая концентрация свободных олигосахаридов плазмы крови очень мала и составила в норме – $937,9 \pm 173,5$ пкмоль/мл, в группе больных с гипертонической болезнью в сочетании с ишемической болезнью сердца без хронической сердеч-

ной недостаточности – $1\,245,1 \pm 191,7$ пкмоль/мл и в группе больных с гипертонической болезнью в сочетании с ишемической болезнью сердца и хронической сердечной недостаточностью – $1\,360,8 \pm 187,8$ пкмоль/мл. Кажущаяся тенденция увеличения концентрации свободных гликанов в зависимости от тяжести развития сердечной недостаточности не нашла статистического подтверждения. Исследовались олигосахариды, состоящие из четырех и более остатков моносахаридов, поэтому анализу подвергались хроматограммы на временном отрезке от 20

до 44 минут (нижняя шкала на рисунках), что соответствует характеристикам пиков от 4 до 12 глюкозных единиц (верхняя шкала). Результаты разделения представлены на рисунке. В качестве контроля использовали спектр общей фракции свободных олигосахаридов плазмы крови практически здоровых доноров, так как в предыдущих работах (Pismenetska and Butters, 2012) была показана его достаточная для такого сравнения воспроизводимость. Нумерация пиков на рисунках указана в соответствии с их нумерацией на контрольном спектре.

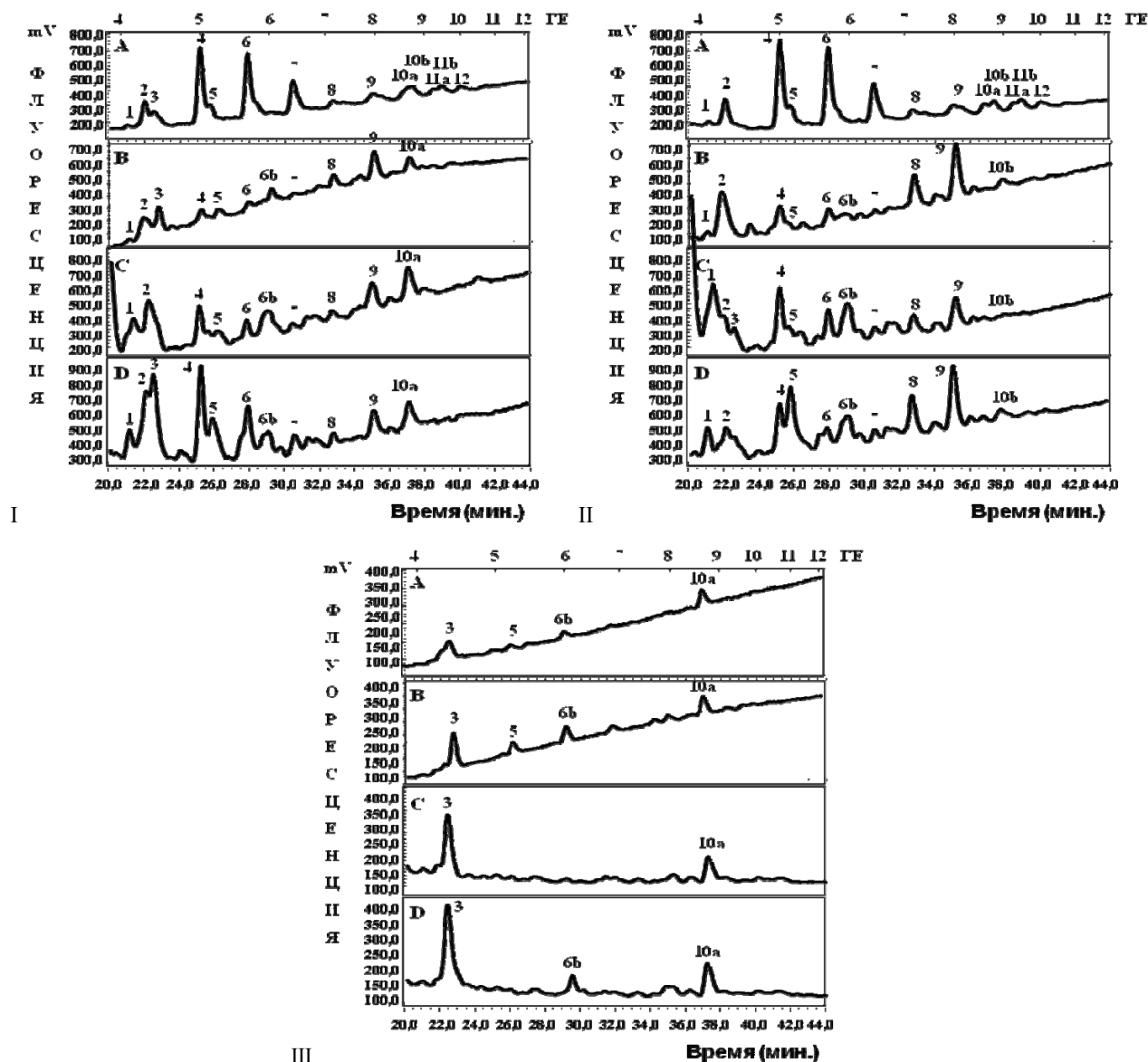


Рис. Сравнение ВЭЖХ-спектров общего пула (I), нейтральной (II) и заряженной (III) фракций свободных олигосахаридов плазмы крови больных с сердечной недостаточностью (B, C, D) и практически здоровых доноров (A): А – контрольная группа; В, С – группы больных гипертонической болезнью в сочетании с ишемической болезнью сердца без хронической сердечной недостаточности; D – группа больных гипертонической болезнью и ишемической болезнью сердца в сочетании с хронической сердечной недостаточностью

Анализ результатов хроматографического разделения показал, что спектры свободных олигосахаридов плазмы крови больных с сердечной недостаточностью отличаются от нормы (рис. I) повышенной степенью гетерогенности, ярко выраженной индивидуальностью и, в большинстве случаев, полной потерей основных законо-

мерностей контроля – четко выраженной структуры с подавляющим превалированием 4, 6 и 7-го пиков. Эта тенденция особенно усиливается в случае хронической сердечной недостаточности. Как и в контроле, большая часть свободных олигосахаридов плазмы пациентов представлена фракцией нейтральных гликанов (рис. II).

Именно эта фракция в наибольшей степени обеспечивает особенности хроматографических спектров общего пула – индивидуальное перераспределение гликанов всех пиков. Выделение фракции нейтральных гликанов позволило выявить общую закономерность в спектрах свободных олигосахаридов пациентов, отличающую их от нормы, – резкое увеличение концентрации 6b, 8 и 9-го пиков. Фракция заряженных (кислых) гликанов (рис. III) составляет по концентрации лишь небольшую долю от общего пула свободных олигосахаридов, как в норме, так и при исследуемых патологиях. Заряженные свободные олигосахариды представлены небольшим количеством пиков, основные из которых 3, 5, 6b и 10a. Существенным отличием этой фракции свободных олигосахаридов плазмы крови больных от нормы заключается в резком увеличении концентрации 3-го пика.

Для расшифровки строения гликанов сравнивали характеристики пиков изучаемых хроматограмм с пиками внутриклеточных свободных олигосахаридов. Для анализа использовали данные о внутриклеточных свободных олигосахаридах, которые были получены в аналогичных условиях разделения, а их детальное строение установлено дополнительными методами (Alonzi et al., 2008). Кроме того, использовали информацию о структурах гликанов гликоконъюгатов из электронных баз данных GlycoBase (www.glycobase.nibr.ie) и EURO-CarbDB (www.eurocarbdb.org) для пополнения структур гликанов нейтральной фракции и поиска олигосахаридных структур заряженной фракции.

Такой подход показал, что фракция нейтральных гликанов представлена полиманнозными структурами с одним или двумя остатками N-ацетилглюкозамина. Часть гликанов может содержать остатки глюкозы. Если в контроле преобладают олигосахариды с 4 и 5 остатками маннозы, то при сердечной недостаточности появляется изомер с 5 остатками маннозы, отсутствующий в норме (пик 6b), и гликаны с 6 и 7 остатками маннозы (пики 8 и 9). Не для всех пиков удалось найти структуры гликанов с соответствующим значением глюкозных единиц. Нет подходящей структуры для 2-го пика нейтральной фракции, а также для 3, 5 и 6-го пиков заряженной фракции.

Для детального анализа заряженной фракции ее обработали сиалидазой и сравнили с внешним стандартом известной структуры – углеводами трансферрина до и после такой же обработки. Это позволило выяснить, что пик 10a представлен двухантенным комплексным N-гликаном с двумя остатками сиаловых кислот, что подтверждало правильность предсказания структуры этого пика с помощью баз данных. Маркерный для спектров гликанов плазмы больных с сердечной недостаточностью пик 3 не изменял положения на хроматограмме после обработки ферментом, что свидетельствовало о том, что он не содержит олигосахаридов с сиаловыми кислотами или же вклад таких гликанов в общую площадь пика не слишком велик.

Полиманнозные свободные олигосахариды образуются на ранних стадиях N-гликозилирования в результате отщепления от липидного носителя в мембране эндоплазматического ретикула. Поэтому изменение их спектра свидетельствует об изменении процессов, происходящих в эндоплазматическом ретикуле, и отражает его состояние и реакцию на стрессовые факто-

ры. Заряженные (кислые) свободные олигосахариды образуются в лизосомах, поэтому изменения в их спектрах отражают состояние эндосомно-лизосомной системы. При сердечной недостаточности (сочетании гипертонической болезни сердца с ишемической болезнью на фоне хронической сердечной недостаточности или без нее) изменения хроматографических спектров свободных гликанов плазмы свидетельствуют о более глубоких нарушениях процессов в эндоплазматическом ретикуле, чем в лизосомах. Так как одной из важных особенностей образования свободных олигосахаридов в эндоплазматическом ретикуле является то, что они появляются значительно раньше, чем синтезируемые aberrантные протеины оказываются в зоне своего функционального назначения, то именно среди этих молекул могут быть найдены самые ранние диагностические маркеры такого грозного заболевания как сердечная недостаточность.

Выводы

Впервые получены ВЭЖХ-спектры общих, нейтральных и заряженных свободных олигосахаридов плазмы крови больных с сердечной недостаточностью. Эти спектры отличались как от ВЭЖХ-спектров в норме, так и между собой. При сердечной недостаточности повышалась гетерогенность спектров, особенно нейтральной фракции. Среди нейтральных олигосахаридов выявлены три характерных для данной группы заболеваний пика: гликаны с $6,00 \pm 0,01$ ГЕ (полиманнозный тип с 5 остатками маннозы), $7,07 \pm 0,04$ ГЕ (полиманнозный тип с 6 остатками маннозы) и с $7,83 \pm 0,04$ ГЕ (полиманнозный тип с 7 остатками маннозы). Их концентрация значительно превышала норму. Во фракции заряженных гликанов доминировали два пика с $4,43 \pm 0,05$ ГЕ неизвестной структуры и с $8,62 \pm 0,02$ ГЕ – двухантенный комплексный N-гликан с двумя остатками сиаловых кислот, что соответствовало пикам в норме. Однако при сердечной недостаточности концентрация первого пика была значительно выше нормы.

Исследование свободных олигосахаридов плазмы крови – новая область изучения нарушений гликозилирования при сердечно-сосудистых заболеваниях, которая позволяет оценить состояние организма на уровне функционального статуса клеточных органелл (эндоплазматического ретикула и лизосом), их реакций на стрессы при данных заболеваниях и открывает широкие перспективы для поиска ранних диагностических и прогностических маркеров сердечной недостаточности.

Благодарности

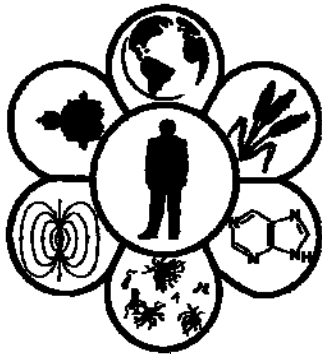
Работа выполнена при поддержке международного гранта EMBO (ASTF201-2010) и Института гликобиологии Оксфордского университета (г. Оксфорд, Великобритания) в лаборатории доктора Terry D. Butters.

Библиографические ссылки

Alonzi, D.S., Neville, D.C., Lachman, R.H., Dwek, R.A., Butters, T.D., 2008. Glucosylated free oligosaccharides are

- biomarkers of endoplasmic-reticulum alpha-glucosidase inhibition. *Biochem. J.* 409(2), 571–580.
- Brodsky, J.L., 2012. Cleaning up: ER-associated degradation to the rescue. *Cell* 151(6), 1163–1167.
- Chakrabarti, A., Chen, A.W., Varner, J.D., 2011. A review of the mammalian unfolded protein response. *Biotechnol. Bioeng.* 108(12), 2777–2793.
- Harada, Y., Buser, R., Ngwa, E.M., Hirayama, H., Aebi, M., Suzuki, T., 2013a. Eukaryotic oligosaccharyltransferase generates free oligosaccharides during N-glycosylation. *J. Biol. Chem.* 288(45), 32673–32684.
- Harada, Y., Nakajima, K., Masahara-Negishi, Y., Freeze, H.H., Angata, T., Taniguchi, N., Suzuki, T., 2013b. Metabolically programmed quality control system for dolichol-linked oligosaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110(48), 19366–19371.
- Hirayama, H., Seino, J., Kitajima, T., Jigami, Y., Suzuki, T., 2010. Free oligosaccharides to monitor glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 285(16), 12390–12404.
- Gatica, D., Chiong, M., Lavandero, S., Klionsky, D.J., 2015. Molecular mechanisms of autophagy in the cardiovascular system. *Circ. Res.* 116(3), 456–467.
- Guo, X.F., Yang, X.J., 2015. Endoplasmic reticulum stress response in spontaneously hypertensive rats is affected by myocardial ischemia reperfusion injury. *Exp. Ther. Med.* 9(2), 319–326.
- Leitman, J., Ron, E., Ogen-Shtern, N., Lederkremer, G.Z., 2013. Compartmentalization of endoplasmic reticulum quality control and ER-associated degradation factors. *DNA Cell Biol.* 32(1), 2–7.
- Lemus, L., Goder, V., 2014. Regulation of Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation (ERAD) by ubiquitin. *Cells* 3(3), 824–847.
- Li, M., Tang, Y.Q., Du, R.H., Shi, F.H., Hussein, H.K., Dai, Z., Dai, Y., 2015. CPUY11018, an azimilide derivative, ameliorates isoproterenol-induced cardiac insufficiency through relieving dysfunctional mitochondria and endoplasmic reticulum. *J. Pharm. Pharmacol.* doi: 10.1111/jphp.12401.
- Mei, Y., Thompson, M.D., Cohen, R.A., Tong, X., 2015. Autophagy and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1852(2), 243–251.
- Minamino, T., Komuro, I., Kitakaze, M., 2010. Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Circ. Res.* 107(9), 1071–1082.
- Minamino, T., Kitakaze, M., 2010. ER stress in cardiovascular disease. *J. Mol. Cell Cardiol.* 48(6), 1105–1110.
- Nakatsukasa, K., Brodsky, J.L., Kamura, T., 2013. A stalled retrotranslocation complex reveals physical linkage between substrate recognition and proteasomal degradation during ER-associated degradation. *Mol. Biol. Cell* 24(11), 1765–1775.
- Neville, D.C., Coquard, V., Priestman, D.A., te Vrugte, D.J., Sillence, D.J., Dwek, R.A., Platt, F.M., Butters, T.D., 2004. Analysis of fluorescently labelled glycosphingolipid-derived oligosaccharides following ceramide glycanase digestion and anthranilic acid labelling. *Anal. Biochem.* 331, 275–282.
- Neville, D.C., Dwek, R.A., Butters, T.D., 2009. Development of a single column method for the separation of lipid- and protein-derived oligosaccharides. *J. Proteome Res.* 8, 681–687.
- Orogo, A.M., Gustafsson, A.B., 2015. Therapeutic targeting of autophagy: Potential and concerns in treating cardiovascular disease. *Circ. Res.* 116(3), 489–503.
- Peric, D., Durrant-Arico, C., Delenda, C., Dupré, T., De Lonlay, P., de Baulny, H.O., Pelatan, C., Bader-Meunier, B., Danos, O., Chantret, I., Moore, S.E., 2010. The compartmentalisation of phosphorylated free oligosaccharides in cells from a CDG Ig patient reveals a novel ER-to-cytosol translocation process. *PLoS One* 5, e11675.
- Pismenetska, I.U., 2012. Vplyv immobilizatsii ta deproteinizatsii plazmy krovi na spectr vilnykh oligosakharydiv [Influence of blood plasma immobilization and deproteinization on the spectrum of free oligosaccharides]. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Series Biology* 60, 27–29 (in Ukrainian).
- Pismenetska, I.U., Butters, T.D., 2012. Vil'ni olihosakharydy plazmy krovi praktychno zdorovykh donoriv [Blood plasma free oligosaccharides of practically healthy volunteers]. *Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University, Series: Biology, Chemistry* 25(1), 182–187 (in Ukrainian).
- Ruggiano, A., Foresti, O., Carvalho, P., 2014. Quality control: ER-associated degradation: Protein quality control and beyond. *J. Cell Biol.* 204(6), 869–879.
- Sano, R., Reed, J.C., 2013. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1833(12), 3460–3470.
- Sun, Y., Zhang, T., Li, L., Wang, J., 2015. Induction of apoptosis by hypertension via endoplasmic reticulum stress. *Kidney Blood Press Res.* 40(1), 41–51.
- Suzuki, T., Harada, Y., 2014. Non-lysosomal degradation pathway for N-linked glycans and dolichol-linked oligosaccharides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 453(2), 213–219.
- Winchester, B., 2005. Lysosomal metabolism of glycoproteins. *Glycobiology* 15(6), 1R–15R.

Надійшла до редколегії 26.03.2015



УДК 615.331:615.076

Биологические свойства аэрококков и бацилл – компонентов нового ассоциативно-пробиотического комплекса

С.И. Вальчук¹, Д.А. Степанский², Т.Н. Шевченко¹, И.П. Кошева², С.А. Рыженко², Г.Н. Кременчущкий²

¹Днепропетровский национальный университет имени Олеся Гончара, Днепропетровск, Украина

²ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины», Днепропетровск, Украина

Разнообразие форм проявлений дисбактериоза, а также ограниченность спектра удельной активности существующих пробиотических препаратов диктует необходимость разработки новых пробиотиков. Основная масса имеющихся на сегодня пробиотических препаратов являются однокомпонентными, в то время как создание сложных ассоциированных пробиотиков по-прежнему остается актуальной задачей. Целью работы было изучить совместимость в едином препарате *B. subtilis* и *A. viridans*, их антагонистическую активность по отношению к разным штаммам тест-культур, а также общего антагонизма, направленного на разные группы бактерий, для последующего создания ассоциативного пробиотического комплекса. Для штаммов аэрококков характерна продукция пероксида водорода и супероксидного радикала, обусловленная функционированием НАД-независимой лактатоксидазы. Антиоксидантная защита аэрококков от действия эндогенных и экскретируемых активных форм кислорода обеспечивается активностью супероксиддисмутазы и GSH-пероксидазы. Для штаммов *A. viridans* 167 и *B. subtilis* 3 не выявлено взаимного подавляющего эффекта. Установлено максимальное проявление антагонистического эффекта штаммов *A. viridans* 167 и *B. subtilis* 3 в отношении музейных и клинических штаммов тест-культур условно-патогенных микроорганизмов (*Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella ozaena*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Candida albicans*) по сравнению с антагонистическим эффектом каждого из исследованных штаммов по отдельности, что позволяет рекомендовать их в качестве компонентов для создания нового комплексного пробиотического препарата.

Ключевые слова: пробиотики; *Bacillus subtilis* 3; *Aerococcus viridans* 167; антагонизм; дисбиоз

Biological properties of aerococci and bacilli as a component of new associate-probiotic complex

S.I. Valchuk, D.A. Stepansky, T.N. Shevchenko, I.P. Koshevaya, S.A. Ryzhenko, G.N. Kremenchutsky

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine

"Dnipropetrovsk Medical Academy of the Health Ministry of Ukraine" State Establishment, Dnipropetrovsk, Ukraine

Dysbioses of the gastrointestinal tract are common among people of all ages and genders. Development of this pathology is associated with a number of complications, from indigestion to occurrence of malignant disease. Therefore, there is a need in development of measures of their prevention and correction. Probiotics are used as drugs against dysbiosis. Most of the presently known probiotics contain bacterial cells of one species, although combination preparations feature higher efficiency. At the same time, there are difficulties in construction of these drugs, primarily due to incompatibility of physiological properties of microorganisms and mutually antagonistic action of their components. The aim was to examine the compatibility of *Bacillus subtilis* and *Aerococcus viridans* in a single preparation, their antagonistic activity against different strains of test-cultures and general antagonism directed on different groups of bacteria for subsequent formation of associative probiotic complex. Properties of aerococci strains were studied and *A. viridans* 167 strain was selected for inclusion into the probiotic preparation. The tested strain showed the highest indicators of production of hydrogen peroxide, which is one of the mechanisms of antagonistic effect against opportunistic pathogens. General study of biological properties of aerococci strains showed that producing of

Днепропетровский национальный университет имени Олеся Гончара, пр. Гагарина, 72, Днепропетровск, 49010, Украина
Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Gagarin Ave., 72, Dnipropetrovsk, 49010, Ukraine

ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины», пл. Дзержинского, 9, Днепропетровск, 49044, Украина
State Establishment "Dnipropetrovsk Medical Academy of Health Ministry of Ukraine", Dzerzhinsky str., 9, Dnipropetrovsk, 49044, Ukraine
Tel.: +38-067-566-05-42. E-mail: polishko.labd@mail.ru

hydrogen peroxide and superoxide radical in them was conditioned by functioning of NAD-independent lactatoxidase. It has been determined that antioxidant defense of aerococci from the action of endogenous and active excretable forms of oxygen was provided by activity of superoxide-dismutase and GSH-peroxidase. The method of deferred antagonism found no depressing mutual action between probiotic strains of *B. subtilis* 3 and *A. viridans* 167 at their joint cultivation. Inhibition of growth at the joint application of *A. viridans* 167 and *B. subtilis* 3 strains was recorded for both museum and clinical strains of test-cultures *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella ozaenae*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Candida albicans*. Separate application of *A. viridans* 167 or *B. subtilis* 3 against strains of these opportunistic pathogens was characterized by relatively less antagonistic effect of each of strains under study. The results allow us to recommend the studied strains of *B. subtilis* 3 and *A. viridans* 167 for use as the components to construct a new associative probiotic preparation.

Keywords: probiotics; *Bacillus subtilis* 3; *Aerococcus viridans* 167; antagonism; dysbiosis

Введение

Много научно-практических разработок, основанных на идее использования микробов-антагонистов, получили повсеместное признание. С успехом применяются биопрепараты, созданные из культур лактобактерий, кишечных палочек, бифидобактерий, пропионовокислых бактерий, стрептококков и других микроорганизмов. Однако разнообразие форм проявлений дисбактериозов, а также ограниченность спектра специфической активности существующих пробиотиков диктуют необходимость разработки новых биопрепаратов (Vitetta et al., 2014). Основным подходом к созданию комплексных пробиотических препаратов, имеющих преимущества перед многочисленным рядом часто несбалансированных пробиотиков, является оптимальный подбор их компонентов на основе физиологических особенностей, входящих в их состав культур бактерий. Это касается, прежде всего, их способности колонизовать разные экологические ниши, не угнетая друг друга, и элиминироваться из макроорганизма в определенное время, замещаясь нормальной естественной микрофлорой, более близкой по рецепторной мозаике макроорганизму (García-Mazco et al., 2015).

Широкое распространение дисбиотических состояний среди взрослого и детского населения обуславливает необходимость проведения коррекционных мероприятий, связанных с восстановлением нормальной микрофлоры всех открытых полостей макроорганизма, что особенно актуально в отношении желудочно-кишечного тракта (Blumstein et al., 2014; Schippa and Conte, 2014; Carding et al., 2015; Unger et al., 2015). Анализ отечественного рынка пробиотиков позволяет сделать однозначный вывод о доминировании на нем импортной продукции, значительную долю которой составляют препараты «Линекс» и «Бифиформ». Эти препараты относятся к поликомпонентным пробиотикам-симбиотикам, которые, с теоретической точки зрения, должны превосходить монопрепараты, так как способны оказывать корригирующее влияние в разных отделах кишечного биотопа.

При создании новых пробиотических ассоциаций должны быть проведены тесты *in vitro* до последующего начала испытаний на животных или человеке *in vivo* (Delgado et al., 2015; Vandenplas et al., 2015). Выбор пробиотиков должен основываться на данных об их эффективности и безопасности. Конструирование пробиотиков должно основываться на выборе штаммов с наиболее эффективными характеристиками в плане оказываемого полезного эффекта и выживаемости в организме, для чего проводят обязательное изучение их

биологических свойств. Наиболее важным свойством пробиотических штаммов бактерий является их антагонистическая активность, которая может проявляться в виде самых различных механизмов (Behnsen et al., 2013). Одним из таких механизмов может быть продукция пероксида водорода, выявленная у многих микроорганизмов (Bukharin et al., 2014). Одной из функций молекулы пероксида водорода является ее сигнальная составляющая, второй не менее важной функцией – антагонистическая активность (Kremenchutsky et al., 2010), поэтому микроорганизмы, способные к продукции перекисных соединений, являются потенциальными компонентами пробиотиков. В этой связи перспективными пробиотическими бактериями можно назвать аэрококки, в основе одного из установленных механизмов антагонистического действия которых на другие микроорганизмы лежит экскреция ими пероксида водорода в процессе окисления молочной кислоты (Kremenchutsky et al., 2002). Продукция этого соединения при дегидрировании лактата возможна в результате функционирования двух разных систем энзимов: а) окисление лактата аэробной НАД-независимой лактатдегидрогеназой (лактатоксидазой) с одно- или двухэлектронным восстановлением молекулярного кислорода; б) дегидрирование лактата НАД-зависимой лактатдегидрогеназой с восстановлением НАД и его последующим окислением соответствующей оксидазой с восстановлением молекулярного кислорода до пероксида водорода. Изучение механизмов продукции пероксида водорода и факторов антиоксидантной защиты является одним из этапов отбора штаммов в пробиотический препарат.

В целом препараты пробиотиков подразделяются на монокомпонентные, многокомпонентные, комбинированные (комплексные). Особое место занимают препараты, созданные на основе самоэлиминирующихся антагонистов: *Bacillus subtilis* («Биоспорин», «Споробактерин»), *Saccharomyces boulardii* («Энтерол»). Это препараты конкурентного действия, не относящиеся к облигатным представителям нормальной микрофлоры кишечника (Butel, 2014; Nieuwboer et al., 2014; Crouzet et al., 2015). Они преодолевают «кислый барьер», не разрушаются антибиотиками, обладают прямым и антагонистическим действием против многих условно патогенных микроорганизмов и повышают местный иммунитет (Moreno de LeBlanc and LeBlanc, 2014). Но большинство подобных препаратов содержит монокультуру микроорганизма-антагониста. Нами же был предложен пробиотический комплекс, состоящий из аэробов *B. subtilis* 3 (компонент «Биоспорина») и микроаэрофилов *Aerococcus viridans* 167 (компонент «А-бактерина»), в котором

есть возможность совместить и усилить полезные свойства двух уникальных препаратов.

Цель работы – оценить совместимость в едином препарате *B. subtilis* 3 и *A. viridans*, их антагонистическую активность по отношению к разным штаммам тест-культур, а также общий антагонизм, направленный на разные группы бактерий для последующего создания ассоциативного пробиотического комплекса.

Материал и методы исследований

Для создания комплексного пробиотического препарата одним из компонентов выбран штамм *B. subtilis* 3, выделенный из пробиотического препарата «Биоспорин», Биофарма, Украина. В качестве второго компонента проводили выбор штамма аэрококка. Для этого на первом этапе исследований изучили лактатоксидазную активность четырех культур аэрококков, выделенных от человека и включенных в коллекцию культур кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и эпидемиологии ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины». Выделение, идентификацию и первичное определение окисления молочной кислоты аэрококками проводили согласно методам, предложенным Kremenchutsky et al. (2009). Концентрацию пероксида водорода в жидкой питательной среде при росте аэрококков определяли на казеиновом бульоне методом Розуп (1951). Среди выделенных аэрококков отбирали культуры, наиболее активно окисляющие молочную кислоту (23, 45, 123, 167). Из ультразвуковых лизатов клеточных культур получали ферментные комплексы с помощью аммония сульфата с последующей очисткой, которые использовали в дальнейшем. Супероксидный радикал определяли методом Pigeolet et al. (1990). Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли методом Kostiuk et al. (1990). Активность СОД выражали в мкмоль/мин·мг⁻¹ белка. Активность глутатионпероксидазы определяли методом Mojn (1986). Белок определяли методом Lowry (1951). В качестве контрольных энзиматических препаратов при определении продукции супероксида использовали супероксиддисмутазу (СОД) (КФ 1.15.1.1) – лиофильно высушенную очищенную систему изоферментов, выделенную из эритроцитов крови человека (НПО «Ростэпидкомплекс»).

На следующем этапе исследований проводили определение антагонистической активности штаммов *A. viridans* 167 и *B. subtilis* 3 по отношению друг к другу методом отсроченного антагонизма. На мясопептонный агар (МПА), среды Гаузе-1 и Гаузе-2 по диаметру чашки Петри штрихом (длиной до 4 см и шириной 3–4 мм) производили высев взвеси клеток суточной культуры аэрококков или бацилл исследуемых штаммов, содержащей 1×10^9 клеток/мл. Посевы инкубировали 24 часа при температуре 37 °С, после чего штрихом подсеивали вторую культуру. Инкубировали 24, 48 и 72 часа при 37 °С, отмечая характер влияния культур на рост культур.

Антагонистическую активность изучаемых штаммов бактерий проводили на тест-культурах из коллекции кафедры: *Esherihia coli* 374, *Klebsiella ozaenae* 390, *Proteus vulgaris* 401, *Citrobacter freundii* 113/66, *Pseudomonas aeruginosa* 1, *Staphylococcus aureus* 209p, *Staphylococcus*

epidermidis ATCC 14990 и *Candida albicans* 690, а также на клинических изолятах бактерий тех же видов.

Для этого проводили высев культур *B. subtilis* 3, *A. viridans* 167 и их смеси на МПА штрихом, как описано выше. Через сутки инкубации при 37 °С производили подсев тест-культур штрихами, перпендикулярными росту. После повторной суточной инкубации при 37 °С учитывали зоны подавления роста тест-культур (учитывалась зона отсутствия роста тест-культуры от штриха роста испытываемых штаммов).

Результаты обрабатывали статистически: рассчитывали среднее и ошибку ($M \pm m$). Для сравнения выборок использовали однофакторный дисперсионный анализ.

Результаты и их обсуждение

Для выбора второго компонента комплексного пробиотического препарата изучены свойства четырех штаммов аэрококка, выделенных от людей и включенных в коллекцию культур кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и эпидемиологии ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины». Определено оптимальное время инкубации аэрококков с целью получения ферментных комплексов с наибольшей активностью, для чего культуры выращивали на казеиновом бульоне 24 часа. Показателем интенсивности роста выступала концентрация пероксида водорода в казеиновом бульоне при росте выбранных культур *A. viridans* (табл. 1).

Максимальный уровень продукции H_2O_2 характерен для культур *A. viridans* 45 и 167 через 10–12 часов инкубирования при 37 °С на казеиновом бульоне. Эти культуры были отобраны для получения ферментных комплексов и дальнейшего изучения их активности. В таблице 2 представлена характеристика лактатоксидазной активности лизатов и ферментных комплексов (ФК), полученных из культур *A. viridans* 45 и 167. Для контроля специфичности действия лактатоксидазы определяли концентрацию накапливающейся в реакционной среде пировиноградной кислоты.

Большой лактатоксидазной активностью обладают ферментные комплексы исследованных культур по сравнению с активностью лизатов. Изучение влияния пероксида водорода, вносимого в систему окисления лактата, на накопление пирувата, а также его действия на химический пируват, показали способность пирувата реагировать с пероксидом. Это явление имеет большое значение для понимания механизма защиты аэрококков от экскретируемого пероксида водорода, так как данные микроорганизмы лишены каталазы и пероксидазы. В результате экспериментов установлено, что продукция пероксида водорода аэрококками является функцией их лактатоксидазной активности.

Активность ксантинооксидазы, альдегидоксидазы и многочисленных флавопротеидов связана с образованием супероксидного радикала (O_2^-) и пероксида водорода (H_2O_2). С целью проверки предположения о возможности продукции супероксидного радикала аэрококками в процессе окисления молочной кислоты проведены эксперименты с лизатами клеток аэрококков и частично очищенными ферментными комплексами с лактатокси-

дазной активностью (табл. 3). Удельная продукция супероксида выше у лизата и ФК, полученных из штамма *A. viridans* 167, что можно объяснить особенностями его метаболизма. В результате анализа полученных данных

можно предложить, что процесс образования пероксида водорода у аэрококков имеет двойной характер: а) в результате прямого двухэлектронного восстановления кислорода; б) через дисмутацию супероксида.

Таблица 1

Продукция пероксида водорода штаммами *A. viridans* при росте на казеиновом бульоне

Время инкубации, ч	lg количества бактерий в 1 мл	Исследуемые культуры			
		23	45	123	167
		Среднее количество H ₂ O ₂ , мг/мл			
0	6,48	0,01 ± 0,001	0	0	0,01 ± 0,001
2	6,78	0,01 ± 0,001	0,01 ± 0,001	0,01 ± 0,001	0,02 ± 0,002
4	6,60	0,03 ± 0,001	0,48 ± 0,001	0,03 ± 0,005	0,51 ± 0,002
6	7,18	0,08 ± 0,001	0,25 ± 0,010	0,04 ± 0,003	0,33 ± 0,011
8	7,74	0,20 ± 0,001	0,57 ± 0,010	0,06 ± 0,011	0,77 ± 0,011
10	7,73	0,26 ± 0,020	0,80 ± 0,110	0,07 ± 0,010	1,06 ± 0,120
12	8,62	0,26 ± 0,010	0,73 ± 0,050	0,06 ± 0,009	0,99 ± 0,050
14	8,72	0,20 ± 0,010	0,65 ± 0,010	0,33 ± 0,001	0,85 ± 0,020
16	8,63	0,22 ± 0,010	0,65 ± 0,080	0,26 ± 0,010	0,87 ± 0,080
18	8,59	0,20 ± 0,010	0,65 ± 0,060	0,20 ± 0,010	0,85 ± 0,080
20	8,60	0,17 ± 0,003	0,51 ± 0,110	0,18 ± 0,010	0,68 ± 0,110
22	8,77	0,18 ± 0,010	0,57 ± 0,020	0,17 ± 0,001	0,75 ± 0,030
24	8,38	0,14 ± 0,020	0,65 ± 0,080	0,11 ± 0,021	0,79 ± 0,100
32	7,23	0,15 ± 0,020	0,54 ± 0,010	0,14 ± 0,020	0,69 ± 0,030
48	6,30	0,11 ± 0,020	0,44 ± 0,080	0,17 ± 0,031	0,55 ± 0,100
72	5,90	0,06 ± 0,002	0,40 ± 0,010	0,17 ± 0,025	0,46 ± 0,012

Таблица 2

Характеристика лактатоксидазной активности разных фракций клеток симбионтных аэрококков *A. viridans* 45 и 167

Фракции штаммов	мкмоль пирувата за 1 час на 1 мг белка	Активность лактатоксидазы, ЕД активности на 1 мг белка
Лизат 45	11,1 ± 0,8	60,2 ± 5,6
ФК 45	380,1 ± 8,9	766,0 ± 21,6
Лизат 167	10,1 ± 2,1	69,2 ± 4,6
ФК 167	132,8 ± 9,7	851,7 ± 36,9

Таблица 3

Продукция супероксидного аниона в процессе окисления лизатом и ферментным комплексом 0,045 М лактата лития

Клетки и фракции штаммов	Удельная активность продукции супероксида (O ₂ ⁻) на 1 мг белка ФК за 1 мин.	Влияние на продукцию O ₂ ⁻ супероксид-дисмутазы, мкмоль/мин. · мг белка
Лизат 45	1,35 ± 0,02	0,95 ± 0,23
ФК 45	0,66 ± 0,03	0,33 ± 0,01
Лизат 167	3,10 ± 0,80	1,20 ± 0,06
ФК 167	13,80 ± 0,97	1,70 ± 0,30

Результаты исследования активности ферментов антиоксидантной защиты аэрококков супероксиддисмутазы и GSH-пероксидазы лизатов и ФК представлены в таблице 4. Приведенные данные указывают на наиболее активную продукцию культурой *A. viridans* 167 биологически активных веществ (пероксида водорода, супероксида), а также активность лактатоксидазы, супероксиддисмутазы и GSH-пероксидазы, что позволило рекомендовать этот штамм для включения в качестве второго компонента в новый комплексный пробиотический препарат.

На следующем этапе изучали антагонизм культур относительно друг друга, что позволило определить возможность создания на их основе комплексного препарата. Анализ результатов эксперимента показал, что при подсевании в разные сроки инкубации *A. viridans* 167 к

B. subtilis 3 и наоборот на МПА и на средах Гаузе-1 и 2 взаимный антагонизм отсутствовал (табл. 5). При исследовании возможного антагонизма между культурами *A. viridans* 167 и *B. subtilis* 3 на среде Гаузе-2 после 24 и 48 часов инкубации антагонизм не наблюдался, а после 72 часов инкубации при подсевании аэрококка к бацилле антагонизм оказался незначительным, что указывает на совместимость штаммов и возможность создания на их основе комплексного пробиотического препарата.

Показателем активности препаратов на основе микроорганизмов – представителей нормальной микрофлоры являются антагонистические свойства бактерий, которые составляют основу пробиотического препарата (Behnsen et al., 2013; Vandenplas et al., 2015), поэтому на следующем этапе исследований оценивали антагонистическую активность штаммов *A. viridans* 167 и

B. subtilis 3 по отношению к культурам условно-патогенных микроорганизмов. Эффективность комплексного препарата проявляется в возможности подавления роста условно-патогенных и патогенных микроорганизмов каждым из компонентов препарата по отдельности

и при совместном культивировании. Изучение антагонистической активности каждого из выбранных штаммов по отдельности показало, что при подсевании к культуре *A. viridans* 167 после 24 ч инкубации тест-культур имело место угнетение их роста (табл. 6).

Таблица 4

Супероксиддисмутазная и GSH-пероксидазная активности лизатов и ФК аэрококков

Штаммы	Удельная активность супероксиддисмутазы, мкмоль/мин. · мг белка	Удельная активность GSH-пероксидазы, ЕД на 1 мг белка за 1 мин.
Лизат 45	5,45 ± 0,70	0,44 ± 0,04
ФК 45	8,35 ± 1,02	0,95 ± 0,23
Лизат 167	11,10 ± 0,80	1,20 ± 0,06
ФК 167	14,35 ± 0,97	11,70 ± 0,30

Таблица 5

Взаимная антагонистическая активность *A. viridans* 167 и *B. subtilis* 3 на разных питательных средах

Питательные среды	Время инкубации, ч					
	<i>B. subtilis</i> к <i>A. viridans</i>			<i>A. viridans</i> к <i>B. subtilis</i>		
	24	48	72	24	48	72
	Зоны задержки роста, мм					
МПА	–	–	–	–	–	–
Гаузе-1	–	–	–	–	–	–
Гаузе-2	–	–	4,0 ± 1,0	–	–	–

Примечание: «–» – отсутствие зоны задержки роста; n = 6 для каждой питательной среды

Таблица 6

Антагонистическая активность *A. viridans* 167 к штаммам тестовых культур (n = 10)

Штаммы тест-культур	Зона задержки роста, мм	
	музейные штаммы	клинические штаммы
<i>Escherichia coli</i>	15 ± 4	13 ± 4
<i>Proteus vulgaris</i>	12 ± 4	9 ± 4
<i>Klebsiella ozaenae</i>	13 ± 1	11 ± 1
<i>Citrobacter freundii</i>	13 ± 3	11 ± 3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11 ± 3	8 ± 3
<i>Staphylococcus aureus</i>	16 ± 2	14 ± 2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	17 ± 3	15 ± 3
<i>Candida albicans</i>	18 ± 2	13 ± 2

Максимальную антагонистическую активность штамм *A. viridans* 167 проявил по отношению к штаммам *S. epidermidis*, *S. aureus*, *C. albicans* и *E. coli*. К штаммам тест-культур *P. vulgaris*, *C. freundii*, *K. ozaenae*, *P. aeruginosa* наблюдали менее выраженный антагонизм.

Изучение антагонистических свойств штамма *B. subtilis* 3 по отношению к тест-культурам условно-патогенных микроорганизмов позволило выявить отличия по сравнению с действием штамма аэрококка (табл. 7). Штамм *B. subtilis* 3 проявляет максимальную антагонистическую активность по отношению к штаммам *S. epidermidis* и *C. albicans*, умеренно высокую – к *S. aureus*, *E. coli*, *C. freundii*, *K. ozaenae*, *P. vulgaris* и низкую – к штаммам *P. aeruginosa*.

Для создания ассоциированного пробиотического комплекса на основе бацилл и аэрококков исследовали их общую антагонистическую активность по отношению к представителям условно-патогенной микрофлоры (табл. 8). Общая активность штаммов *A. viridans* 167 и *B. subtilis* 3 в 1,5–2,0 раза выше, чем антагонистическая активность каждого из этих двух штаммов в отдельности, причем отме-

чается активное подавление роста всех тест-культур без исключения.

Таблица 7

Антагонистическая активность *B. subtilis* 3 к штаммам тест-культур (n = 10)

Штаммы тест-культур	Зона задержки роста, мм	
	музейные штаммы	клинические штаммы
<i>Escherichia coli</i>	12 ± 3	11 ± 3
<i>Proteus vulgaris</i>	11 ± 3	10 ± 3
<i>Klebsiella ozaenae</i>	13 ± 2	12 ± 2
<i>Citrobacter freundii</i>	13 ± 1	10 ± 2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8 ± 1	7 ± 1
<i>Staphylococcus aureus</i>	12 ± 3	12 ± 3
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	15 ± 3	14 ± 3
<i>Candida albicans</i>	15 ± 2	12 ± 2

Таблица 8

Общая антагонистическая активность *A. viridans* 167 и *B. subtilis* 3 к штаммам тест-культур (n = 10)

Штаммы тест-культур	Зона задержки роста, мм	
	музейные штаммы	клинические штаммы
<i>Escherichia coli</i>	26 ± 1	21 ± 2
<i>Proteus vulgaris</i>	26 ± 1	24 ± 1
<i>Klebsiella ozaenae</i>	24 ± 2	26 ± 2
<i>Citrobacter freundii</i>	28 ± 2	23 ± 3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23 ± 3	27 ± 1
<i>Staphylococcus aureus</i>	28 ± 2	22 ± 1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	29 ± 1	25 ± 2
<i>Candida albicans</i>	28 ± 3	20 ± 3

Полученные результаты свидетельствуют об усилении антагонистического действия аэрококков и бацилл при их ассоциации по отношению к условно-патогенным микроорганизмам, без оказания взаимного

антагонистического воздействия, что позволяет рекомендовать штаммы *A. viridans* 167 и *B. subtilis* 3 в качестве компонентов нового высокоэффективного ассоциативного пробиотического комплекса, содержащего в своем составе представителей нормальной микрофлоры.

Выводы

Все исследованные штаммы аэрококков, выделенные из организма человека, продуцировали пероксид водорода при культивировании *in vitro*. Продукция пероксида водорода и супероксидного радикала у аэрококков обусловлена функционированием НАД-независимой лактатоксидазы. Антиоксидантная защита аэрококков от действия эндогенных и экскретируемых активных форм кислорода обеспечивается активностью супероксиддисмутазы и GSH-пероксидазы.

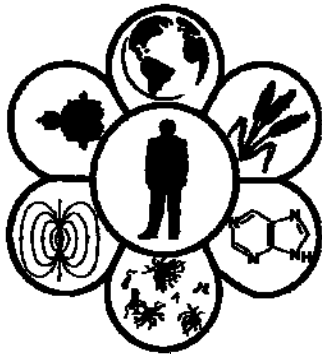
Штаммы *A. viridans* 167 и *B. subtilis* 3 не оказывают взаимного антагонистического эффекта, что позволяет их совместное культивирование и возможность одновременного использования как средства коррекции дисбиозов.

Показана в 1,5–2,0 раза более высокая эффективность совместного антагонистического действия штаммов *A. viridans* 167 и *B. subtilis* 3 на все использованные тест-культуры условно-патогенных микроорганизмов по сравнению с эффективностью антагонистического воздействия каждого из исследованных штаммов по отдельности, что позволяет создать на их основе новый комплексный пробиотический препарат.

Библиографические ссылки

- Behnsen, J., Deriu, E., Sassone-Corsi, M., Raffatellu, M., 2013. Probiotics: Properties, examples, and specific applications. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 3, a010074.
- Blumstein, D.T., Levy, K., Mayer, E., Harte, J., 2014. Gastrointestinal dysbiosis. Evol. Med. Public Health. pii: eou029.
- Bukharin, O.V., Shibnev, A.V., Cherkasov, S.V., 2014. Rol pro- i antyoksydantov mikroorhanizmov v rehuliatsii mekhanizmov homeostaza simbioza (na modeli vahinalnoho biotopa) [The role of pro- and antioxydants of microorganisms in regulation symbiotic homeostasis mechanisms (on a model of vaginal biotop)]. Zh. Mikrobiol. 3, 9–15 (in Russian).
- Butel, M.J., 2014. Probiotics, gut microbiota and health. Med. Mal. Infect. 44(1), 1–8.
- Carding, S., Verbeke, K., Vipond, D.T., Corfe, B.M., Owen, L.J., 2015. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. Microb. Ecol. Health Dis. 26, 26191.
- Crouzet, L., Rigottier-Gois, L., Serror, P., 2015. Potential use of probiotic and commensal bacteria as non-antibiotic strategy against vancomycin-resistant enterococci. FEMS Microbiol. Lett. 8, pii: fnv012.
- Delgado, S., Leite, A.M., Ruas-Madiedo, P., Mayo, B., 2015. Probiotic and technological properties of *Lactobacillus spp.* strains from the human stomach in the search for potential candidates against gastric microbial dysbiosis. Front. Microbiol. 14(5), 766.
- García-Mazcorro, J.F., Garza-González, E., Marroquín-Cardona, A.G., Tamayo, J.L., 2015. Characterization, influence and manipulation of the gastrointestinal microbiota in health and disease. Gastroenterol. Hepatol. pii: S0210-5705(15)00024-2.
- Kostiuk, V.A., Potapovych, A.Y., Kovaleva, Z.V., 1990. Prostoi i chuvstvitel'nij metod opredeleniia aktivnosti superoksiddismutazi, osnovannij na reaktsii okisleniia kvartetina [Simple and sensitiveve method of determination of superoxidizedismutase activity, based on the reaction of quercitine oxidation]. Vo-prosy medicinskoj himii 2, 88–91 (in Russian).
- Kremenchutsky, G.N., Ryzhenko, S.A., Koshevaia, Y.P., Medinskaia, O.A., Kulyshenko, S.H., Sharun, A.V., 2002. Issledovanie antahonisticheski aktivnikh metabolitov, produ-tsirovanih *Aerococcus viridans* [The research of antagonistic active metabolites, produced by *Aerococcus viridans*]. Zhurnal Vinnitskoho Hosudarstvennoho Universiteta 2, 318–319 (in Russian).
- Kremenchutsky, G.N., Stepanskyi, D.O., Yurhel, L.H., Koshova, I.P., Krushynska, T.Y., Valchuk, S.O., Kondratiev, A.Y., 2010. Informatsiini komunikatsii mikroorhanizmv [Informational communications of microorganisms]. Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Med. 1, 66–70 (in Ukrainian).
- Kremenchutsky, G.N., Yurhel, L.H., Sharun, A.V., Stepanskyi, D.O., Valchuk, S.O., Koshova, I.P., Parusov, A.V., 2009. Metody vydilennia ta identyfikatsii hrampozytvnykh katalazonehatyvnykh kokiv: Metodychni rekomendatsii [Methods of isolation and identification of grampositive catalasenegative cocci: manual]. Kyiv (in Ukrainian).
- Lowry, O.H., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Biol. Chem. 193(1), 265–275.
- Moin, V.Y., 1986. Prostoi i chuvstvitel'nij metod opredeleniia hlutationperoksidazi v eritrotsitakh [Simple and sensitiveve method of determination of glutationperoxidase in red blood cells]. Lab. Delo 12, 724–727 (in Russian).
- Moreno de LeBlanc, A. de, LeBlanc, J.G., 2014. Effect of probiotic administration on the intestinal microbiota, current knowledge and potential applications. World J. Gastroenterol. 20(44), 16518–16528.
- Nieuwboer, M. van den, Claassen, E., Morelli, L., Guarner, F., Brummer, R.J., 2014. Probiotic and synbiotic safety in infants under two years of age. Benef. Microbes. 5(1), 45–60.
- Pigeolet, E., Corbisier, P., Houbion, A., Lambert, D., Michiels, C., Raes, M., Zachary, M.-D., Remade, J., 1990. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. Mech. Ageing Dev. 51(3), 283–297.
- Pozyn, M.E., 1951. Perekys vodoroda i perekisnie soedyneniya [Hydrogen peroxide and peroxide compaunds]. Hosudarstvennoe Nauchno-Tekhnicheskoe Izdatelstvo Khimicheskoi Literatury, Moscow (in Russian).
- Schippa, S., Conte, M.P., 2014. Dysbiotic events in gut microbiota: Impact on human health. Nutrients 6(12), 5786–5805.
- Unger, S., Stintzi, A., Shah, P., Mack, D., O'Connor, D.L., 2015. Gut microbiota of the very-low-birth-weight infant. Pediatr. Res. 77(1–2), 205–213.
- Vandenplas, Y., Huys, G., Daube, G., 2015. Probiotics: An update. J. Pediatr. (Rio J) 91(1), 6–21.
- Vitetta, L., Bambling, M., Alford, H., 2014. The gastrointestinal tract microbiome, probiotics, and mood. Inflammopharmacol. 22(6), 333–339.

Надійшла до редколегії 21.03.2015



УДК 616.155.392+612.398+577.112+577.15

Зміни протеазно-інгібіторного балансу при онкогематологічних захворюваннях

Ю.А. Гордієнко¹, О.Е. Шаульська¹, Л.М. Дяченко¹, Т.П. Ніколаєнко-Камишова², А.І. Шевцова¹

¹ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», Дніпропетровськ, Україна

²КЗ «Дніпропетровська міська багатопрофільна клінічна лікарня № 4» Дніпропетровської обласної ради,
Дніпропетровськ, Україна

Досліджено активність трипсиноподібних ензимів, матриксних металопротеїназ ММП2 та ММП9, вміст α_1 -інгібітора протеїназ і α_2 -макроглобуліну у плазмі крові хворих із різними формами онкогематологічних захворювань до та після застосування цитостатичних препаратів доксорубіцину та даунорубіцину. Встановлено, що при проліферативних захворюваннях крові відбувається порушення балансу у системі протеоліз-антипротеоліз, що залежить від типу проліферувальних клітин і перебігу захворювання. У хворих із гострим мієлолейкозом і множинною мієломою концентрація інгібіторів підвищена на тлі збільшення активності трипсиноподібних ензимів та різноспрямованих змін проММП9. При хронічному лімфолейкозі вміст інгібіторів знижується на тлі нормальних значень активності трипсиноподібних ензимів і посилення активності ММП9. Під впливом антрациклінових антибіотиків цей баланс порушується за рахунок змін як активності протеолітичних ферментів, так і концентрації їх інгібіторів.

Ключові слова: деградація білків; гострий мієлолейкоз; хронічний лімфолейкоз, множинна мієлома; антрациклінові антибіотики

Altered balance between proteolysis and antiproteolysis in oncohematologic diseases

I.A. Gordiienko¹, O.E. Shaul'ska¹, L.M. Diachenko¹, T.P. Nikolayenko-Kamyshova², A.I. Shevtsova¹

¹"Dnipropetrovsk Medical Academy of the Health Ministry of Ukraine" SE, Dnipropetrovsk, Ukraine

²"City Multi-Field Clinical Hospital 4 RSA Dnipropetrovsk" SI, Dnipropetrovsk, Ukraine

Destruction of malignant cell clones and search for markers of the effectiveness of chemotherapy in patients with hematologic malignancies is an urgent direction of research. The purpose of this paper was to study plasma of patients with various forms of blood tumor, the activity of trypsin-like enzymes, matrix metalloproteinases MMP2 and MMP9, content of α_1 -proteinase inhibitor and α_2 -macroglobulin before and after the cytotoxic therapy by anthracycline antibiotics, doxorubicin and daunorubicin. It was established that concentration of inhibitors and activity of trypsin-like enzymes increased in patients with acute myeloid leukemia and multiple myeloma against the backdrop of multidirectional changes of proMMP9. Activity of the latter enzyme was reduced to $0,03 \pm 0,01$ rel. u. in acute myeloid leukemia, and after chemotherapy it increased 7 times. Reducing level of inhibitors and increasing activity of MMP9 were found in chronic lymphocytic leukemia. The presence of the correlation between the α_2 -macroglobulin and gelatinase activity in the treatment indicates that the inhibitor is an important mechanism for storing of gelatinolytic potential. Balance between proteolysis and antiproteolysis depends on the type of proliferating cells and the course of the disease. Indicators of tissue destruction may be an additional criterion for monitoring the stage of blood tumors and efficacy of treatment.

Keywords: degradation of proteins; acute myeloid leukemia; chronic lymphocytic leukemia; multiple myeloma; anthracycline antibiotics

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», вул. Дзержинського, 9, Дніпропетровськ, 49044, Україна
SE "Dnipropetrovsk Medical Academy of the Health Ministry of Ukraine", st. Dzerzhinsky, 9, Dnipropetrovsk, 49044, Ukraine
Tel. +38-050-046-82-87. E-mail: gordienko.ju@gmail.com

КЗ «Дніпропетровська міська багатопрофільна клінічна лікарня № 4» Дніпропетровської обласної ради, вул. Близня, 31, Дніпропетровськ, 49102, Україна
SI "City Multi-Field Clinical Hospital 4 RSA Dnipropetrovsk", st. Blyzhnia, 31, Dnipropetrovsk, 49102, Ukraine
E-mail: dr.nik4@rambler.ru

Вступ

Протеолітичні процеси відіграють надзвичайно важливу роль у життєдіяльності клітини та цілісного організму, забезпечуючи процесинг, дозрівання, оновлення білків, передачу сигналу у клітину та міжклітинні взаємодії. Внутрішньоклітинний протеоліз відбувається у цитоплазмі в лізосомах, які містять велику кількість протеаз, позаклітинний – за дії матрикс-деградувальних ензимів та екскреторних ензимів, що синтезуються у фібробластах, гепатоцитах і клітинах крові (Hultberg and Sjögren, 1980; Rozario and DeSimone, 2010). У разі розвитку онкогематологічних захворювань деякі з внутрішньоклітинних протеаз можуть секретуватись у міжклітинний простір і брати або пряму участь у руйнуванні позаклітинних білків, або опосередковану, внаслідок активації специфічних ензимів шляхом обмеженого протеолізу (Jarovaja, 2005; Wiedow and Meyer-Hoffert, 2005; Mecham, 2012). Особливу увагу серед багатьох протеолітичних ензимів крові привертають матриксні металопротеїнази 2/9 та трипсиноподібні ензими, оскільки ці ферменти здатні руйнувати колаген базальних мембран і сприяти таким чином метастазуванню пухлини (Gajdamaka et al., 2009; Kessenbrock et al., 2010).

Активність протеолітичних процесів у крові залежить не тільки від кількості та функціональної активності відповідних ензимів, а і від наявності багатьох факторів, що секретуються гепатоцитами, ендотеліоцитами та клітинами крові. Велике значення мають інгібітори протеолітичних ензимів, які також продукуються цими клітинами (Pamyrskyj, 2009). Порушення балансу у системі «протеоліз – антипротеоліз» при онкогематологічних захворюваннях може бути однією з причин злоякісної трансформації клітин і неадекватної відповіді на лікувальні заходи, але дослідження в цьому напрямі обмежені (Veremeenko et al., 2000; Hidalgo and Eckhardt, 2001).

Мета статті – співставити активність матрикс-деградувальних ензимів із кількістю найпотужніших неспецифічних інгібіторів цих ферментів – α_1 -інгібітора протеїнази та α_2 -макроглобуліну при різних типах онкогематологічних захворювань до та після хіміотерапії із застосуванням протипухлинних антибіотиків доксорубіцину та даунорубіцину.

Матеріал і методи досліджень

Активність матрикс-деградувальних ензимів та їх окремих інгібіторів у плазмі крові визначали у пацієнтів із різними видами проліферативних захворювань крові ($n = 51$), які були розподілені по групах залежно від типу ураження: гострий мієлолейкоз (ГЛМ, $n = 15$), множинна мієлома (ММ, $n = 14$) та хронічний лімфолейкоз (ХЛЛ, $n = 22$). До групи умовно здорових донорів увійшли 20 чоловіків та 12 жінок.

Для визначення активності трипсиноподібних ензимів (ТПЕ) застосовували модифікацію методу Веремєнко (Veremeenko et al., 1988), суть якого полягає у розщепленні цими ферментами синтетичного безбарвного субстрату N-бензойл-DL-аргінін-4-паранітроанілідгідрохлориду (БАНІ) з утворенням p-нітроаніліну жовтого кольору, ступінь

забарвлення якого реєстрували за допомогою фотометра Human (Human, Германія) за довжини хвилі 410 нм. Кількісну оцінку ТПЕ здійснювали за допомогою калібрувального графіка, для побудови якого як стандартні розчини використовували різні розведення аніліну, який є кінцевим продуктом розщеплення БАНІ за дії трипсиноподібних ензимів. Питому активність ТПЕ у плазмі крові визначали як кількість міжнародних одиниць в 1 мл крові на мг білка (МО/мл•мг).

Для визначення відносної активності матриксних металопротеїнази ММП2 та ММП9 застосовували метод желатин-зимографії, який базується на проведенні вертикального електрофорезу у 7,5% поліакриламідному гелі, кополімеризованому з желатиною як субстратом і за присутності додецилсульфату натрію як денатурувального агента (Shevcova et al., 2013).

α_1 -Інгібітор протеїнази (α_1 -ІП) та α_2 -макроглобулін (α_2 -МГ) визначали за мікрояривом методу Веремєнко (Veremeenko et al., 1988).

Статистичну обробку результатів проводили із застосуванням пакетів прикладних програм Statistica 6.0, Statwin. Аналіз залежності показників проводили за допомогою коефіцієнтів кореляції Пірсона (Glanc, 1999).

Результати та їх обговорення

В умовах онкогематологічних захворювань мають місце різноспрямовані зміни активності досліджуваних матриксних металопротеїнази (або желатинази). До лікування антрацикліновими антибіотиками основні зміни активності торкаються латентної форми ММП9. При мієлопроліферації цей показник знижується, а при лімфопрولیферативних захворюваннях зазнає різноспрямованих змін: не змінюється при хронічному лімфолейкозі та суттєво підвищується при множинній мієломі (табл. 1).

Проведені дослідження дозволили також оцінити загальну трипсиноподібну активність плазми крові при означених патологічних станах. Із наведених у таблиці 1 даних видно, що активність ТПЕ у досліджуваних групах до курсу хіміотерапії відрізнялась від норми і, хоча підвищення активності у пацієнтів із ГМЛ і ММ у 1,4 раза було суттєвим, статистично значимих змін не відбувалось. У групі хворих із ХЛЛ активність ТПЕ була аналогічною такій в контрольній групі.

На фоні терапії при ГМЛ і ХЛЛ спостерігалось суттєве посилення активності трипсиноподібних ензимів порівняно з пацієнтами до лікування. Статистично значуще підвищення активності ТПЕ відмічене лише у групі з ГМЛ. При ХЛЛ, незважаючи на велику різницю між показниками до терапії та після (у 1,5 раза), вірогідних змін не виявлено. Однією з причин цих змін може бути розвиток дефіциту ендogenous інгібітора тромбіну (антитромбіну ІІІ) за впливу хіміотерапії. У результаті різке зростання активності ТПЕ може відбуватись за рахунок підвищення активності тромбіну. З іншого боку однією з вагомих ланок протеолітичного каскаду є серинова трипсиноподібна протеїназа – активатор плазміногену урокіназного типу (uPA), що викликає утворення іншої протеїнази з трипсиноподібною активністю – плазміну (Parfenova et al., 2006). Крім того, злоякісні клітини синтезують специфічну кальцій-залежну цистеїнову протеї-

назу, яка отримала назву «раковий прокоагулянт». Ця протеїназа активує фактор зсідання крові X, що також є трипсиноподібним ензимом (Butylin et al., 2007).

Дослідження показників антипротеазної системи у хворих із проліферативними захворюваннями крові показало, що до хіміотерапії концентрація α_1 -ІІІ у плазмі хворих на ГМЛ була вірогідно підвищеною та складала $326,9 \pm 13,9$ мкмоль/л (рис. 1). Після хіміотерапії вміст цього інгібітора дещо знижувався. Кореляційний аналіз експериментальних даних виявив слабкий зворотний зв'язок між α_1 -ІІІ та активністю ТПЕ ($r = -0,56$) у цій групі хворих. Після застосування хіміотерапії кореляції

між досліджуваними параметрами не визначалось. У хворих із ММ концентрація α_1 -ІІІ інгібітора у крові була також збільшена до $268,2 \pm 42,7$ мкмоль/л порівняно з нормою ($229,4 \pm 9,6$ мкмоль/л), але різниця була недовірною. Слід зазначити, що хіміотерапія не впливала на рівень цього інгібітора (Shevcova et al., 2014). Характерно, що при ММ зберігається високий коефіцієнт кореляції між α_1 -ІІІ та активністю ТПЕ, який складає 0,89, після хіміотерапії кореляція практично відсутня. Отже, збільшення ТПЕ при ММ супроводжується збільшенням концентрації інгібітора, а цитостатична терапія спричиняє порушення цього взаємозв'язку.

Таблиця 1

Активність ММП2 та ММП9 у пацієнтів з онкогематологічними захворюваннями до та після хіміотерапії

Група пацієнтів	Відносна активність, ум. од.			ТПЕ, МО/мл·мг білка
	проММП9	ММП9	ММП2	
Контроль, n = 32	1,02 ± 0,12	0,99 ± 0,04	1,03 ± 0,05	0,0020 ± 0,0003
до хіміотерапії				
Гострий мієлолейкоз, n = 15	0,03 ± 0,01 ^{***}	1,01 ± 0,02	1,04 ± 0,04	0,0027 ± 0,0003
Множинна мієлома, n = 14	2,76 ± 0,06 ^{***}	1,14 ± 0,04 ^{***}	0,90 ± 0,01 [*]	0,0028 ± 0,0007
Хронічний лімфолейкоз, n = 22	0,95 ± 0,07	1,26 ± 0,06 ^{**}	1,04 ± 0,01	0,0021 ± 0,0005
після хіміотерапії				
Гострий мієлолейкоз, n = 15	0,21 ± 0,06 ^{***§§§}	1,79 ± 0,24 ^{**§§§}	1,16 ± 0,03 ^{**§}	0,0036 ± 0,0001 ^{***§}
Множинна мієлома, n = 14	0,17 ± 0,10 ^{***§§§}	1,46 ± 0,15 ^{***§§§}	0,89 ± 0,20	0,0021 ± 0,0001
Хронічний лімфолейкоз, n = 22	0,25 ± 0,10 ^{***§§§}	0,01 ± 0,02	0,88 ± 0,02 ^{**§§§}	0,0032 ± 0,0003 [*]

Примітки: * – статистична значущість відносно контролю $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$, *** – $P < 0,001$; § – статистична значущість відносно показників відповідних груп до хіміотерапії $P < 0,05$, §§ – $P < 0,01$, §§§ – $P < 0,001$; ММП – матриксна металопротеїназа, ТПЕ – трипсиноподібні ензими.

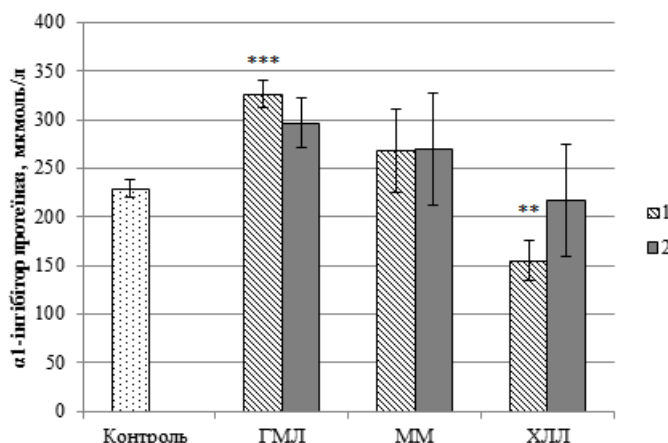


Рис. 1. Концентрація α_1 -інгібітора протеїназ у плазмі крові хворих із проліферативними захворюваннями крові:

1 – до хіміотерапії антрацикліновими антибіотиками, 2 – після хіміотерапії; ** – $P < 0,01$, *** – $P < 0,001$ – статистична значущість відносно контролю; ГМЛ – гострий мієлолейкоз, ММ – множинна мієлома, ХЛЛ – хронічний лімфолейкоз

При ХЛЛ отримані інші дані: до лікування рівень α_1 -ІІІ у пацієнтів був вірогідно зниженим. Застосування антрациклінових антибіотиків зумовлювало зростання даного показника, але виявлені зміни були невірогідними. При цьому визначався слабкий негативний кореляційний зв'язок рівня α_1 -ІІІ з активністю ТПЕ ($r = -0,59$), який, знов-таки, як і в разі ГМЛ і ММ, порушувався після проведення хіміотерапії.

У пацієнтів із хронічним лімфолейкозом до терапії виявлено вірогідне зниження концентрації α_1 -ІІІ на тлі зниженої активності ТПЕ, хоча при цьому зберігається баланс між обома процесами. Цитостатична терапія викликала порушення цього балансу в усіх групах пацієнтів, що свідчило про активацію не тільки процесів деградації, а й метаболізму клітин у цілому. Результати

визначення α_2 -МГ у вищеперелічених групах наведено на рисунку 2. У хворих із ГМЛ і ММ до хіміотерапії виявлено статистично значиме підвищення вмісту α_2 -МГ, який майже утричі перевищує норму ($4,60 \pm 0,07$ г/л) і відповідно дорівнює $14,25 \pm 2,49$ та $14,06 \pm 0,50$ г/л. При ХЛЛ цей показник відповідав контрольним значенням ($4,50 \pm 0,98$ г/л).

Після застосування антрациклінових антибіотиків вміст α_2 -МГ змінювався залежно від типу захворювання: у разі ГМЛ і ММ він дещо зменшувався, а у випадку ХЛЛ, навпаки, зростав до $6,17 \pm 1,89$ г/л. Статистично значущі зміни спостерігались лише у пацієнтів із ММ, у яких кількість α_2 -МГ була нижчою у 1,6 раза і дорівнювала $8,66 \pm 2,10$ г/л. Слід зазначити, що ці зміни корелювали з активністю ТПЕ ($r = 0,83$).

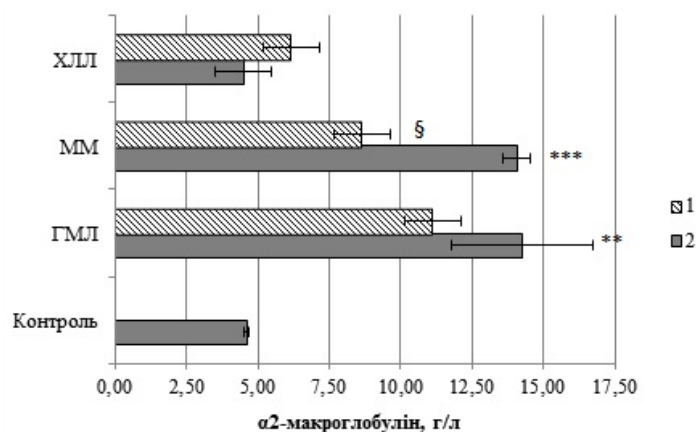


Рис. 2. Концентрація α_2 -макроглобуліну у плазмі крові хворих із проліферативними захворюваннями крові: 1 – після хіміотерапії даунорубіцином і адрибластином, 2 – до хіміотерапії; * – $P < 0,01$, *** – $P < 0,001$ – статистична значущість порівняно з контролем; § – $P < 0,05$ – статистична значущість відносно показників до лікування; ГМЛ – гострий мієлолейкоз, ММ – множинна мієлома, ХЛЛ – хронічний лімфолейкоз

Співставлення кількості α_2 -МГ з активністю ММП9/2 показало, що за умов онкогематологічних захворювань баланс між цими показниками залежить від типу проліферувальних клітин. У групі з ГМЛ до лікування виявлено наявність слабого негативного кореляційного зв'язку між активністю ММП9 та концентрацією α_2 -МГ ($r = -0,40$). Підвищення вмісту α_2 -МГ до $14,25 \pm 2,49$ г/л на тлі нормальних значень ММП9 за ГМЛ може свідчити про те, що на цій стадії прогресування хвороби організм, посилюючи синтез інгібітора, підтримує активність ММП9 у межах, достатніх для реалізації фізіологічних функцій. Після проведення лікування відбувається знищення злоякісних клітин і, як наслідок, поступова нормалізація кровотворення у кістковому мозку. На основі отриманих даних можна стверджувати, що в умовах ГМЛ у крові збільшується кількість зрілих нейтрофільних гранулоцитів, здатних до синтезу ММП9.

У хворих із ХЛЛ субстратом пухлини є трансформовані лімфоцити, не здатні повноцінно виконувати свої функції, але вони можуть синтезувати ММП9. У цій групі хворих рівні проММП9 та α_2 -МГ до лікування перебували у межах норми. Активність ММП9 перевищувала норму, складаючи 1,26 ум. од., при цьому спостерігався позитивний кореляційний зв'язок між рівнем активності даного ферменту та вмістом α_2 -МГ ($r = 0,83$). Наявність такого взаємозв'язку може бути свідченням поступово зростаючого протеолітичного потенціалу упродовж захворювання, який жорстко обмежується дією інгібіторів. За нашими даними, активність проММП9 значно зменшується після терапії антрацикліновими антибіотиками внаслідок знищення лейкозних клітин, що продукують цей фермент.

ММ більш агресивна, ніж ХЛЛ, хоча обидва захворювання належать до лімфопроліферативних. Порівняння показників активності досліджуваних ММП із рівнем α_2 -МГ показує, що у хворих із ММ до хіміотерапії на тлі різкого посилення активності латентної та зрілої ММП9 підвищується вміст α_2 -МГ. Характер змін у цієї групи хворих після лікування (наявність позитивних кореляційних зв'язків на тлі зниження активності усіх досліджуваних ММП та кількості α_2 -МГ) може відображати як пригнічення синтезу желатиназ, так, власне, і їх інгібіторів за дії цитостатичних препаратів. З іншого боку,

можна припустити, що пригнічення активності ММП відбувається завдяки впливу на них специфічних інгібіторів – ТІМПІ, які теж є регуляторами дії желатиназ.

Висновки

При проліферативних захворюваннях крові (гострий мієлолейкоз, хронічний лімфолейкоз, множинна мієлома) за умов проведення хіміотерапії превалюючу роль відіграє α_1 -інгібітор протеїназ.

Наявність кореляції між α_2 -макроглобуліном і активністю желатиназ у процесі лікування вказує на те, що цей інгібітор – важливий механізм стримування желатинолітичного потенціалу.

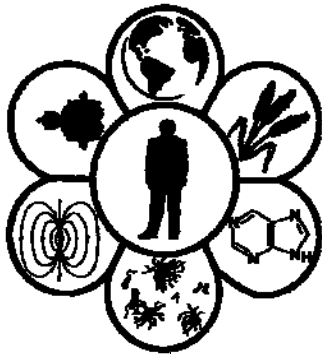
При онкогематологічних захворюваннях баланс у системі протеоліз-антипротеоліз залежить від типу проліферувальних клітин і перебігу захворювань. За впливу антрациклінових антибіотиків цей баланс порушується за рахунок змін як активності протеолітичних ферментів, так і концентрації їх інгібіторів.

Бібліографічні посилання

- Butylin, A.A., Panteleev, M.A., Ataulhanov, F.A., 2007. Prostranstvennaja dinamika svertyvanija krvi [The spatial dynamics of blood coagulation]. Rossijskij Himicheskij Zhurnal 51(1), 45–50 (in Russian).
- Gajdamaka, N.V., Parovichnikova, E.N., Zavalishina, L.J., Savchenko, V.G., Frank, G.A., 2009. Jekspressija matriksnyh metalloproteinaz i ih inhibitorov v kostnom mozge u bol'nyh ostrymi lejkozami [Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in the bone marrow of patients with acute leukemia]. Gematologija i Transfuziologija 54(2), 3–10 (in Russian).
- Glanc, S., 1999. Mediko-biologicheskaja statistika [Biomedical statistics]. Praktika, Moscow (in Russian).
- Hidalgo, M., Eckhardt, S.G., 2001. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. J. Natl. Cancer Inst. 93(3), 178–193.
- Hultberg, B., Sjögren, U., 1980. Diagnostic significance of lysosomal enzymes in different types of leukemias. Acta Med. Scand. 207, 105–110.
- Jarovaja, G.A., 2005. Bioregulirujushhie funkcii i patogenicheskaja rol' proteoliza. Fiziologicheskaja rol' i bio-

- himicheskie mehanizmy – reakcij ogranichenogo proteoliza [Bioregulatory functions and pathogenetic role of proteolysis. The physiological role and biochemical mechanisms – reactions limited proteolysis]. *Laboratornaja Medicina* 7, 81–90 (in Russian).
- Kessenbrock, K., Plaks, V., Werb, Z., 2010. Matrix metalloproteinases: Regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 14(1), 52–67.
- Mecham, R.P., 2012. Overview of extracellular matrix. *Curr. Protoc. Cell Biol.* 10, Unit 10.1. – doi: 10.1002/0471143030.cb1001s57.
- Pamyrskij, Y.E., 2009. Analiz stepeni strukturnoj i funkcional'noj odnotipnosti polivalentnogo inhibitora proteaz, soderzhashhegosja v podzheludochnoj zheleze zhivotnyh, i soevogo inhibitora tripsina [Analysis of the degree of structural and functional uniformity of the polyvalent protease inhibitor contained in the pancreas of animals, and soybean trypsin inhibitor]. *Dis. ... kand. biol. nauk. Blagoveshhensk (in Russian)*.
- Parfenova, E.V., Tkachuk, V.A., Men'shikov, M.J., Korshunov, V.A., Plexanova, O.S., Solomatyna, M.A., Bashtrykov, P.P., Berk, B.S., 2006. Aktivatory plazminogena i matriksnye metalloproteinazy pri jeksperimental'nom remodelirovanii arterij [Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in experimental arterial remodeling]. *Bjulleten' Jeksperimental'noj Biologii i Mediciny* 9, 273–276 (in Russian).
- Rozario, T., DeSimone, D.W., 2010. The extracellular matrix in development and morphogenesis: A dynamic view. *Dev. Biol.* 341(1), 126–140.
- Shevcova, A.I., Gordijenko, J.A., Shaul's'ka, O.E., Skoromna, A.S., 2013. Pat. 83196 UA, MPK G 01 N33/49 Sposib vyznachennja zhelatynaz u plazmi krovi [Method for determination of plasma gelatinases]; *Zajavnyk ta patentovlasnyk DZ «Dnipropetrovska medychna akademija MOZ Ukrai'ny» – zajavl. 26.03.13; opubl. 27.08.13, Bjul. 16 (in Ukrainian)*.
- Shevcova, A.I., Gordijenko, J.A., Shaul's'ka, O.E., Djachenko, L.M., 2014. Zminy proteazno-antyproteaznogo balansu pry lejkemii [Changes of protease-antyprotease balance for leukemia]. *Ukrai'ns'kyj Biohimichnyj Zhurnal* 86(5, dodatok 2), 35–36 (in Ukrainian).
- Veremeenko, K.N., Goloborod'ko, O.P., Kizim, A.I., 1988. Proteoliz v norme i pri patologii [Proteolysis in normal and pathological conditions]. *Zdorovja, Kiev (in Russian)*.
- Veremeenko, K.N., Kizim, A.I., Dosenko, V.E., 2000. α_2 -Makroglobulin: Struktura, fiziologicheskaja rol' i klinicheskoe znachenie [α_2 -Macroglobulin: Structure, physiological role and clinical significance]. *Laboratornaja Diagnostika* 2, 3–9 (in Russian).
- Wiedow, O., Meyer-Hoffert, U., 2005. Neutrophil serine proteases: Potential key regulators of cell signalling during inflammation. *J. Intern. Med.* 257(4), 319–328.

Надійшла до редколегії 27.03.2015



УДК 612.13+612.89

Зв'язки кровопостачання головного мозку студентів зі станом вегетативної нервової системи та факторами ризику

Л.Д. Коровіна, Т.М. Запорожець

Вищий державний навчальний заклад України «Українська медична стоматологічна академія», Полтава, Україна

Метою дослідження було визначення рівня кровопостачання головного мозку у студентів молодших курсів медичної академії та визначення його зв'язків зі станом вегетативної регуляції, поведінковими та аліментарними факторами. Проведено реоенцефалографічне дослідження стану вегетативної нервової системи та анкетування студентів молодших курсів медичної академії. У студентів зростання індексу маси тіла підвищувало імовірність погіршення кровопостачання головного мозку. Напруження механізмів адаптації супроводжувалося зменшенням реографічного індексу. Вище кровонаповнення судин головного мозку відповідало вищому відношенню «хвилинний об'єм крові / належний хвилинний об'єм крові», яке визначалося з урахуванням системного артеріального тиску. Фактором ризику зниження кровонаповнення є зниження різноманітності раціону, коли продукти різних груп включаються до раціону рідше, ніж двічі на тиждень, або взагалі виключаються з раціону. Збільшення стажу регулярного вживання алкоголю спричиняє зниження кровопостачання головного мозку та посилення асиметрії показників кровопостачання. Ефект алкоголю був суттєвим, незважаючи на молодий вік обстежених та низький рівень вживання алкоголю. Збільшення стажу та інтенсивності паління супроводжувалося погіршенням показників кровопостачання мозку. Студенти із кращим кровопостачанням мали кращу успішність навчання. Множинні кореляції показників кровопостачання з поведінковими факторами дозволяють стверджувати, що зменшення факторів ризику – контроль за масою тіла, забезпечення різноманіття та повноцінності раціону, обмеження вживання алкоголю навіть низьких доз, які на сьогодні вважаються безпечними, відмова від паління – все це дозволить поліпшити кровопостачання головного мозку.

Ключові слова: реоенцефалографія; вегетативний індекс; харчове різноманіття; алкоголь; маса тіла

Relations between blood supply of brain of students and condition of autonomic nervous system and risk factors

L.D. Korovina, T.M. Zaporozhets

“Ukrainian Medical Stomatological Academy” Higher State Educational Institution of Ukraine, Poltava, Ukraine

The purpose of our research was to estimate the brain blood supply level by rheoencephalography method in junior students of the Medical academy and to determine the blood supply links with the autonomic regulation state, behavioural and alimentary factors. Rheoencephalographic study, research of the autonomic nervous system state, heart rate regulation and questioning of 17–29 year-old students have been conducted. Basic hemodynamic indices were normal in all surveyed students. Increase in body weight index enhanced the probability of the brain blood supply deterioration. Adaptation mechanisms tension was accompanied by reduction of the rheographic index. Higher blood filling of the brain vessels corresponded to higher ratio “blood minute volume / due blood minute volume” defined taking into account the system arterial pressure. The quantity of links with indicators of the autonomic nervous system state was limited. Nonlinear dependence of the rheographic index on the Kerdo vegetative index was observed: the rheographic index value was the lowest in students with the autonomic balance by the Kerdo vegetative index; it was the highest in the group with the sympathetic prevalence. Risk factor of blood filling decrease was the reduction in the diet variety when foodstuffs of different groups were included into the diet less than twice a week, or they were excluded from the diet completely. Positive correlation of blood supply was observed more often with frequent consumption of fish, vegetables, and fresh fruits. Increase in the regular alcohol intake experience promoted decrease in brain blood supply and

Вищий державний навчальний заклад України «Українська медична стоматологічна академія», вул. Шевченка, 23, Полтава, 36011, Україна

Higher State Educational Institution of Ukraine “Ukrainian Medical Stomatological Academy”, Shevchenko Str., 23, Poltava, 36024, Ukraine

Tel.: +38-053-260-20-51. E-mail: lidijaz@mail.ru

increase in asymmetries of blood supply indicators. The effect of alcohol was essential, despite young age of surveyed students and low level of alcohol consumption. Increase in the experience and intensity of smoking was accompanied by deterioration of brain blood supply indicators. Students with the best blood supply had the better academic progress. Observed multiple correlations of blood supply indicators with behavioural factors allowed to assert that reduction of risk factors (control of body weight, variety and full value of a diet, refusal of smoking, alcohol restriction even below doses which are considered safe) would allow to improve the brain blood supply.

Keywords: rheoencephalography; vegetative index; food variety; alcohol; body weight

Вступ

Сучасні умови навчання студентів, особливо медичних спеціальностей, включають не лише високі навчальні навантаження, а і зниження фізичної активності та збільшення частоти стресових ситуацій, пов'язане, насамперед, із переходом на кредитно-модульну систему навчання. Соціальні проблеми, постійні зміни економічних умов викликають зміни процесів адаптації до навчання у вузі. Кровообіг мозку може залежати від різних чинників і, у свою чергу, впливати на якість життя та навчальної діяльності. Дослідження М.С. Гончаренко та співавторів (Goncharenko et al., 2006), як і низка інших, відзначають низький стан здоров'я студентів, який спостерігається останнім часом. Високі навчальні навантаження вимагають високої ефективності мозкової діяльності, а це залежить від рівня кровопостачання мозку (Baevskij et al., 1984; Kucherov et al., 2011).

Стан серцево-судинної системи тісно пов'язаний зі станом вегетативної нервової системи. Взаємодія серцево-судинної та нервової систем визначає характер розвитку подальших адаптаційних реакцій (Baevskij, 1979; Baevskij et al., 1984; Berezin, 1988). Активність нейровегетативних реакцій відображається функціональним станом серцево-судинної системи, який характеризує адаптаційну активність організму в цілому (Kucherov et al., 2011; Goncharenko, 2006). Але навіть у сучасних працях впливи вегетативної нервової системи на стан церебрального кровообігу залишаються чітко не визначеними (Goadsby, 2013).

Реоенцефалографія – метод, який дає можливість безпечного неінвазивного дослідження кровопостачання різних органів і тканин. За даними М. Bodo та F.J. Pearce, цей метод ефективний навіть порівняно з лазерною доплерівською флоуметрією, оскільки відображає не локальні особливості кровотоку, а кровопостачання досліджуваного регіону в цілому (Bodo and Pearce, 2004). Це підтверджується і в інших дослідженнях (Perez, 2014; Bodo et al., 2010).

Мета нашого дослідження – визначити рівень кровопостачання головного мозку у студентів молодших курсів медичної академії методом реоенцефалографії, оцінити його зв'язки зі станом вегетативної регуляції, поведінковими та аліментарними чинниками.

Матеріал і методи досліджень

У студентів двох курсів проводили дослідження кровообігу методом реоенцефалографії. Обстежили 40 юнаків і 37 дівчат віком 16–29 (середній вік $18,8 \pm 0,1$) років. Усі обстежені студенти дали згоду відповідно до вимог Токійської декларації Всесвітньої медичної асоціації та інших установчих документів з біоетики. У них проводили анамнестичне анкетування з метою одержання

даних про спосіб життя та наявність шкідливих звичок. Також визначали артеріальний тиск, частоту серцевих скорочень, розраховували похідні показники, визначали індекс адаптаційного потенціалу за Р.М. Басвським, досліджували стан вегетативної регуляції системи кровообігу за вегетативним індексом Кердо (ВІ), результатами активної ортостатичної проби та проби Дан'їні – Ашнера, проводили кардіоінтервалографію. Статистичний аналіз отриманих результатів включав визначення парних кореляційних зв'язків отриманих даних: розраховували коефіцієнти кореляції r Пірсона (для нормально розподілених показників) та τ Кендела (якщо хоча б один із показників не відповідав нормальному розподілу), аналізували множинні кореляційні зв'язки. У випадку визначення множинного кореляційного зв'язку розраховували коефіцієнт множинної кореляції r та для кожного незалежного показника стандартизовані коефіцієнти зв'язку $\beta = 0,49$. Множинну кореляцію вважали статистично значимою, якщо показники значимості P коефіцієнтів r і β були меншими 0,05.

Результати та їх обговорення

Аналіз результатів реоенцефалографії показав, що в обстежених студентів часто спостерігалися відхилення визначених показників від норми. В обох обстежених басейнах (внутрішньої сонної артерії та хребетної артерії) в обох півкулях значення реографічного індексу було вищим у дівчат, ніж у юнаків: у басейні внутрішньої сонної артерії ліворуч $1,81 \pm 0,10$ ум. од. у дівчат і $1,24 \pm 0,08$ ум. од. у юнаків ($P < 0,001$), у басейні внутрішньої сонної артерії праворуч – $1,22 \pm 0,06$ ум. од. у дівчат і $1,70 \pm 0,09$ ум. од. у юнаків ($P < 0,001$), у басейні хребетної артерії ліворуч – $1,37 \pm 0,09$ ум. од. у дівчат і $1,04 \pm 0,09$ ум. од. у юнаків ($P < 0,02$), у басейні хребетної артерії праворуч – $1,33 \pm 0,09$ ум. од. і $1,00 \pm 0,06$ ум. од. відповідно ($P < 0,002$). Значення дикротичного індексу в різних обстежених басейнах коливалися від 62,8% до 70,1% у юнаків та від 69,7% до 76,5% у дівчат. Діасистолічний індекс складав від 71,6% до 82,5% у юнаків та від 71,8% до 81,7% у дівчат.

Основні гемодинамічні показники відповідали нормі в усіх обстежених студентів. Середнє значення ВІ Кердо у юнаків становило $0,56 \pm 1,69$ ум. од. (незначна перевага парасимпатичного тону), у дівчат – $7,25 \pm 1,54$ ум. од. (перевага симпатичного тону), значимість різниці між показниками юнаків та дівчат – $P < 0,001$. Інші показники стану ВНС юнаків та дівчат не мали статистично значимої різниці. Збудливість симпатичного відділу вегетативної нервової системи (ВНС) за даними ортостатичної проби у 61,1% студентів відповідала нормі, а у 32,5% була підвищеною. Вегетативна реактивність парасимпатичного відділу ВНС за пробою Дан'їні – Ашнера у 37,7% обстежених була нормальною, а в 35,1% – зниженою. Визначено за даними кардіоінтер-

валографії вихідний вегетативний тонус (ВВТ): ейтонію (збалансований стан регуляторних систем вегетативної нервової системи) спостерігали у 52,7% студентів, ваготонію – у 40,5% обстежених. Вегетативна реактивність (ВР) була симпатикотонічною (нормотонічною) у 43,2% обстежених, у 33,8% – асимпатикотонічною, у 23,0% – гіперсимпатикотонічною. За співвідношенням ВВТ та ВР у 58,1% обстежених виявили незадовільну адаптацію.

Зворотні парні кореляції узагальненого показника кровонаповнення у басейні внутрішньої сонної артерії та у басейні хребтової артерії визначалися з масою тіла ($\tau = -0,39$, $P < 0,001$ та $\tau = -0,30$, $P < 0,001$ відповідно). Реографічні індекси зворотно корелювали з індексом маси тіла (ІМТ): у басейні внутрішньої сонної артерії ліворуч $r = -0,29$ ($P < 0,02$) та праворуч $r = -0,25$ ($P < 0,05$), у басейні хребтної артерії праворуч $r = -0,25$ ($P < 0,05$). В обстеженій групі ІМТ складав $21,8 \pm 0,4$ ум. од. (мінімум – 16,0, максимум 33,9 ум. од.). Також реогра-

фічні індекси зворотно корелювали з індексом адаптаційного потенціалу за Р.М. Баєвським, що відповідає зростанню РІ з поліпшенням стану адаптації: у басейні внутрішньої сонної артерії ліворуч $r = -0,20$ ($P < 0,05$) та праворуч $r = -0,16$ ($P < 0,05$), у басейні хребтної артерії праворуч $r = -0,18$ ($P < 0,05$).

Ступінь кровонаповнення у басейні внутрішньої сонної артерії також прямо корелював із відношенням «хвилиний об'єм крові / належний хвилиний об'єм крові» ($\tau = 0,35$, $P < 0,001$).

Кількість зв'язків із показниками стану вегетативної нервової системи була обмеженою. Статистично значиму кореляцію реографічного індексу з вегетативним індексом Кердо визначали тільки у басейні внутрішньої сонної артерії ліворуч – $r = 0,24$ ($P < 0,05$), що пояснюється нелінійною залежністю між цими показниками: величина РІ була найнижчою у студентів із вегетативною рівновагою за ВІ Кердо, найвищою – у групі із симпатичною перевагою в обох досліджених басейнах (рис.).

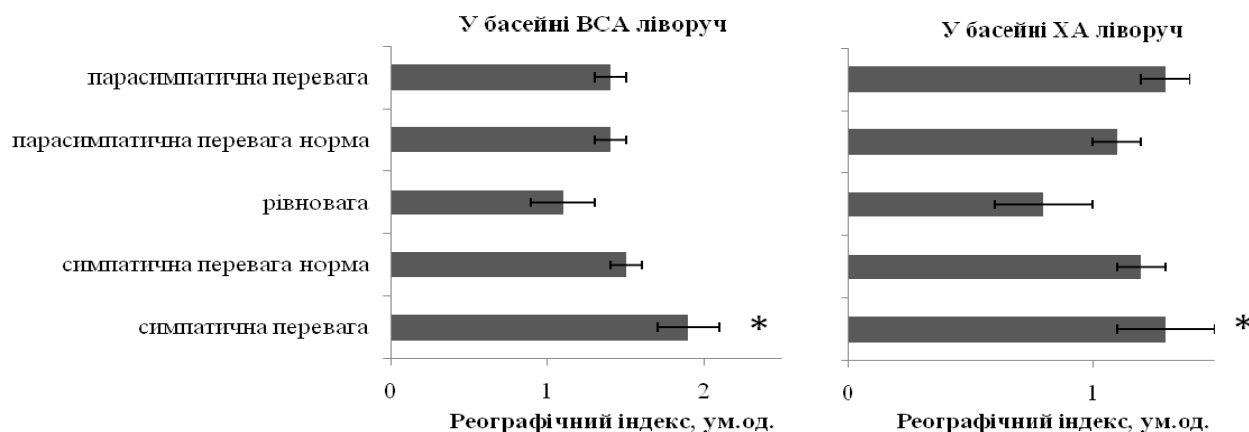


Рис. Величина реографічного індексу

у студентів із різним вегетативним тонусом за ВІ Кердо у басейнах внутрішньої сонної артерії та хребтної артерії:

* – різниця статистично значима порівняно з групою з вегетативною рівновагою

Аналіз показників кровопостачання мозку не виявив їх залежностей від вегетативної реактивності парасимпатичного відділу ВНС за пробою Дан'їні – Ашнера. Визначити залежності кровопостачання від показника збудливості симпатичного відділу ВНС за ортостатичною пробою було неможливо, оскільки абсолютна більшість обстежених мала нормальну збудливість.

Діастолічний індекс у правій півкулі корелював із вираженістю вегетосудинної дисфункції: у басейні внутрішньої сонної артерії $r = -0,20$ ($P < 0,01$), у басейні хребтної артерії $r = -0,36$ ($P < 0,002$). Також тонус дрібних артерій, як і тонус венул і наявність ознак порушення венозного відтоку у басейні хребтної артерії, корелювали з разовою дозою вживаного абсолютного етанолу на одиницю маси тіла ($\tau = 0,27$, $P < 0,01$, $\tau = 0,20$, $P < 0,05$ та $\tau = 0,29$, $P < 0,01$ відповідно).

Тонус венул у басейні внутрішньої сонної артерії корелював із середньою тривалістю серцевого циклу, що визначали як у кліно-, так і в ортоположенні, а також із модою в обох положеннях ($\tau = 0,25$, $P < 0,01$; $\tau = 0,23$, $P < 0,02$; $\tau = 0,23$, $P < 0,02$; $\tau = 0,24$, $P < 0,02$ відповідно), та зворотно – з індексом напруження та ІВР у кліноположенні ($\tau = -0,20$, $P < 0,05$ та $\tau = -0,22$, $P < 0,05$ відповідно). Тонус венул у басейні хребтної артерії

корелює зворотно з показником вегетативної реактивності ($\tau = -0,19$, $P < 0,05$).

Кровопостачання мозку мало зв'язки із зовнішніми чинниками та способом життя. Ступінь кровонаповнення у басейні хребтної артерії прямо корелював із кількістю психотравм за останній рік життя ($\tau = 0,23$, $P < 0,05$), відношенням «хвилиний об'єм крові / належний хвилиний об'єм крові» ($\tau = 0,24$, $P < 0,01$) та зворотно корелював із ростом і систолічним артеріальним тиском ($\tau = -0,45$, $P < 0,001$ та $\tau = -0,22$, $P < 0,02$ відповідно).

Отримані за результатами анкетування дані щодо особливостей харчування та способу життя мали зв'язки з кровопостачанням мозку. Так, РІ у басейні внутрішньої сонної артерії ліворуч зростає із ростом вживання молочнокислих продуктів і зменшувався з ростом часу занять спортом. Реографічний індекс у басейні внутрішньої сонної артерії праворуч мав вираженими лише зв'язки з масою тіла ($r = -0,28$, $P < 0,001$), із частотою вживання рослинної олії ($\tau = 0,22$, $P < 0,02$), із частотою вживання свіжих фруктів ($\tau = 0,21$, $P < 0,02$) та овочів ($\tau = 0,19$, $P < 0,05$), але систему вони не формували.

В обстеженій групі палили 51,3% юнаків і тільки одна дівчина. Виявили негативні кореляції стажу паління з реографічним індексом у басейні внутрішньої сонної

артерії (ліворуч $\tau = -0,21$, $P < 0,05$, праворуч – $\tau = -0,21$, $P < 0,05$), із реографічним індексом у басейні хребетної артерії (праворуч $\tau = -0,19$, $P < 0,05$). Стаж куріння корелював із часовим показником судинного тону у басейні внутрішньої сонної артерії та басейні хребетної артерії праворуч ($\tau = 0,23$, $P < 0,02$ та $\tau = 0,22$, $P < 0,05$ відповідно). Такі самі зв'язки були з інтенсивністю паління ($\tau = 0,23$, $P < 0,02$ та $\tau = 0,23$, $P < 0,02$ відповідно).

Тижнева доза абсолютного етанолу корелювала негативно з реографічним індексом у басейні хребетної артерії ліворуч ($\tau = -0,21$, $P < 0,02$), зв'язок праворуч не був статистично значимим, з асиметрією часового показника судинного тону у басейні хребетної артерії ($\tau = 0,34$, $P < 0,02$) та амплітудного показника судинного тону у басейні хребетної артерії ($\tau = 0,19$, $P < 0,05$). Разова доза абсолютного етанолу мала чіткіші зв'язки із показником тону дрібних та середніх артерій ($\tau = 0,25$, $P < 0,02$) та венозного відтоку ($\tau = 0,29$, $P < 0,01$) у басейні хребетної артерії, а разова доза абсолютного етанолу у розрахунку на кілограм маси тіла виявляла додатково зв'язки з показником тону венул у басейні хребетної артерії ($\tau = 0,20$, $P < 0,05$), дрібних і середніх артерій у басейні внутрішньої сонної артерії ($\tau = 0,21$, $P < 0,05$).

Також проведено аналіз множинних кореляційних зв'язків для виділення чинників, які можуть впливати на кровопостачання мозку. Спостерігалася множинна кореляція величини PI у басейні внутрішньої сонної артерії праворуч ($R = 0,55$, $P < 0,001$) із фактором статі та рівнем стресів: стандартизовані коефіцієнти зв'язку були для фактора статі ($\beta = 0,49$, $P < 0,001$) та рівня стресів ($\beta = 0,25$, $P < 0,02$). Тобто зростання кількості ситуацій, які емоційно сприймалися як стресові, у дівчат викликало підвищення величини PI у басейні внутрішньої сонної артерії праворуч. У басейні хребтової артерії кореляція з рівнем стресів була недостатньо значимою, а ліворуч не спостерігалася.

Реографічний індекс у басейні хребтової артерії праворуч мав залежність від маси тіла та частоти вживання молочнокислих продуктів. Коефіцієнт множинної кореляції склав $R = 0,45$ ($P < 0,001$). Стандартизовані коефіцієнти зв'язку були для маси тіла – $\beta = -0,38$ ($P < 0,001$), для частоти вживання молочнокислих продуктів – $\beta = 0,27$ ($P < 0,02$).

Узагальнений показник кровонаповнення також мав ряд зв'язків із чинниками способу життя. Спостерігалась пряма кореляція узагальненого показника кровонаповнення у басейні внутрішньої сонної артерії з частотою вживання риби, овочів та свіжих фруктів ($\tau = 0,24$, $P < 0,05$; $\tau = 0,34$, $P < 0,002$; $\tau = 0,33$, $P < 0,002$ відповідно), та зворотно – із частотою вживання сала ($\tau = -0,21$, $P < 0,05$). У басейні хребтової артерії кровонаповнення також корелювало з частотою вживання овочів і свіжих фруктів ($\tau = 0,23$, $P < 0,05$; $\tau = 0,26$, $P < 0,02$ відповідно), кількістю вживаної риби ($\tau = 0,37$, $P < 0,001$). Також ступінь кровонаповнення у басейні хребетної артерії корелював із показником різноманіття харчування ($\tau = 0,21$, $P < 0,05$). Показник різноманіття харчування розраховували за сумарною частотою вживання всіх основних груп продуктів харчування, вказаних в анкетах. Для узагальненого рівня кровонаповнення (підвищений, норма, знижений), який діагностовано за

показниками реоенцефалограми у басейні внутрішньої сонної артерії без урахування латеральності, визначено множинний кореляційний зв'язок із масою тіла, статтю, харчовим різноманіттям і стажем регулярного вживання алкоголю. Коефіцієнт множинної кореляції склав $r = 0,67$ ($P < 0,001$). Стандартизовані коефіцієнти зв'язку зареєстровані для маси тіла $\beta = -0,24$ ($P < 0,05$), харчового різноманіття $\beta = 0,25$ ($P < 0,01$), статі $\beta = 0,37$ ($P < 0,002$) та стажу регулярного вживання алкоголю $\beta = -0,20$ ($P < 0,05$). Ефект алкоголю був суттєвим, незважаючи на молодий вік обстежених та низький рівень вживання алкоголю (переважно слабоалкогольних напоїв). У басейні хребетної артерії множинний кореляційний зв'язок спостерігався з індексом маси тіла, показником статі та показником харчового різноманіття. Коефіцієнт множинної кореляції склав $r = 0,49$ ($P < 0,001$). Стандартизовані коефіцієнти зв'язку зареєстровані для індексу маси тіла $\beta = -0,25$ ($P < 0,02$), харчового різноманіття $\beta = 0,27$ ($P < 0,02$), статі $\beta = -0,27$ ($P < 0,02$).

Реографічні індекси і в басейні внутрішньої сонної артерії, і в басейні хребтової артерії корелювали із середнім балом успішності: у басейні внутрішньої сонної артерії ліворуч $r = 0,26$ ($P < 0,05$) і праворуч $r = 0,33$ ($P < 0,01$), у басейні хребетної артерії – праворуч $r = 0,27$ ($P < 0,05$).

У нашому дослідженні визначено відносно незначні зв'язки кровопостачання головного мозку зі станом вегетативної нервової системи та велику кількість зв'язків з аліментарними чинниками, вираженістю шкідливих звичок, поведінковими факторами. Це узгоджується з даними інших авторів, що за нормальних фізіологічних умов впливи симпатичної нервової системи на регуляцію мозкового кровообігу відіграють відносно малу роль на тлі домінування хімічних і метаболічних механізмів вазомоторної регуляції (Traustman and Rapela, 1975; Zhang et al., 2002; ter Laan et al., 2015), і лише у випадках важких патологічних станів, таких як інсульт, значимість симпатичного контролю мозкового кровотоку зростає (Traustman and Rapela, 1975; Goadsby, 2013). Однак є і класичні, і сучасні дослідження, у яких доведено важливу роль вегетативної інервації у церебральній ауторегуляції (Harper, 1972; Mitsis et al., 2009). Низкою досліджень показано, що ефекти симпатичної нервової системи проявляються в регуляції змін мозкового кровотоку, викликаних гемодинамічними змінами (Hamner, 2010; Perez, 2014).

Аналіз кореляційних зв'язків, які утворювали реографічні показники з дослідженими чинниками, дав можливість виділити ряд характерних залежностей. Так, підвищення індексу маси тіла є фактором ризику щодо зменшення кровопостачання мозку. Негативний вплив підвищення ІМТ на стан ВНС та системи кровообігу визначений у дослідженні підлітків І.А. Берсенєвою та Е.Ю. Берсенєвим, як і в дослідженнях інших груп пацієнтів (Berseneva and Bersenev, 2008; Chang, 2012; Soares-Miranda et al., 2012).

Підвищення судинного тону внаслідок вживання алкоголю, що спостерігалось в обстежених, збігається з даними Н.Д. Sesso та співавторів, які відзначали зростання ризику гіпертензії у споживачів алкоголю (Sesso et al., 2008). Негативні ефекти вживання слабоалкогольних напоїв також відзначають дослідники (Zhuk, 2011). Також відзначено ефекти підвищення або

зниження симпатичних впливів внаслідок вживання алкоголю, характер яких залежав від дози та стажу вживання (Spraak, 2010). Підвищення церебрального кровотоку, яке відзначають дослідники, спостерігається як ефект гострого впливу алкоголю (Gundersen, 2013), тоді як хронічними ефектами вживання алкоголю та куріння є зменшення церебральної перфузії (Gazdzinski, 2005, 2006).

Впливи вегетативної нервової системи на кровопостачання мозку не ідентичні, що виражається в обмеженій кількості надійних кореляційних зв'язків. Проте спостерігалися зв'язки з аліментарними чинниками. Це узгоджується з даними щодо позитивного впливу комплексу вітамінів із риб'ячим жиром і мінеральними добавками на кровопостачання мозку та нейропсихологічні показники, отриманими у дослідженні Amen et al. (2013). Впливи аліментарних чинників на автономну нервову систему показані також у дослідженнях Luyster et al. (2011).

Зв'язок реографічного індексу з успішністю навчання вказує на те, що застосування заходів, спрямованих на поліпшення кровопостачання мозку, не лише може мати терапевтичний ефект, а і дає можливість підвищити ефективність навчального процесу.

Висновки

В обстежених студентів зростання індексу маси тіла підвищувало імовірність гальмування кровопостачання головного мозку.

Напруження механізмів адаптації супроводжувалося зменшенням реографічного індексу.

Вище кровонаповнення судин головного мозку відповідало вищому відношенню «хвилинний об'єм крові / належний хвилинний об'єм крові», яке визначалося з урахуванням системного артеріального тиску.

Фактором ризику зниження кровонаповнення є зниження різноманіття раціону, коли продукти різних груп включаються до раціону рідше, ніж двічі на тиждень, або взагалі виключаються з раціону.

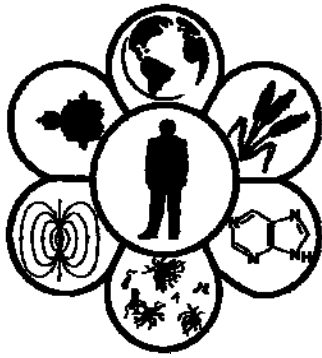
Краще кровопостачання головного мозку підвищує успішність навчання. Зменшення факторів ризику (контроль за масою тіла, забезпечення різноманіття та повноцінності раціону, припинення куріння, обмеження вживання алкоголю навіть найнижчих доз, які на сьогодні вважаються безпечними) дозволить поліпшити кровопостачання головного мозку.

Бібліографічні посилання

- Baevskij, R.M., Kirillov, O.I., Kleckin, S.Z., 1984. Matematicheskij analiz serdechnogo ritma pri stresse [Mathematical analysis of heart rhythm at stress]. Nauka, Moscow (in Russian).
- Berezin, F.B., 1988. Psihicheskaja i psihofiziologicheskaja adaptacija cheloveka [Mental and psychophysiological adaptation of the person]. Nauka, Leningrad (in Russian).
- Berseneva, I.A., Bersenev, E.J., 2008. Osobnosti vegetativnoj reguljacji ritma serdca i arterial'nogo davlenija u detej s izbytochnoj massoj tela [Features of vegetative regulation of a rhythm of heart and arterial pressure at children with superfluous weight of a body]. In: Variabel'nost' serdechnogo ritma: Teoreticheskie aspekty i prakticheskoe primenenie. Tez. Dokl. IV vseros. Simp. [Variability of a heart rhythm: Theoretical aspects and practical application. Abstracts IV All-Russian Simp.]. UdGU, Izhevsk, 51–54. (in Russian).
- Bodo, M., Pearce, F., Garcia, A., van Albert, S., Settle, T., Szebeni, J., Baranyi, L., Hartings, J., Armonda, R., 2010. *In vivo* cerebral blood flow autoregulation studies using rheoencephalography. Journal of Physics: Conference Series 224. International Conference on Electrical Bioimpedance. IOP Publishing Ltd. 012088. doi:10.1088/1742-6596/224/1/012088.
- Bodo, M., Pearce, F.J., 2004. Rheoencephalography (REG) as a non-invasive monitoring alternative for the assessment of brain blood flow. Materials of RTO HFM Symposium on "Combat Casualty Care in Ground Based Tactical Situations: Trauma Technology and Emergency Medical Procedures", St. Pete Beach, USA. RTO-MP-HFM-109, P3,1–18.
- Goadsby, P.J., 2013. Autonomic nervous system control of the cerebral circulation. In: Buijs, R., Swaab, D. (Eds.). *Handb. Clin. Neurol.* 117, 193–201.
- Goncharenko, M.S., Pasynok, V.G., Novikova, V.E., Martynenko, I.G., Samojlova, N.V., 2006. Ocinka stanu somatichnogo zdorov'ja studentiv vyshhijh uchbovyh zakladiv pry adaptacii do uchbovogo procesu [Estimation of a condition of somatic health of students of higher educational institutions at adaptation to educational process]. *Pedagogika, Psihologija ta Medyko-Biologichni Problemy Fizychnogo Vyhovannja i Sportu* 3, 12–15 (in Ukrainian).
- Hamner, J.W., Tan, C.O., Lee, K., Cohen, M.A., Taylor, J.A., 2010. Sympathetic control of the cerebral vasculature in human. *Stroke* 41(1), 102–109.
- Harper, A.M., Deshmukh, V.D., Rowan, J.O., Jennett, W.B., 1972. The influence of sympathetic nervous activity on cerebral blood flow. *Arch. Neurol.* 27(1), 1–6.
- Hernandez-Perez, M.J., Raichle, M.E., Stone, H.L., 1975. The role of the peripheral sympathetic nervous system in cerebral blood flow autoregulation. *Stroke* 6, 284–292.
- Kucherov, M.G., Kirichuk, A.I., Kodochogova, E.S., Olenko, E.S., Ekimova, N.V., Krovjakova, E.A., 2011. Gendernye razlichija adaptacionnyh osobennostej organizma u klinicheski zdorovyh lic [Gender distinctions of adaptable features of an organism at clinically healthy persons]. *Nauchnye Trudy III S'ezda Fiziologov SNG. Medicina-Zdorov'e, Moscow*, 226–227 (in Russian).
- Mitsis, G.D., Zhang, R., Levine, B.D., Tzanalaridou, E., Katritsis, D.G., Marmarelis, V.Z., 2009. Autonomic neural control of cerebral hemodynamic. *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.* 28(6), 54–62.
- Perez, J.J., 2014. To what extent is the bipolar rheoencephalographic signal contaminated by scalp blood flow? A clinical study to quantify its extra and non-extracranial components. *Biomed. Eng. Online* 13, 131.
- Sesso, H.D., Cook, N.R., Buring, J.E., Manson, J.E., Gaziano, J.M., 2008. Alcohol consumption and the risk of hypertension in women and men. *Hypertension* 51(4), 1080–1087.
- ter Laan, M., van Dijk, J.M.C., Elting, J.W.J., Staal, M.J., Absalom, A.R., 2015. Sympathetic regulation of cerebral blood flow in humans: A review. *Brit. J. Anaesth.* 114(4).
- Traystman, R.J., Rapela, C.E., 1975. Effect of sympathetic nerve stimulation on cerebral and cephalic blood flow. In: Langfitt, T.W., McHenry, L.C., Reivich, M., Wollman, H. (Eds.) *Cerebral circulation and metabolism*. Springer International Publishing AG, Berlin, Heidelberg. Part 15.
- Zhang, R., Zuckerman, J.H., Iwasaki, K., Wilson, T.E., Crandall, C.G., Levine, B.D., 2002. Autonomic neural control of dynamic cerebral autoregulation in humans. *Circulation* 106, 1814–1820.
- Baevskij, R.M., 1979. Prognozirovanie sostojanij na grani normy i patologii [Forecasting of states on the verge of a norm and a pathology]. *Medicina, Moscow* (in Russian).

- Amen, D.G., Taylor, D.V., Ojala, K., Kaur, J., Willeumier, K. 2013. Effects of brain-directed nutrients on cerebral blood flow and neuropsychological testing: A randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *Adv. Mind Body Med.* 27(2), 24–33.
- Luyer, M.D.P., Habes, Q., van Hak, R., Buurman, W., 2011. Nutritional stimulation of the autonomic nervous system. *World J. Gastroenterol.* 17(34), 3859–3863.
- Soares-Miranda, L., Sandercock, G., Vale, S., Santos, R., Abreu, S., Moreira, C., Mota, J., 2012. Metabolic syndrome, physical activity and cardiac autonomic function. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 28(4), 363–369.
- Zhuk, O., 2011. Advertising effects of beer consumption among young adults with a consideration of the welfare effects of advertising in the presence of search costs and negative externalities. University of Texas, Dallas.
- Chang, Y.W., Lin, J.D., Chen, W.L., Yen, C.F., Loh, C.H., Fang, W.H., Wu, L.W., 2012. Metabolic syndrome and short-term heart rate variability in adults with intellectual disabilities. *Res. Dev. Disabil.* 33(6), 1701–1077.
- Goadsby, P.J. 2013. Autonomic nervous system control of the cerebral circulation. *Handb. Clin. Neurol.* 117, 193–201.
- Spaak, J., Tomlinson, G., McGowan, C.L., Soleas, G.J., Morris, B.L., Picton, P., Notarius, C.F., Floras, J.S., 2010. Dose-related effects of red wine and alcohol on heart rate variability. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 298(6), H2226–H2231.
- Gundersen, H., van Wageningen, H., Grüner, R., 2013. Alcohol-induced changes in cerebral blood flow and cerebral blood volume in social drinkers. *Alcohol Alcohol.* 48(2), 160–165.
- Gazdzinski, S., Durazzo, T., Jahng, G.H., Ezekiel, F., Banys, P., Meyerhoff, D., 2006. Effects of chronic alcohol dependence and chronic cigarette smoking on cerebral perfusion: A preliminary magnetic resonance study. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 30(6), 947–958.
- Gazdzinski, S., Durazzo, T.C., Studholme, C., Song, E., Banys, P., Meyerhoff, D.J., 2005. Quantitative brain MRI in alcohol dependence: Preliminary evidence for effects of concurrent chronic cigarette smoking on regional brain volumes. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 29(8), 1484–1495.

Надійшла до редколегії 30.03.2015



УДК 579.8

Корекція дисбактеріозу піхви з використанням пробіотиків

С.І. Вальчук, Т.М. Шевченко, В.А. Шевченко, О.С. Воронкова, А.І. Вінніков

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпропетровськ, Україна

Порушення мікробіоценозу відкритих порожнин організму людини, знані як дисбактеріоз, виражаються у формуванні домінування у складі мікрофлори умовно-патогенних бактерій, які витісняють представників нормальної мікрофлори, що спричиняє виникнення розладів і погіршення стану здоров'я. Дисбактеріози піхви серед важких наслідків можуть включати підвищення ризику інфікування патогенними мікроорганізмами, через відсутність ефекту колонізаційної резистентності, у ряді випадків можуть бути спровоковані навіть втрати вагітності та безпліддя. У випадку розвитку дисбактеріозів виникає необхідність їх корекції, для чого застосовують антибіотики та пробіотичні препарати. Іноді застосування антибіотиків обмежене, тому потрібна така схема корекції, з використанням якої можна було б із високою ефективністю відновлювати склад мікрофлори. Мета цієї статті – оцінити ефективність схеми послідовного застосування двох пробіотичних препаратів на основі спорових бацил і лактобактерій. Запропоновано метод корекції мікробної екосистеми піхви мишей в умовах експериментального дисбактеріозу із застосуванням двохетапного введення пробіотичних препаратів. Схему апробовано на моделі експериментального дисбактеріозу піхви мишей. Найефективніша корекція дисбактеріозу відбувається за умов послідовного застосування біоспорину та вагілаку: повне відновлення мікрофлори піхви реєстрували на 20-ту добу з початку введення пробіотиків, що на 5 діб швидше порівняно зі стандартними схемами, які включають антибіотик і пробіотик. Відновлення складу мікрофлори піхви мишей виражалось у зростанні кількості лактобацил, зниженні кількості умовно-патогенних бактерій, а також у зростанні відношення «аероби : анаероби» до показників контрольної групи.

Ключові слова: бацили; лактобацили; мікробіоценоз

Correction of vaginal dysbiosis with the use of probiotics

S.I. Valchuk, T.N. Shevchenko, V.A. Shevchenko, O.S. Voronkova, A.I. Vinnikov

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine

Disbacteriosis of open cavities of the human body is connected with the formation of opportunistic bacteria dominance in the composition of the microflora, displacing the representatives of normal microflora which leads to disorders and aggravation of health. Among serious consequences of vaginal dysbiosis are increased risk of infection with pathogens through lack of effect of colonization resistance; in some cases it may result in pregnancy loss and infertility. The most common vaginal dysbiosis forms are due to predominance of staphylococci and enterobacteria, that actively colonize the lower genital tract. Therefore, disbacteriosis needs a correction for which antibiotics and probiotic preparations are used. Sometimes antibiotics are not effective, so the correction scheme is required which would be highly efficient in restoring the microflora composition. The aim of research was to investigate the efficacy of scheme of sequential use of two probiotic preparations, based on spore bacilli and lactobacilli. The method of correcting the microbial vaginal ecosystem of mice with experimental dysbiosis with the use of two-stage administration of probiotic preparations (biosporin and vagilak) was proposed. One of these preparation contains spore bacilli with high antagonistic potential, and the second one contains lactobacilli which are typical representatives of this habitat. The scheme was tested in the experimental model of vaginal dysbiosis of mice, created by intravaginal administration of cell suspension of *Staphylococcus aureus* culture. Cell suspension of probiotic microorganism cultures was administered intravaginally to animals, each preparation for 5 days in succession. It was found that the most effective correction of dysbiosis occurred by sequential use of Biosporin and Vagilak preparations: full renovation of vaginal microflora was recorded for 20 days from the start of probiotics use, that is, 5 day faster than when following the standard schemes, including antibiotic and probiotic. It was shown that renewal of vaginal microflora of mice was expressed in increasing number of lactobacilli 2.88 times returning to the level of control for the 20th day, reducing the number of staphylococci and enterobacteria 2.81 and 5.13 times, respectively, on the 10th day of the experiment, as well as increasing the ratio of

aerobes/anaerobes – 1/58 to that of the control group – 1/60. The results demonstrated the benefits of high efficiency of the proposed scheme, which allowed to recommend this method in further research to develop a framework for practical use.

Keywords: probiotic bacilli; lactobacilli; microbiocenosis

Введення

Серед основних проблем охорони здоров'я важливе місце посідає репродуктивне здоров'я – один з основних чинників сталого розвитку суспільства. Репродуктивна система (РС) жінки відрізняється особливою чутливістю до дії несприятливих чинників як екзогенного, так і ендогенного походження (Voronin et al., 2011; Andosova et al., 2013). Одним із найвідоміших процесів, що зачіпають екологічну рівновагу піхви, є дисбактеріоз (Bodnaryuk et al., 2011). Цей стан виражається як зміни складу мікрофлори певного біотопу. Обов'язкова умова для виникнення дисбактеріозу – наявність конкурентного росту одного або декількох умовно-патогенних мікроорганізмів (Rudakova et al., 2008; Hamoshina et al., 2009). У разі порушення колонізаційної резистентності (тобто стійкості до колонізації слизової оболонки умовно-патогенними або патогенними бактеріями) зменшується концентрація бактерій, що в нормі переважають (для даного біотопу це лактобацили) (Andosova et al., 2013; Bengmark, 2013), і зростає різноманіття та концентрація потенційно небезпечних мікроорганізмів, у деяких випадках навіть відбувається їх транслокація у внутрішні органи, зокрема у порожнину піхви та шлунково-кишковий тракт (Hamoshina et al., 2009; Nahorna and Starushchenko, 2009). У свою чергу, зміна складу мікробіоценозу РС жінки може спричинити порушення фізіологічного перебігу вагітності, її зрив, а також негативно вплинути на організм дитини під час проходження через родові шляхи матері (Dovhoshapko et al., 2009; Veropotvelyan et al., 2009; Voronin et al., 2011; MacIntyre et al., 2015).

Останніми роками для корекції дисбіотичних розладів все частіше використовують бактеріотерапевтичні препарати – пробіотики (Gorchuk, 2009). Пробіотики – препарати, що містять живі клітини мікроорганізмів або продукти їх метаболізму, які сприятливо впливають на організм людини шляхом оздоровлення її мікрофлори (Yankovskiy and Dyiment, 2008). Пробіотики переважно формуються на основі біфідобактерій, лактобацил і колибактерій. Сьогодні спектр потреб значно більший і тому виникли нові препарати на основі спорових аеробних бацил, дріжджів, ентерококів, аерококів тощо.

Враховуючи відомості про мікрофлору людини, можна передбачити, що найбільший антидисбіотичний ефект будуть справляти препарати, спрямовані на відновлення бактерій родів *Bifidobacterium* та *Lactobacillus* (Mastromarino et al., 2014; Castro et al., 2015).

Пробіотикотерапія – не лише ефективний, а і доволі безпечний засіб корекції та профілактики дисбіотичних порушень, а тому дослідження цього напрямку перспективні (Yankovskiy and Dyiment, 2008; Gorchuk, 2009; Voronin et al., 2011). Існують дані щодо вдалого застосування пробіотичних препаратів для корекції порушень мікробіоценозу піхви (Kravchenko et al., 2002).

Пробіотики на основі споротвірних бацил використовують переважно для корекції дисбіотичних явищ у кишечнику, але відомо, що вони володіють багатьма

властивостями, які можуть значно поширити спектр їх застосування. Пробіотики на основі споротвірних бацил мають високі ферментативну та антагоністичну активності проти патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів, вони, до того ж, здатні коригувати імунну відповідь (Kravchenko et al., 2002; Sorokulova et al., 2008). Про можливість використання бацил для корекції дисбактеріозів також свідчить те, що представників аеробних споротвірних бактерій виявляли у мікробіоценозі здорових породіль і новонароджених у кількостях 10^4 – 10^6 КУО/г проби (Redelinghuys et al., 2015). У той же час наголошується, що ці бактерії є транзиторними представниками мікрофлори. Вони не здатні до адгезії до клітин епітелію порожнин організму і з часом самовільно елімінуються з макроорганізму (Castro et al., 2015).

Найбільш застосовувані пробіотичні бацили – штами *Bacillus subtilis* та *B. licheniformis*, які були відібрані для включення в препарат «Біоспорин». Дані, отримані в різних клінічних закладах щодо застосування «Біоспорину», свідчать, що на всіх вивчених контингентах хворих відзначено його нешкідливість, добру переносимість та високу клінічну ефективність. Показано значне зниження кількості або повну елімінацію умовно-патогенних ентеробактерій та стафілококів, а також грибів роду *Candida* з відновленням показників нормобіоценозу. Бактерії, що входять до складу «Біоспорину», володіють спорідненістю з лактобактеріями. Це дає підставу для ефективного застосування цього препарату при інфекційних гінекологічних захворюваннях (кандидоз, бактеріальний вагіноз). Зокрема, висока клінічна ефективність «Біоспорину» продемонстрована у гінекологічній практиці, особливо для лікування вульвовагінального кандидозу, бактеріального вагінозу та вагініту (Sorokulova et al., 2008).

Існує ціла низка схем корекції дисбактеріозу, які можуть включати певні пробіотики. У той же час єдиної загальноприйнятої схеми не існує, бо вибір пробіотиків повинен здійснюватися з урахуванням ефективності їх дії в кожному окремому випадку (Mastromarino et al., 2014; Castro et al., 2015; MacIntyre et al., 2015). Отже, очевидно те, що існує необхідність подальшого вивчення та розроблення напрямів корекції дисбактеріозів із використанням пробіотичних препаратів для нормалізації або профілактики екологічної рівноваги представників мікрофлори піхви.

Тому мета нашої статті – оцінити ефективність схеми послідовного застосування двох пробіотичних препаратів на основі спорових бацил і лактобактерій.

Матеріал і методи досліджень

Моделювання дисбактеріозу піхви здійснювали на білих лабораторних мишах, шляхом інтравагінального введення суспензії клітин добової культури *Staphylococcus aureus*, що містила 1×10^9 КУО/мл в об'ємі 50 мкл. Штам *S. aureus*, використаний для досліджень, входить до колекції культур кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Дніпропетровського національного універ-

ситету ім. Олеса Гончара. Його було виділено з відокремлюваного піхви жінок із дисбактеріозом.

Для проведення експериментів тварин поділено на три групи:

- група 1 (контроль) – здорові тварини, n = 10;
- група 2 (контроль дисбактеріозу) – тварини з дисбіозом, для яких не застосовували корекційні заходи, n = 12;
- група 3 – тварини з дисбактеріозом, яким послідовно вводили бактерії, отримані з препаратів «Біоспорин» і «Вагілак», n = 10.

Тваринам із дисбактеріозом протягом 5 діб одноразово вводили 50 мкл суспензії клітин із препарату «Біоспорин», що містила 1×10^9 клітин/мл. Через 5 діб після завершення введення препарату тваринам починали вводити (одноразово, протягом 5 діб) суспензію клітин із пробіотика «Вагілак», що в об'ємі 50 мкл містила 1×10^9 клітин/мл.

Дослідження змін складу мікробіоценозу піхви за впливу пробіотиків відстежували за змінами якісного та кількісного вмісту бактерій. Ідентифікацію бактерій проводили відповідно до переліку ознак, наведених у Визначнику бактерій Берджі (Кієг, 1984) та за методиками, наведеними у Наказі № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» від 22.04.1985 р. (Об унификации..., 1985). Взяття матеріалу в експериментальних тварин проводили шляхом відбору виділень піхви уніфікованим стерильним ватним тампоном, проводили змив із нього в 1 мл стерильного розчину натрію хлориду (масова частка солі – 0,5%). З отриманого змиву здійснювали висів аліквот (по 50 мкл) на середовища Ендо, лактобакагар, стафілококовий агар, стрептококовий агар, м'ясопептонний агар. Для визначення бактерій роду *Gardnerella* висівали зразок на м'ясопептонний бульйон (МПБ) із додаванням лізованої крові (3%), глюкози (1%) та триптофану (0,2%); на м'ясопептонному агарі (МПА) із

сироваткою для визначення *Corynebacterium*. Для подальшої ідентифікації та вивчення деяких властивостей виділених бактерій проводили пересіви на середовища Чистовича, МПА із додаванням крові (3%), на МПА із желатиною (15%), МПБ із додаванням триптофану та нітратів, на середовища Гісса з індикаторами та цукрами (глюкоза, лактоза, маніт), на лужне середовище, МПА із жовчю (40%) (Eschenbach, 2007; Нау, 2009). Бактерії культивували в ексикаторі зі свічкою (за підвищеного парціального тиску CO₂).

Для визначення анаеробів проводили висів аліквот (по 50 мкл) із розведень змиву 10^{-2} – 10^{-4} (Dyachenko et al., 2000) на тіогліколеве середовище, лактобакагар, на середовища Кітт – Тарощі та Блаурока та на 5% кров'яний агар із додаванням нітрату (1%) та фумарату (1%). Культивування анаеробів проводили в анаеростаті, заповненому інертним газом.

Результати досліджень кількісного складу мікрофлори піхви наведено у вигляді середнього з похибкою ($M \pm m$).

Результати та їх обговорення

Зазвичай для корекції стану мікрофлори використовують один пробіотичний препарат (Mastromarino et al., 2014; Castro et al., 2015). Ми запропонували експериментальну схему корекції дисбіозу, яка включає застосування двох препаратів поспіль. На першому етапі вводили пробіотик «Біоспорин», компонентами якого є спорові бацили, які мають активну антагоністичну дію. На другому етапі вводили «Вагілак» – пробіотик, основним компонентом якого є лактобацили. Цей препарат використовували для відновлення нормальної кількості лактобактерій до показника норми. Отримані результати корекції стану мікрофлори піхви мишей наведено у таблицях 1 і 2.

Таблиця 1

Частота виявлення бактерій, виділених із піхви мишей з експериментальним дисбактеріозом до та після двохетапного введення пробіотиків «Біоспорин» і «Вагілак» (lg КУО/мл)

Бактерії	Група 1 (контроль), n = 10	Група 2 (контроль дисбактеріозу), n = 12	Група 3 (дисбактеріоз), n = 10	Група 3 (коригування дисбактеріозу), n = 10		
				уведення пробіотика «Біоспорин» (5 діб)		уведення пробіотика «Вагілак» (5 діб)
				термін введення та час після завершення введення препаратів		
				5 + 5 ^Δ	5 + 5 ^Δ	25 ^Δ
доба від початку експеримента						
10-та						
20-та						
40-ва						
<i>Staphylococcus</i>	10/100	12/100	10/100	10/100	10/100	10/100
<i>Enterobacteriaceae</i>	1/10	12/100	10/100	5/50	6/60	1/10
<i>Bacillus</i>	2/20	6/50	4/40	10/100	3/30	2/20
<i>Lactobacillus</i>	10/100	9/75	6/60	8/80	10/100	10/100

Із наведених у таблицях даних видно, що дисбактеріоз у контрольній групі 2 та у дослідній групі 3 мав значну подібність показників, що свідчить про відтвореність отриманої моделі. Порівняння даних по групі 3, отриманих після корекційних заходів з уживанням двох пробіотичних препаратів, із контролем норми та дисбіозу показало, що частота виявлення умовно-патогенних і транзитних бактерій у разі застосування запропонованої схеми знижувалася порівняно з групою

тварин, яким не вводили препарати для корекції дисбактеріозу. Найзначніше зниження частоти виявлення зафіксоване для ентеробактерій: зі 100% до 50% після завершення введення «Біоспорину» (5-та доба), тоді як у контролі на той же час частота виявлення ентеробактерій не знижувалася. Частота виявлення мікроаерофільних лактобацил зростала з 60% при дисбактеріозі до 80% після введення «Біоспорину» і до 100% після введення «Вагілаку», тоді як за самовільних змін у

мікробіоценозі піхви тварин групи 2 цей показник становив 75%. Слід зазначити, що після введення «Біоспорину» зросла до 100% частота виявлення бактерій роду *Bacillus*, а на 20-ту добу експерименту після уведення «Вагілаку» значно знижувалася (до 30%), що є доброю ознакою. Натомість частота виявлення стафілококів лишалася високою (100%), що, з огляду на таку ж високу частоту їх виявлення у здорових інтактних тварин, може вважатися нормальним.

Уведення застосованих пробіотичних препаратів сприяло також зниженню кількісного показника умовно-патогенних бактерій. Кількість цих бактерій почала знижуватися вже після застосування «Біоспорину». Індекс «аероби : анаероби» становив 1 : 54, коли при дисбактеріозі його значення було у групі 2 – 1 : 137, у групі 3 – 1 : 110, а в контрольній групі – 1 : 60. Однак кількість стафілококів порівняно з дисбактеріозом (група 2) була меншою на 10-ту добу – у 2,81 раза, а ентеробактерій – у 5,13 раза. На 20-ту добу експерименту після введення

«Вагілаку» кількість стафілококів зменшилася майже до показника контролю, а на 40-ву добу була трохи менша за контроль. Кількість ентеробактерій також зменшилася на 40-ву добу, але була більшою за контроль. Після застосування першого пробіотика зі схеми («Біоспорину») не відмічали відновлення кількісного показника мікроаерофільних лактобацил: на 10-ту добу експерименту після введення «Біоспорину» він становив $1,65 \pm 0,80$ Іг КУО/мл, що було менше значення контрольної групи та значення при дисбактеріозі (контроль 2) у 3,98 та 1,35 раза відповідно. Але вже на 20-ту добу експерименту після введення «Вагілаку» кількісний показник мікроаерофільних лактобацил збільшився у 2,88 раза порівняно із показником при дисбактеріозі та становив $2,24 \pm 0,98$ Іг КУО/мл і майже досяг контрольного показника $2,25 \pm 1,03$ Іг КУО/мл. Індекс «аероби : анаероби» вже на 5-ту добу після завершення введення «Вагілаку» становив 1 : 59, а на 25-ту добу – 1 : 58, що відповідало значенню контрольної групи 1 : 60.

Таблиця 2

Кількісний склад бактерій, виділених із піхви мишей з експериментальним дисбактеріозом до та після двохетапного введення пробіотиків «Біоспорин» і «Вагілак» (Іг КУО/мл)

Бактерії	Група 1 (контроль), n = 10	Група 2 (контроль дисбактеріозу), n = 12	Група 3 (дисбактеріоз), n = 10	Група 3 (коригування дисбактеріозу), n = 10		
				уведення пробіотика «Біоспорин» (5 діб)		уведення пробіотика «Вагілак» (5 діб)
				термін уведення та ^Δ час після завершення введення препаратів		
				5 + 5 ^Δ	5 + 5 ^Δ	25 ^Δ
доба від початку експерименту						
				10-та	20-та	40-ва
<i>Staphylococcus</i>	2,11 ± 0,83	2,72 ± 1,49 [×]	2,57 ± 1,25	2,27 ± 1,05 [×]	2,13 ± 0,78 [×]	2,09 ± 0,92 [×]
<i>Enterobacteriaceae</i>	1,60*	2,46 ± 1,41 [×]	2,61 ± 0,98	1,75 ± 0,81	1,73 ± 1,12	1,78*
<i>Bacillus</i>	1,30*	2,08 ± 1,09 [×]	2,42 ± 1,20	1,88 ± 0,88 [×]	1,64 ± 0,87 [×]	1,60*
<i>Lactobacillus</i>	2,25 ± 1,03	1,78 ± 0,88 [×]	1,70 ± 0,65	1,65 ± 0,80	2,24 ± 0,98	2,25 ± 0,99

Примітки: * дані, отримані для 1–2 тварин; × визначено статистично достовірні відмінності відносно контрольної групи 1.

У підсумку слід зазначити, що проведені на останню (40-ву) добу експерименту висіви показали, що відбулося відновлення складу мікрофлори піхви мишей. За умов двохетапного уведення пробіотиків «Біоспорин» і «Вагілак» зменшувався час відновлення складу мікрофлори, що свідчить про переваги пропонованої схеми. Час відновлення становив 20 діб, проти 25 діб у разі використання стандартної схеми, що включає замість «Біоспорину» антибіотик кліндаміцин. Індекс «аероби : анаероби» сягав значень норми – 1 : 58, за показника контрольної групи 1 : 60. Контрольне вивчення кількісного показника лактобацил на 40-ву добу експерименту дозволило визначити, що кількість мікроаерофільних лактобацил відновлювалася до рівня норми.

Для стафілококів зафіксовано повернення кількісного показника до значення контролю, причому у групі тварин, для яких застосовували послідовне уведення двох пробіотиків, зниження кількості стафілококів виявилось максимально ефективним: їх кількість стала меншою за контрольну. Для ентеробактерій також показано зменшення частоти виявлення: у випадку застосування схеми «Біоспорин + Вагілак» їх виявлено лише в одній тварині, як і в контролі. Отже, спосіб корекції дисбактеріозу піхви мишей шляхом двохетапного використання пробіотиків «Біоспорин» і «Вагілак» показав високу ефективність щодо відновлення нормобіозу.

Ще раз важливо зазначити, що бацили є транзиторними представниками мікрофлори піхви, вони поступово мають зникати (Redelinghuys et al., 2015; Suarez, 2015), особливо якщо до системи буде введено бактерії, які володіють більш вираженим колонізаційним потенціалом, наприклад, лактобацили, для яких піхва – типовий біотоп (Sidorova et al., 2005; Kaewsrichan et al., 2006; Namoshina et al., 2009; Balkus et al., 2011). Отже, використання самих бацилярних пробіотиків, вирішуючи проблему з видаленням патогенів, лише відкритим питанням про відновлення лактобацилярного компонента мікрофлори піхви, тому обмежитись використанням самих бацил для повної корекції складу мікрофлори репродуктивної системи неможливо.

Висновки

1. Розроблено метод корекції мікробної екосистеми піхви мишей в умовах експериментального дисбактеріозу із застосуванням двохетапного уведення пробіотичних препаратів.

2. Найефективніша корекція дисбактеріозу відбувається у разі застосування «Біоспорину» з наступним уведенням «Вагілаку»: повне відновлення мікрофлори піхви реєструвалося на 20-ту добу з початку уведення

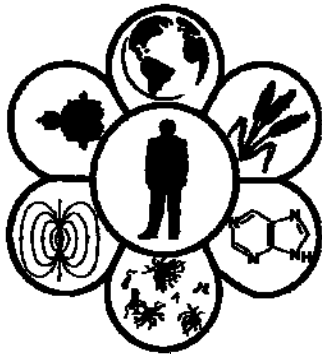
пробіотиків, що на 5 днів швидше порівняно зі стандартними схемами, які включають антибіотик і пробіотик.

3. Відновлення складу мікрофлори піхви мишей виражалося у зростанні кількості лактобацил до значення норми на 20-ту добу, зниженні кількості стафілококів та ентеробактерій у 2,81 та 5,13 рази відповідно вже на 10-ту добу експерименту, а також у зростанні відношення «аероби : анаероби» – 1 : 58 до показника контрольної групи – 1 : 60.

Бібліографічні посилання

- Andosova, L.D., Kontorshchikova, K.N., Kachalina, O.V., Belov, A.V., Gonova, E.S., Kudelkina, S.I., 2013. Charakteristika biotsenozov urogenitalnogo trakta u zhenshin reproduktyvnogo vozrasta [The characteristic of biocenosis of urogenital tract in women]. *Clin. Lab. Diagn.* 1, 51–53 (in Russian).
- Balkus, J., Jaoko, W., Mandaliya, K., Richardson, B.A., Masese, L., Gitau, R., Kiarie, J., Marrazzo, J., Farquhar, C., Scott, McClelland R., 2011. The post-trial effect of periodic presumptive treatment for vaginal infections on the incidence of bacterial vaginosis and *Lactobacillus* colonisation. *Sex. Transm. Inf.* 87, 79–80.
- Bengmark, S., 2013. Gut microbiota, immune development and function. *Pharmacol. Res.* 69(1), 87–113.
- Bodnaryuk, O.I., Andriyets, O.A., Sakriyer, A.L., Oleksyna, N.M., Andriyets, A.V., 2011. Rol bakterialnogo vahinozu v rozvytku zapalnykh zakhvoryuvan orhaniv maloho taza u divchat-pidlitkiv [The role of bacterial vaginosis in the development of inflammatory diseases of the pelvic organs in adolescent girls]. *Buk. Med. Herald.* 15(1), 17–19 (in Ukrainian).
- Castro, A., Gonzalez, M., Tarin, J.J., Cano, A., 2015. Role of probiotics in obstetrics and gynecology. *Nutr. Hosp.* 31(Suppl. 1), 26–30.
- Dovhoshapko, O.M., Hovorukha, I.T., Shpatusko, M.I., 2009. Korektsiya dysbiozu pikhvy u vahitnykh zi zvychnym nevyynoshuvanniam [Correction of vaginal dysbiosis in pregnant with habitual abortion]. *Meditsynskie Aspekti Zdorov'ia Zhenshchiny* 6, 50–52 (in Ukrainian).
- Dyachenko, V.F., Biryukova, S.V., Starobinets, Z.H., 2000. Laboratorna diahnozyka hniyno-zapalnykh zakhvoryuvan, obumovlenykh asporohennymy anaerobnymy mikroorganismamy [Laboratory diagnosis of inflammatory diseases caused by anaerobic microorganisms asporohennymy]. Kharkiv (in Ukrainian).
- Eschenbach, D.A., 2007. Bacterial vaginosis: Resistance, recurrence, and/or reinfection? *Clin. Infect. Dis.* 44, 220–221.
- Gopchuk, E.N., 2009. Primenenie probiotikov pri vospalitelnykh ginekologicheskikh zabolovaniyah [Use of probiotics under inflammatory gynecological disease]. *Zdorov'e Zhenshchiny* 6, 140–144 (in Russian).
- Hamoshina, M.B., Radzinskij, V.E., Kalendzhian, A.S., Rubtsova, A.Y., 2009. Narusheniya mikrobiotsenoza urogenitalnogo trakta: Grani problemy, perspektivy korektsii i profilaktiki [Violations of urogenital tract microbiocenosis: The verge of problems, prospects of correction and prevention]. *Ros. Vestn. Akush. Gin.* 3, 25–30 (in Russian).
- Hay, P., 2009. How important are the newly described bacteria in bacterial vaginosis? *Sex. Transm. Inf.* 85, 240–241.
- Kaewsrichan, J., Peeyananjarassri, K., Kongprasertkit, J., 2006. Selection and identification of anaerobic lactobacilli producing inhibitory compounds against vaginal pathogens. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 48(1), 75–83.
- Kravchenko, O.V., Hutsulyak, R.V., Yanovskyy, D.S., 2002. Zastosuvannya probiotyka Symbiter v kompleksnomu likuvanni bakterial'nykh vahinoziv [Use of probiotic Symbiter in complex treatment of bacterial vaginosis]. *Pediatrica, Akusherstvo ta Hinekologiya* 5, 100–102 (in Ukrainian).
- Krieg, N.R. (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1984. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- MacIntyre, D.A., Chandiramani, M., Lee, Y.S., Kindinger, L., Smith, A., Angelopoulos, N., Lehne, B., Arulkumaran, S., Brown, R., Teoh, T.G., Holmes, E., Nicholson, J.K., Marchesi, J.R., Bennett, P.R., 2015. The vaginal microbiome during pregnancy and the postpartum period in a European population. *Sci. Rep.* 5, 8988.
- Mastromarino, P., Hemalatha, R., Barbonetti, A., Cinque, B., Cifone, M.G., Tammara, F., Francavilla, F., 2014. Biological control of vaginosis to improve reproductive health. *Indian J. Med. Res.* 140, S91–S97.
- Nahorna, V.F., Starushchenko, T.Y., 2009. Mikroekologiya statevykh shlyakhiv u razi khronichnykh zapal'nykh protsesiv orhaniv reproduktyvnoyi systemy [Microecology of genital tract in chronic inflammation of the reproductive system]. *Zdorov'e Zhenshchiny* 1, 154–156 (in Ukrainian).
- Ob unifikatsii mikrobiologicheskikh (bakteriologicheskikh) metodov issledovaniia, primeniaemih v kliniko-diahnosticheskikh laboratoriiakh lechebno-profilakticheskikh ucherezhdenni № 535 (1985) [About the unification of microbiological (bacteriological) research methods used in clinical diagnostic laboratories of medical institutions: The order]. *MOZ USSR, Moscow* (in Russian).
- Redelinghuys, M.J., Ehlers, M.M., Dreyer, A.W., Kock, M.M., 2015. Normal flora and bacterial vaginosis in pregnancy: An overview. *Crit. Rev. Microbiol.* 2, 1–12.
- Rudakova, E.B., Mozgovoy, S.I., Lazareva, O.B., 2008. Bakteriálny vaginoz [Bacterial vaginosis]. *Lech. Vrach.* 6, 61–65.
- Sidorova, I.S., Vorobjov, A.A., Borovkova, E.I., 2005. Mikrobiotsenoz polovyih putey zhenshin reproduktyvnogo vozrasta [Microbiocenosis of genital tract of women of reproductive age]. *Akush. Gin.* 2, 7–9.
- Sorokulova, I.B., Safronova, L.A., Vinogradov, V.P., Lapa, S.V., Starenkaia, S.Y., Tishkevich, V.M., Hilko, T.V., 2008. Korektsiia Biosporinom narushenij mikrobiotsenoza kishechnika u novorozhdennykh detey [Correction of newborn intestinal microbiocenosis discharge by Biosporin]. *Ros. Vestn. Perinatol. Pediatr.* 5, 17–19 (in Russian).
- Suarez, J.E., 2015. Autochthonous microbiota, probiotics and prebiotics. *Nutr. Hosp.* 31(Suppl. 1), 3–9.
- Veropotvelyan, P.N., Potapov, V.A., Veropotvelyan, N.P., Radchenko, V.V., Shevchenko, A.S., 2009. Sovremennyi vzglyad na problemu bakterialnogo vaginoza [Modern approach to the problem of bacterial vaginosis]. *Zdorov'e Zhenshchiny* 2, 143–147 (in Russian).
- Voronin, K.V., Chuyko, V.I., Nahla, B.S., 2011. Bakteriálny vaginoz beremennykh: Problemy i resheniya [Bacterial vaginosis of pregnant women: Problem and solutions]. *Klin. Med.* 16(4), 1–9.
- Yankovskiy, D.S., Dyiment, G.S., 2008. Ispolzovanie probiotikov s tselyu uluchsheniya reproduktyvnogo zdorov'ia zhenshchiny [The use of probiotics to improve women's reproductive health]. *Zdorov'e Zhenshchiny* 2, 161–170 (in Russian).

Надійшла до редколегії 29.03.2015



УДК 612.176+612/014.4

Вплив методів вимірювання електричного імпедансу на відтворення двовимірної томограми біологічних тканин

Є.М. Сніжко, М.М. Мілих, Е.М. Гасанов

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпропетровськ, Україна

Досліджено різні методи інжекції змінного струму через пару електродів, які розташовані по периметру досліджуваного об'єкта. Вимірювали потенціали на інших електродах, розташованих по периметру, для одержання внутрішнього розподілу провідності біологічних тканин методом електроімпедансної томографії. Використовували пакет обчислень розподілу потенціалів та відтворення зображень EIDORS. Обчислення проведено для 16 електродів, розташованих на однакових відстанях по периметру. Усередині об'єкта з однорідною провідністю розташовані дві області підвищеної провідності. Оцінено вплив методів інжекції струму на точність відтворення двовимірного розподілу провідності всередині об'єкта для алгоритмів абсолютного та різницевого методів розрахунку томограми. Встановлено переваги, недоліки та галузі застосування дипольного (на сусідні електроди), полярного (на протилежні електроди) та додаткового (на електроди, які зміщені чверть кола) методів інжекції струму. Наведено порівняльну діаграму похибок максимального відхилення та середньоквадратичних похибок відтворення розподілу провідності.

Ключові слова: електроімпедансна томографія; метод кінцевих елементів; зображення провідності; EIDORS; електроди

Effects of electrical impedance measuring methods on two-dimensional tomogram recovery of biological tissues

Y.M. Snizhko, M.M. Milykh, E.M. Gasanov

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine

The purpose of electrical impedance tomography is to obtain the electrical impedance distribution in the domain of interest by injecting the currents or applying voltages and measuring voltages or currents via a number of electrodes that are mounted on the boundary of the domain. We investigated the influence of various alternating current injection methods on conductivity allocation recovery in biological tissues. We used 16 electrodes allocated uniformly on a circle perimeter. The research technique includes the mathematical modeling by finite element method with 576 nodes. The current injection was performed through two electrodes located nearby (dipole assignment), opposite (polar assignment) or with a shift by 3 electrodes (a quarter of circle). We registered the potential differences between other electrodes for calculation of the internal conductivity allocation by the finite element method. The study revealed that dipole current injection improved the sensitivity of the method, and polar injection refined the resolution capability. We used the absolute and difference calculation methods implemented in the programming package of potentials allocation and image reconstruction EIDORS (Electrical Impedance and Diffuse Optical Tomography Reconstruction Software). EIDORS is an open source software system for image reconstruction in the electrical impedance tomography and diffuse optical tomography, designed to facilitate collaboration, testing and new research in these fields. Several numerical examples with inclusion of various convex and non-convex smooth shapes (e.g. circular, elliptic, square-shaped) and sizes are presented and thoroughly investigated. The experiments revealed phantoms at round form discontinuities of conductivity. As an accuracy criterion, we selected mean-square and maximum deviation values of the reconstructed image from the true conductivity allocation. The study showed the advantages, lacks and application fields of dipole, polar and other methods of the current injection. The experiments demonstrated the optimal parameters for reconstruction of internal conductivities at various methods of stimulation. The model with polar electrodes showed the best results by the criterion of maximum deviation. The model with electrodes shifted on a circle quarter revealed the best results by mean-square error criterion.

Keywords: electrical impedance tomography; finite element method; resistivity images; EIDORS; electrodes

Вступ

Електрична імпедансна томографія – перспективний метод відтворення зображення у зрізах біологічних тканин за допомогою електричного зондування та реконструкції розподілу імпедансу. Завдяки тому, що різні тканини мають різний імпеданс, існує можливість диференціювати їх зображення та виявляти фізіологічні зміни (Colton and Kress, 1992; Kim et al., 2004; Bera and Nagaraju, 2012). Провідність тканин зумовлена двома механізмами. Для постійного струму та струму низької частоти (до декількох десятків кілогерц) електричний струм утворюється за рахунок руху позитивних і негативних іонів уздовж силових ліній зовнішнього електричного поля. Біологічні тканини мають складну будову, в них містяться як іони, так і великі органічні молекули, які не роблять внеску до струмопровідності, але мають величезний коефіцієнт поляризації та формують струм зміщення, залежний від частоти. Змінне електричне поле мінятиме з певною частотою як просторову орієнтацію молекул, які поляризуються, так і напрям дрейфу часток, причому одна і та сама частка може брати участь в обох процесах. Внесок струму зміщення до сумарної величини струму зростає у міру збільшення частоти зовнішнього поля. Припустимо, що зовнішнє поле змінюється синусоїдально:

$$U = A \cdot \sin(2\pi ft),$$
$$\frac{dU}{dt} = A \cdot 2\pi f \cdot \cos(2\pi ft),$$
$$I = C \cdot A \cdot 2\pi f \cdot \cos(2\pi ft).$$

Таким чином, у разі синусоїдального зовнішнього поля струм зміщення лінійно зростає зі збільшенням частоти. Але це так тільки у тому випадку, коли ємність не залежить від частоти. Для біологічних об'єктів ця вимога не виконується, оскільки існує нелінійна залежність діелектричної проникності тканин від частоти. Крім того, для різних тканин ця залежність істотно відрізняється. Для опису пасивних електричних властивостей живих тканин досить охарактеризувати їх діелектричну проникність і питомий електричний опір (провідність). Оскільки обидві величини залежать від функціонального стану тканини, з'являється можливість для діагностичних досліджень на основі оцінки пасивних електричних властивостей біологічних об'єктів. Хоча найточніше вимірювання досягається тільки за умови розрахунку комплексної та дійсної складової, достатнім буде знайти хоча б резистивну компоненту імпедансу, за умови, що використано правильні діапазони частот. На низьких частотах за нормальної температури провідність змінюється від 0,02 (кістки) до 0,70 См/м (кров).

Перше імпедансне зображення одержали в 1978 році R.P. Henderson та J.G. Webster, але воно не було томографічним. Із 1990-х років електроімпедансна томографія інтенсивно розвивається (Kim et al., 2004; Balleza-Ordaz et al., 2015; Zhao et al., 2014). Значних успіхів у розробленні медичних застосувань досягнуто в галузі неонатології, пульмонології, онкології, нейрофізіології, а також фізіології рослин. Для одержання зображення змінний струм інжектують у тканини через електроди, розташовані по периметру, та вимірюють синхронно поверхневі потен-

ціали. Це дає можливість одержати сукупності даних розподілу імпедансу, які за допомогою комп'ютерних алгоритмів забезпечують відтворення імпедансного томографічного зображення (рис. 1).

Струм, протікаючи через середовище, створює об'ємний розподіл електричного потенціалу. Збуджувальні електроди можуть бути сусідніми (дипольна інжекція), діаметрально протилежними (полярна інжекція) або мати інше розташування. Потенціал зменшується уздовж лінії струму в міру видалення від активного електрода. Зменшення напруги на одиницю довжини пропорційне величині струму та опору середовища (відповідно до закону Ома). Вимірюючи зменшення напруги та знаючи струм, можна обчислити величину опору. Томографічний алгоритм реконструкції дозволяє використовувати напруги, вимірювані тільки на поверхні тіла, для обчислення просторового розподілу питомого опору (або електропровідності) усередині нього.

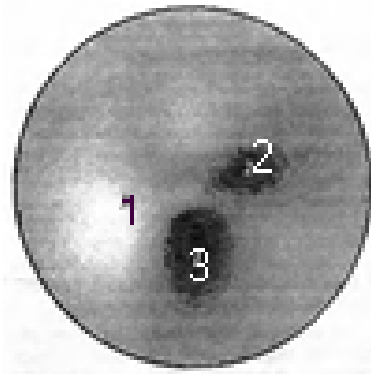


Рис. 1. Імпедансна томограма нижньої кінцівки:

1 – м'язи, 2, 3 – кістки

Перші алгоритми реконструкції електроімпедансного зображення та перші зображення, що застосовували алгоритм зворотної проєкції, розроблено D.C. Barber. Цей алгоритм адаптували надалі до методу комп'ютерної рентгенівської томографії. В електричній імпедансній томографії периферичний профіль – це множина електричних напруг між парами електродів для кожної пари збуджувальних електродів. Будь-який розподіл електропровідності в регіоні, обмеженому двома екіпотенціальними лініями, корелює з різницею електричної напруги між електродами за нормованими лініями. Розподіл електропровідності між двома екіпотенціальними лініями пропорційний градієнту електричної напруги відповідних меж.

Для одержання електричного імпедансного зображення запропоновано декілька методів, які зведені у дві категорії: статичне та диференціальне зображення. Статичне зображення полягає в одержанні зображення абсолютного розподілу імпедансу усередині ділянки тіла, тобто у результаті формується анатомічне зображення області, яка сканується. Диференціальне або динамічне зображення полягає у відтворенні змін електропровідності між двома серіями вимірів.

Мета статті – оцінити вплив методів інжекції струму під час проведення електроімпедансної томографії на відтворене зображення.

Матеріал і методи досліджень

Вимірювання біологічного імпедансу вимагає проходження електричного струму через біологічну тканину під час дослідження. Для цього слід обрати тип, величину та частоту струму. Протікання постійного струму через біологічні тканини, супроводжується необоротними хімічними реакціями на електродах. Тому в медичній діагностиці (Сао et al., 2007) використовують тільки змінний електричний струм досить високої частоти (як правило, вище 1 кГц). Електропровідність різних тканин тіла людини змінюється від 0,02 (кістка) до 0,70 См/м (кров), тобто у 35 разів.

Припустима величина струму обмежена його біологічною дією, вона підвищується зі зростанням частоти. За слабкої стимуляції (0,3–10,0 мА) відмічається тільки тактильне відчуття. У широких межах (10–100 мА) нерви та м'язи піддаються сильній стимуляції, результатом якої є скорочення, біль і стомлення. Струм силою понад 15 мА (залежно від шляху проходження струму) може викликати зупинку дихання, помітне стомлення та інтенсивний біль. Ще вищі значення сили струму можуть викликати тривалі скорочення міокарда (контрактури) та важкі опіки.

Застосування електрики на будь-якій ділянці шкіри має як результат стимуляцію різних типів рецепторів дерми. Величина електричного струму, використовувана для біологічних імпедансометричних досліджень, повинна завжди бути нижчою за максимально допустиму (табл.).

Таблиця

Залежність максимальної сили струму від частоти

Частота змінного струму, кГц	Максимальна амплітуда струму, мА
< 1	0,1
1–100	0,1 · f, де f – частота (кГц)
> 100	10

Для відтворення електропровідності тканин застосовують метод зворотного проектування уздовж еквіпотенціалей, який застосовується під час абсолютних та диференціальних вимірювань за різних положень збуджувальних електродів. Розподіл провідності можна обчислити за формулою:

$$s(r, \theta) = \sum_{i=0}^{n-1} W_i(r, \theta) \lambda_i(x) \Phi_i(x) = \varphi_i(r, \theta) \quad (1)$$

де i – номер пари активних електродів, $W_i(r, \theta)$ – геометричні коефіцієнти, які визначаються для однорідного тіла такої самої форми, $\lambda_i(x)$ – лінійна інтерполяція потенціалів для пари вимірювальних електродів, $\Phi_i(x)$ – розподіл потенціалу уздовж границі однорідного об'єкта такої самої форми, $\varphi_i(r, \theta)$ – розподіл потенціалу всередині об'єкта.

Складність математичного завдання (як аналізу, так і синтезу) полягає, на відміну від аналогічних завдань рентгенівського, гамма-, ядерного магнітного резонансу, ультразвукової томографії, у тому, що струми між електродами протікають по всій площині та об'єму, а не по прямій лінії між електродами (Cheng et al., 1989; Kim et al., 2004). Пряму задачу можна розв'язати двома шляхами. Перший шлях – аналітичний, другий – використання числових методів, таких як метод кінцевих елементів

або метод граничних елементів. Зворотна задача ЕПТ погано зумовлена. Розв'язок зворотної задачі може бути у край нестійким, навіть невеликий шум може значно посилитися та привести в непридатність увесь результат обчислень (Adler and Guardo, 1996; Asfaw and Adler, 2005). Отримати дані без шуму неможливо, оскільки мають місце такі явища як зміна розподілу провідності шкіри в місцях прикріплення електродів, рух електродів, неможливість точного (відповідно до моделі) закріплення електродів, а також шуми від електронних елементів (Kim et al., 2014). У зв'язку з обмеженням розміру електродів і певними вимогами до їх розміщення кількість незалежних вимірювань завжди набагато менша, ніж число елементів зображення, які потрібно отримати. Крім істинного існує багато «фантомних» рішень. Для реконструкції зображення у погано зумовлених системах потрібна регуляризація. Методи регуляризації поділяють на три типи: метод зворотної проекції, ітеративний метод і метод однокрокової лінеаризації. Результати застосування цих алгоритмів залежать від методів інжекції струму в дослідний об'єкт.

Для томографічних розрахунків застосовано відомий пакет програм EIDORS, який дозволяє розв'язувати як пряму задачу (розрахунок потенціалів на поверхні об'єкта за даними про електропровідність і збуджувальний струм), так і зворотну (розрахунок розподілу провідності за потенціалами на поверхні). Для проведення модельних досліджень застосовано 16-електродну модель із 576 кінцевими елементами. Збільшення кількості кінцевих елементів не викликає поліпшення вихідного зображення, тільки поліпшує відображення меж зон провідності. Стимуляція струмом і знімання напруги проводили по сусідніх електродах, протилежних електродах і електродах, які відстоять один від одного на три електроди. Кількість ітерацій дорівнювала 1, 3, 5 та 10. Відносна різниця значень максимальної та мінімальної провідності складала 2–6, при тому, що фонові провідності дорівнювала 1. Оптимальні значення гіперпараметра та кількості ітерацій шукали шляхом аналізу графіків залежності параметрів якості від перелічених вище факторів.

Для збільшення швидкості розрахунків і зменшення кількості можливих помилок створено програму за допомогою математичного пакета Matlab (Polydorides and Lionheart, 2002; Ledger, 2012). З її допомогою можна задати розподіл провідності в об'єктах різної форми та розрахувати зворотну задачу, задаючи при цьому різні параметри. Модель кінцевих елементів описується вузлами, елементами та границею. Електроди визначаються вектором і мають контактний імпеданс. Кожен електрод представлений вузлами, до яких він приєднаний на межі моделі. За допомогою цих електродів задано модель стимулювання та отримання даних. Кожен об'єкт стимуляції має поля стимуляції, модель стимулювання та модель вимірювань. Поле стимуляції визначає стимулювальну величину, тобто величину струму.

Результати та їх обговорення

Проведено модельні експерименти для вивчення впливу методу інжекції струму на чутливість і роздільну здатність відтворення провідності (рис. 2).

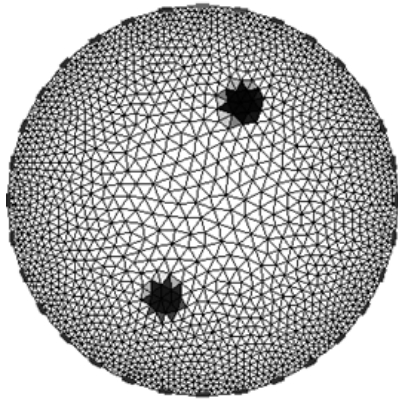


Рис. 2. Приклад розрахованого розподілу провідності: провідність фону – 2, об'єкта у верхній частині – 1,5, у нижній частині – 3

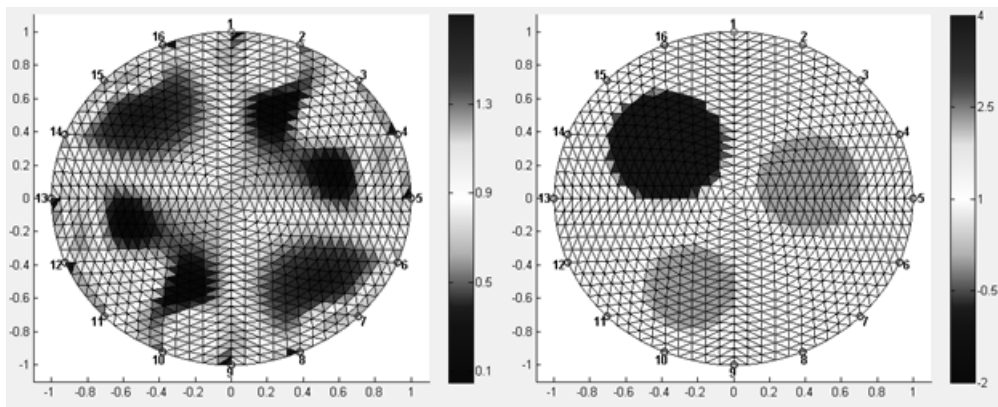


Рис. 3. Артефакти, які виникають у розрахованому розподілі провідності (ліворуч) та істинний розподіл (праворуч)

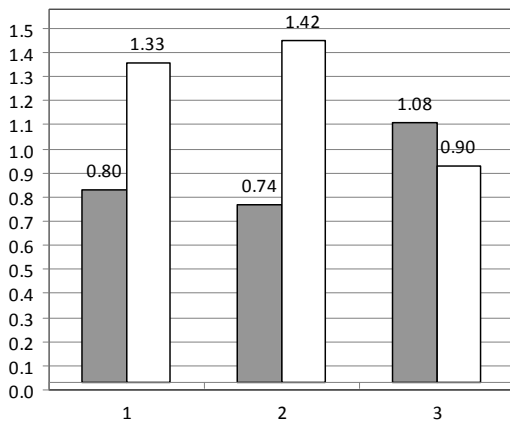


Рис. 4. Максимальне відхилення (сірий стовпчик) та середньоквадратична похибка (білий стовпчик) для різних типів інжекції струму та ресстрації напруги:

1 – дипольна модель, 2 – полярна модель, 3 – зміщення на чверть кола

Розраховано також оптимальні параметри алгоритмів для абсолютного та різницевого методів розрахунків. Різницевий алгоритм потребує більшої кількості обчислювальних ресурсів, бо йому потрібен розв'язок для «пустого» фантома та за умов оцінки абсолютної варіації із застосуванням методу внутрішніх точок потрібна кількість ітерацій зростає відносно абсолютного алгоритму з тим самим методом регуляризації. Але і результат таких обчислень має більшу контрастність.

Результати відтворення оцінювали візуально та за допомогою двох кількісних показників: середньоквадратичного та максимального відхилення. В обох типах алгоритмів (різницевих і абсолютних) знайдено артефакт під час розрахунку зворотної задачі (рис. 3). Під час стимулювання струмом і знімання напруг із протиставлених електродів відбувається віддзеркалення розподілу провідності. Такий ефект спостерігали також інші автори (Chakraborty et al., 2013; Javaherian et al., 2013). Дипольна модель, позначена як 1 на рисунку 4, із двома збуджувальними електродами, розташованими поруч один одного, показала середні результати як за максимальним, так і за середньоквадратичним відхиленням. Найкращий результат за максимальним відхиленням показала полярна модель 2, у якій збуджувальні електроди розташовані на протилежних позиціях (по діаметру). Модель 3 з електродами, зміщеними на чверть кола, виявилась найкращою за середньоквадратичним відхиленням.

Висновки

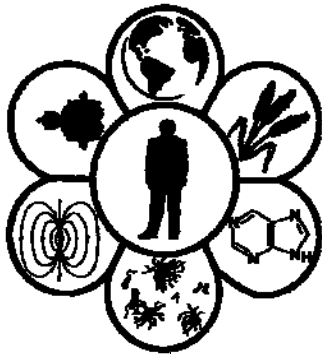
Виявлено залежність якості відновлення розподілу провідності розтину об'єкта від таких параметрів як моделі стимуляції струмом, вимірювання напруги, кількості ітерацій, значень регуляризувального параметра та відношення значень максимальної та мінімальної провідності. Критерієм якості слугували значення середньоквадратичного відхилення за масивом кінцевих елементів по всьому розтину об'єкта, зонах, що цікавлять і поза цими зонами. Також критерієм є значення максимального відхилення від заданого розподілу та розрахованого розподілу провідності. Результати також оцінено візуально в умовних кольорах. Виявлено появу такого артефакту зображення як віддзеркалення розподілу провідності за умов стимулювання та знімання напруги з протиставлених електродів. На основі отриманих даних знайдено оптимальне розв'язання прямої та зворотної задач імпедансної томографії для різних моделей стимуляції та алгоритмів відтворення. Вплив неоптимальних параметрів здатний значно погіршити якість відновленої картини або спотворити її.

Бібліографічні посилання

Adler, A., Guardo, R., 1996. Electrical impedance tomography: Regularised imaging and contrast detection. *IEEE Trans. Med. Imaging* 15, 170–179.

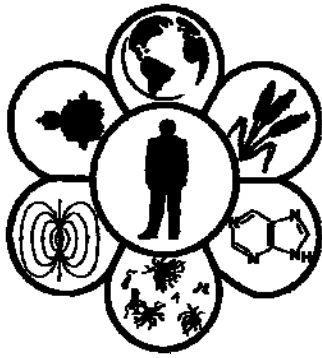
- Asfaw, Y., Adler, A., 2005. Automatic detection of detached and erroneous electrodes in electrical impedance tomography. *Physiol. Meas.* 26(2), S175–S183.
- Balleza-Ordaz, M., Perez-Alday, E., Vargas-Luna, M., Riu, J.P., 2015. Tidal volume monitoring by electrical impedance tomography (EIT) using different regions of interest (ROI): Calibration equations. *Biomed. Signal Proces.* 18(4), 102–109.
- Bera, T.K., Nagaraju, J., 2012. Studying the resistivity imaging of chicken tissue phantoms with different current patterns in Electrical Impedance Tomography (EIT). *Measurement* 45(4), 663–682.
- Cao, Z., Wang, H., Yang, W., Yan, Y., 2007. A calculable sensor for electrical impedance tomography. *Sensor. Actuat. A-Phys.* 140(2), 156–161.
- Chakrabarty, D., Chattopadhyay, M., Bhar, R., 2013. Resistivity imaging of a phantom with irregular inhomogeneities with 32 silver electrodes based sensory system in two dimensional electrical impedance tomography. *Procedia Technology* 10, 191–199.
- Cheng, K.-S., Isaacson, D., Newell, J.C., Gisser, D.G., 1989. Electrode models for electric current computed tomography. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 36, 918–924.
- Colton, D., Kress, R., 1992. *Inverse acoustic and electromagnetic scattering theory.* Springer-Verlag, Berlin.
- Javaherian, A., Movafeghi, A., Faghihi, R., Yahaghi, E., 2013. An exhaustive criterion for estimating quality of images in electrical impedance tomography with application to clinical imaging. *J. Vis. Commun. Image Representation* 24(7), 773–785.
- Kim, B.S., Kambhampati, A.K., Jang, Y.J., Kim, K.Y., Kim, S., 2014. Image reconstruction using voltage-current system in electrical impedance tomography. *Nucl. Eng. Des.* 278(15), 134–140.
- Kim, K.Y., Kim, B.S., Kim, M.C., Kim, S., 2004. Dynamic inverse obstacle problems with electrical impedance tomography. *Math. Comput. Simulat.* 66(4–5), 399–408.
- Ledger, P., 2012. hp-Finite element discretisation of the electrical impedance tomography problem. *Comput. Method. Appl. M.* 225–228, 154–176.
- Polydorides, N., Lionheart, W.R.B., 2002. A Matlab toolkit for three-dimensional electrical impedance tomography: A contribution to the electrical impedance and diffuse optical reconstruction software project. *Meas. Sci. Technol.* 13, 1871–1883.
- Zhao, Y., Wang, M., Yao, J., 2014. Electrical impedance tomography spectroscopy method for characterising particles in solid-liquid phase. *AIP Conference Proceedings* 1592, 10–17.

Надійшла до редколегії 03.04.2015



Зміст

Галкін О.Ю., Горшунов Ю.В., Бесараб О.Б. Синтетичні позитивні контролю імуноферментних наборів для виявлення IgA та IgM антитіл до <i>Chlamydia trachomatis</i>	3
Попель С.Л., Мицкан Б.М., Краснопольський С.З., Мельник І.В. Структурний слід адаптації у рухових центрах спинного мозку щурів при гіпокінезії з наступним фізичним навантаженням у відновному періоді	9
Бабець Я.В., Петрушенко А.О., Шевцова А.І., Ушакова Г.О. Роль фібронектину за дії доксорубіцину	17
Кулібаба О.В., Козішкурт С.М., Дузенко О.О., Вовчук І.Л., Петров С.А. Стан глутатіонметаболізувальної системи в умовах трансплантації м'язових тканин одноплідних щурів	23
Кобильник С.М., Вовчук І.Л., Дузенко О.О., Козішкурт С.М., Морозова Д.В., Петров С.А. Вплив трансплантації м'язової тканини в одноплідних щурів на загальну кількість флавінів та ФАД	28
Галкін О.Ю., Горшунов Ю.В., Соловійова В.Ф. Удосконалення методики отримання Fc-фрагментів IgA людини	32
Грабовський С.С., Грабовська О.С. Вплив імуномодуляторів природного походження на показники клітинного імунітету крові курчат-бройлерів в умовах стресу	36
Звір Г.І., Мороз О.М., Гнатуш С.О. Дисиміляційна сульфатредукція у бактерій <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> IMB K-6 за впливу гербіцидів Ураган і Раундап	40
Коляда А.К., Плетнева Т.В., Соседко А.С., Чивликлий М.А., Вайсерман А.М., Карабань І.Н. Генетические факторы риска развития болезни Паркинсона в Украине	45
Письменецкая И.Ю., Баттерс Т.Д. Хроматографические спектры свободных олигосахаридов плазмы крови больных с сердечно-сосудистой недостаточностью	51
Вальчук С.И., Степанский Д.А., Шевченко Т.Н., Кошева І.П., Рыженко С.А., Кременчуцкий Г.Н. Биологические свойства аэрококков и бацилл – компонентов нового ассоциативно-пробиотического комплекса	57
Гордієнко Ю.А., Шаульська О.Е., Дяченко Л.М., Ніколаєнко-Камишова Т.П., Шевцова А.І. Зміни протеазно-інгібіторного балансу при онкогематологічних захворюваннях	63
Коровіна Л.Д., Запорожець Т.М. Зв'язки кровопостачання головного мозку студентів зі станом вегетативної нервової системи та факторами ризику	68
Вальчук С.І., Шевченко Т.М., Шевченко В.А., Воронкова О.С., Вінніков А.І. Корекція дисбактеріозу піхви з використанням пробіотиків	74
Сніжко Є.М., Мілих М.М., Гасанов Е.М. Вплив методів вимірювання електричного імпедансу на відтворення двовимірної томограми біологічних тканин	79



Content

Galkin O.Y., Gorshunov Y.V., Besarab O.B. Synthetic positive controls for ELISA test kits for detection of IgA and IgM antibodies to <i>Chlamydia trachomatis</i>	3
Popel S.L., Mitckan B.M., Krasnopol'sky S.Z., Melnik I.V. Structural trace of adaptation in motive nuclei of spinal cord of rats in hypokinesia and after physical loading in the recovery period	9
Babets Y.V., Petruschenko A.O., Shevtsova A.I., Ushakova G.A. Role of fibronectin under conditions of doxorubicin action	17
Kulibaba O.V., Kozishkurt S.M., Duzenko O.O., Vovchuk I.L., Petrov S.A. Glutathione metabolism system under condition of transplantation of muscle tissue in rats	23
Kobyl'nyk S.N., Vovchuk I.L., Dosenko O.O., Kozishkurt S.N., Morosova D.V., Petrov S.A. Effect of transplantation of muscle tissue in rats from the same litter on total number of flavins and FAD	28
Galkin O.Y., Gorshunov Y.V., Solov'jova V.F. Improvement of the method of obtaining human IgA Fc-fragments	32
Grabovskiy S., Grabovska O. Influence of immunomodulators of natural origin on cellular immunity indices in blood of broiler chicken under stress	36
Zvir G.I., Moroz O.M., Hnatush S.O. Dissimilatory sulfate reduction in bacteria <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> IMV K-6 upon influence of Uragan and Raundup herbicides	40
Koliada A.K., Pletneva T.V., Sosedko A.S., Chyvyklyj M.A., Vaiserman A.M., Karaban I.N. Genetic risk factors for Parkinson's disease in Ukraine	45
Pisnenskaya I.U., Butters T.D. Chromatographic profiles of blood plasma free oligosaccharides in patients with cardiovascular disease	51
Valchuk S.I., Stepansky D.A., Shevchenko T.N., Koshevaya I.P., Ryzhenko S.A., Kremenchutsky G.N. Biological properties of aerococci and bacilli as a component of new associate-probiotic complex	57
Gordiienko I.A., Shaul'ska O.E., Diachenko L.M., Nikolayenko-Kamyshova T.P., Shevtsova A.I. Altered balance between proteolysis and antiproteolysis in oncohematologic diseases	63
Korovina L.D., Zaporozhets T.M. Relations between blood supply of brain of students and condition of autonomic nervous system and risk factors	68
Valchuk S.I., Shevchenko T.N., Shevchenko V.A., Voronkova O.S., Vinnikov A.I. Correction of vaginal dysbiosis with the use of probiotics	74
Snizhko Y.M., Milykh M.M., Gasanov E.M. Effects of electrical impedance measuring methods on two-dimensional tomogram recovery of biological tissues	79

Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, медицина

Заснований у 2010 р.

Том 6(1)

Українською, російською та англійською мовами

Свідоцтво державної реєстрації серія КВ № 19822-9622Р від 15.03.2013 р.

Редактор В.Д. Маловик
Оригінал-макет виготовив В.В. Бригадиренко
Дизайн обкладинки виконав А.О. Гуслистий

Підписано до друку 12.04.2015. Формат 60×84 ¹/₁₆. Папір друкарський. Друк плоский. Ум. друк. арк. 12,3.
Ум. фарбовідб. 12,3. Обл.-вид. арк. 12,3. Тираж 100 пр. Вид. № 1875. Замовлене

Свідоцтво державної реєстрації № ДК – 289 від 21.12.2000 р.

Видавництво Дніпропетровського університету,
пр. Гагаріна, 72, м. Дніпропетровськ, 49010