

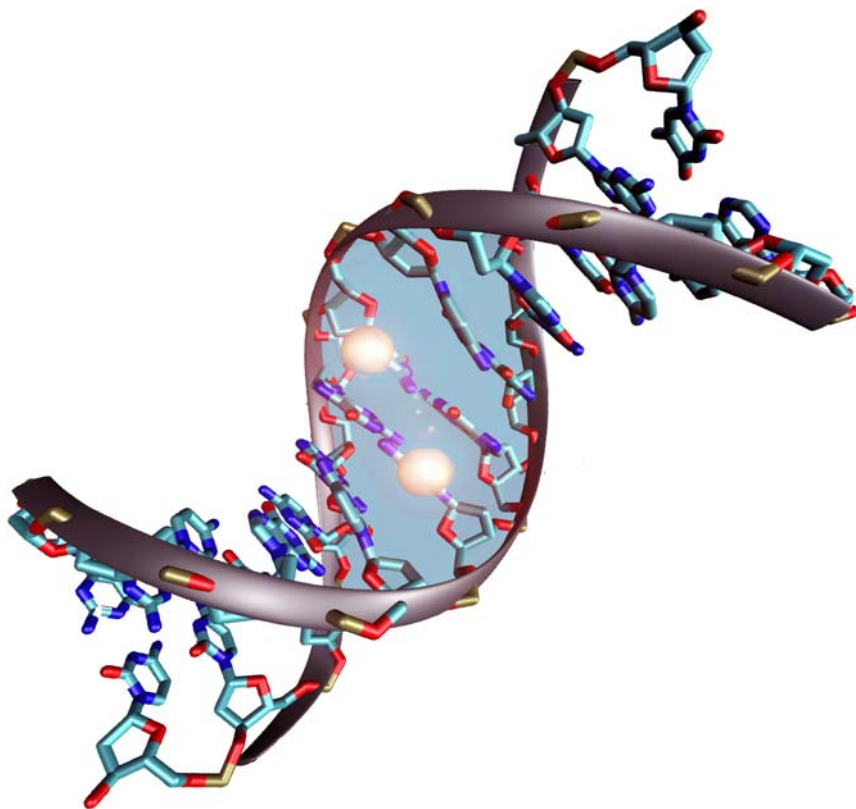
ВІСНИК

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;

Др. І. Меламед, відділення нейрофізіології, Медичний центр ім. М. Сороки, Негевський університет ім. Бен-Гуріона, Беер-Шева, Ізраїль;

Проф. С.Г. Піржанинський, 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;

Др. 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;

Др. М. Бойко, відділ анестезіології, медичний факультет, Негевський університет ім. Бен-Гуріона, Беер-Шева, Ізраїль;

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

Доц. В.Я. Гаспо, 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;

Др. 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;

Др. П. Куцк, відділ біотехнології навколишнього середовища, Центр охорони навколишнього середовища ім. Гельмгольца, Лейпциг, Німеччина;

Проф. О.А. Лисколат, 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. Чаувау, 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.

Друкуються 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. Kozytzka, 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;

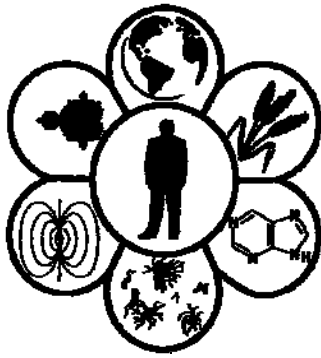
Prof., DSc, G.O. Ushakova, Department of Biophysics and Biochemistry, Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Ukraine;

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 576.895.132+616.995.1

Гельмінтофауна овець і кіз Дніпропетровської області

О.О. Бойко

Дніпропетровський державний аграрно-економічний університет, Дніпропетровськ, Україна

На території Дніпропетровської області у дрібної рогатої худоби (овець і кіз) зареєстровано гельмінтів класів Nematoda Rudolphi, 1808, Trematoda Rudolphi, 1808 та Cestoda Rudolphi, 1808. Виявлені нематоди належать до підрядів Strongylata Railliet et Henry, 1913, Rhabditata Chitwood, 1933, Trichurata Skrjabin, 1915. Серед трематод ідентифікували представників підряду Fasciolata (Skrjabin et Schulz, 1935). Цестоди представлені підрядом Anoplocephalata (Skrjabin, 1933). Серед паразитів овець і кіз визначено нематод підряду Strongylata: *Muellerius sp.*, *Protostrongylus sp.*, *Haemonchus contortus* Rudolphi 1802, *Nematodirus sp.* Серед гельмінтів підряду Rhabditata ідентифіковано *Strongyloides papillosus* Wedl, 1856, Trichurata – *Trichuris sp.*, Fasciolata – *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 та *Dicrocoelium lanceatum* Stiles et Hassall, 1896, Anoplocephalata – *Moniezia expansa* (Rudolphi, 1810) та *M. benedeni* (Moniez, 1879). Домінує серед гельмінтів копитних нематода *H. contortus*. Найменшу частку в угрупованні складають трематоди *F. hepatica* та нематоди *Trichuris sp.* Найвищі індекси біологічного різноманіття паразитоценозу відмічені у копроскопічному матеріалі, відібраному від копитних, які споживали пасовищну рослинність із травня по вересень: зареєстровано десять видів гельмінтів із трьох класів – *Muellerius sp.*, *Protostrongylus sp.*, *H. contortus*, *Nematodirus sp.*, *S. papillosus*, *Trichuris sp.*, *F. hepatica*, *D. lanceatum*, *M. expansa* та *M. benedeni*. У тварин, яких не випасають упродовж року, визначено три види нематод: *S. papillosus*, *H. contortus* та *Nematodirus sp.*

Ключові слова: інвазії дрібних копитних; гельмінти шлунково-кишкового тракту; нематоди дихальних шляхів

Helminthofauna of sheep and goats in Dnipropetrovsk region

A.A. Boyko

Dnipropetrovsk State Agrarian-Economic University, Dnipropetrovsk, Ukraine

Worms of classes Nematoda Rudolphi, 1808, Trematoda Rudolphi, 1808 and Cestoda Rudolphi, 1808 were registered in small ruminants (sheep and goats) in Dnipropetrovsk region. Identified nematodes belong to Strongylata Railliet et Henry, 1913, Rhabditata Chitwood, 1933 and Trichurata Skrjabin, 1915. Among the trematodes, representatives of Fasciolata (Skrjabin et Schulz, 1935) were identified. Cestodes were represented by Anoplocephalata (Skrjabin, 1933). Among the specific types of nematodes, representatives of the Strongylata suborder were found: *Muellerius sp.*, *Protostrongylus sp.*, *Haemonchus contortus* Rudolphi, 1802, *Nematodirus sp.* Among the helminths Rhabditata we identified *Strongyloides papillosus* Wedl, 1856, Trichurata – *Trichuris sp.*, Fasciolata – *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 and *Dicrocoelium lanceatum* Stiles et Hassall, 1896, Anoplocephalata – *Moniezia expansa* (Rudolphi, 1810) and *M. benedeni* (Moniez, 1879). The dominant species among worms in ungulates was defined as nematode *H. contortus*. The smallest share in the group was taken by trematode species *F. hepatica* and nematodes *Trichuris sp.* The highest biodiversity indices are recorded in samples of material selected from ungulates consuming pasture herbage from May to September (ten species of worms belonging to three classes: *Muellerius sp.*, *Protostrongylus sp.*, *H. contortus*, *Nematodirus sp.*, *S. papillosus*, *Trichuris sp.*, *F. hepatica*, *D. lanceatum*, *M. expansa*, *M. benedeni* were registered). In animals not pastured throughout the year three types of worms of the class Nematoda: *S. papillosus*, *H. contortus* and *Nematodirus sp.* were defined.

Keywords: invasion of small ungulates; worms digestive tract; nematodes airways

Вступ

Найпоширенішими захворюваннями копитних у світі (Khan et al., 2010; Borji et al., 2011; Lyons et al., 2011; Stancheva et al., 2011; Idika et al., 2012; Idris et al., 2012), у тому числі й на території України (Kuzmina, 2004, 2011, 2012; Kuzmina et al., 2005, 2011; Boyko et al., 2009; Kharchenko et al., 2009; Dovgij et al., 2011) є гельмінтози, зокрема стронгілятози. На території степового Придніпров'я найчастіше реєструють представників підрядів Ascaridata (*Ascaris suum* (Goeze, 1782), *Trichurata* (*Trichuris suis* (Rudolphi, 1803)), *Strongylata* (*Oesophagostomum dentatum* (Schränk, 1788), *Metastrongylus elongatus* (Dujardin, 1845), *Dictyocaulus sp.*, *Muellerius sp.*, *Cystocaulus sp.*, *Protostrongylus sp.*, *Globocephalus sp.*, *Bunostomum sp.*, *Haemonchus sp.*), *Rhabditata* (*Strongyloides ransomi* (Schwartz et al., 1930), *S. papillosus* Wedl, 1856) та *Fasciolata* (*Dicrocoelium lanceatum* Stiles et Hassall, 1896). Вони спричиняють зниження продуктивності та показників якості продукції (Войко, 2010, 2012). Нині у сільській місцевості у першу чергу розводять копитних, зокрема велику та дрібну рогату худобу та свиней. Людина активно проводить лікувально-профілактичні заходи, інтродукує різні породи тварин, не враховуючи видового складу гельмінтофауни. Тому створення територіальних гельмінто-фауністичних комплексів залежить не лише від природних, а й від антропогенних факторів (Pelgunov and Maklakova, 2014).

У літній період дрібній рогатій худобі, зокрема вівцям і козам, у фермерських господарствах згодують пасовищну рослинність (Terent'eva, 2014). У фауні гельмінтів жуйних у цей час реєструють паразитів, життєвий цикл яких відбувається за участі проміжних хазяїв (дошових черв'яків, наземних та прісноводних моллюсків), а також личинкові стадії яких здатні до активної міграції у ґрунті та на стеблах рослин (Войко, 2008; Shendrik et al., 2010). Вивчення цього питання особливо важливе для господарств, де утримують жуйних із вигулом у пасовищний період, коли ймовірність зараження збільшується за рахунок наявності рослинності та проміжних хазяїв збудників інвазії. Тому мета статті – визначити гельмінтофауну дрібних копитних, зокрема овець і кіз, на території Дніпропетровської області.

Матеріал і методи досліджень

Матеріал для дослідження – екскременти дрібних копитних (93 загальні проби), зокрема, дрібної рогатої худоби (вівці порід Мериноландшафт, Блю ду Мейн, Голубомордий Лейер, Дорпер, Кланфорест, Суфолк, Тексель; кози порід Біла Німецька, Альпійська, Англонубійська, Бурська), зібрані з травня по вересень 2015 року на території Дніпропетровського району (селище Підгородне). Для підтвердження діагнозу на гельмінтози застосовували методи прижиттєвої діагностики – загальноприйняті у паразитології методи копроовоскопічних і копроларвоскопічних досліджень. Для гельмінтооскопії користувались методом флотації за Г.О. Котельниковим та В.М. Хреновим і седиментації – послідовних промивань. Для гельмінтоларвоскопії – методом культивування личинок та Вайда (Sekretaryuk et al., 2005).

В екскрементах копитних виявлено яйця нематод, трематод і цестод. За морфологічними ознаками серед представників класу Nematoda визначено яйця *Nematodirus sp.* (*Strongylata* Railliet et Henry, 1913) та інших стронгілят шлунково-кишкового тракту (сірі, овальні, середнього розміру, незрілі, з кульками дроблення всередині, рис. 1). Яйця нематодірусів у 2,5 раза більші за інших стронгілят, мають лише 8 кульок дробління, тому їх легко диференціювати. Одночасно ідентифіковано яйця *Trichuris sp.* (*Trichurata* Skrjabin, 1915) – коричневі, середнього розміру, лимоноподібної форми. Інтенсивність ураження тварин нематодірусами та трихурісами не перевищувала в середньому 6,7 яйця/г екскрементів. Показники щодо екстенсивності нематодірозої та трихуронової інвазії становили 7,4% та 3,7% відповідно.

Інтенсивність стронгілятозної інвазії коливалась у межах 20–3 880 яєць/г екскрементів. Оскільки яйця стронгілят (окрім нематодірусів) морфологічно однакові, вид цих нематод визначали за інвазійною стадією гельмінта. Під час культивування личинок стронгілят встановлено *Haemonchus contortus* Rudolphi, 1802, що має кишечник із 16 клітин трикутної форми, розташованих у два ряди, останні клітини веретеноподібної форми та розміщені на одному рівні (рис. 2). Екстенсивність гемонхозної інвазії становила 44,4%. Ці показники значно відрізнялися від екстенсивності іншої стронгілятозної інвазії, зокрема нематодірозої, рівень ураження якою був ушестеро нижчим.

Серед трематод ідентифіковано яйця *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 та *Dicrocoelium lanceatum* Stiles et Hassall, 1896 (*Fasciolata* (Skrjabin et Schulz, 1935)). Обидва види – біогельмінти, розвиваються за участю проміжних хазяїв – червононогих моллюсків. Яйця фасціол достатньо великі, овальні, яскраво-жовті, незрілі – з кульками дроблення всередині. На відміну від них яйця дикроцеліумів невеликі за розміром і зрілі: всередині міститься сформована личинка (мірацидій), забарвлені у темно-коричневий колір (рис. 3). Показники щільності яєць цих трематод не перевищували в середньому 53,3 яйця/г екскрементів. При цьому яйця дикроцеліумів реєстрували увосьмеро частіше, ніж фасціол, щільність яких становила в середньому 6,7 яйця/г екскрементів. Екстенсивність фасціольозної та дикроцеліозної інвазії перебувала на однаковому рівні – 3,7%.

Клас Cestoda представлений підрядом Anoplocephalata (Skrjabin, 1933). У результаті копроовоскопічних досліджень визначено яйця *Moniezia expansa* (Rudolphi, 1810) та *M. benedeni* (Moniez, 1879). Яйця цих гельмінтів середнього розміру, сірого кольору, зрілі. Крізь їх оболонки видно онкосферу із грушоподібним апаратом. Між собою вони чітко різняться за формою. У першого виду яйця трикутні, а другого – чотири- або п'ятикутні (рис. 4). Показники інтенсивності монієзійної інвазії коливались у межах 180–350 яєць/г екскрементів. При цьому яйця *M. benedeni* зустрічались у середньому з інтенсивністю 206,7, а *M. expansa* – не перевищували 100 екз./г екскрементів. Екстенсивність монієзійної інвазії становила 11,1%. Показники екстенсивності ураження тварин *M. benedeni* на 7,4% вищі, ніж *M. expansa*.

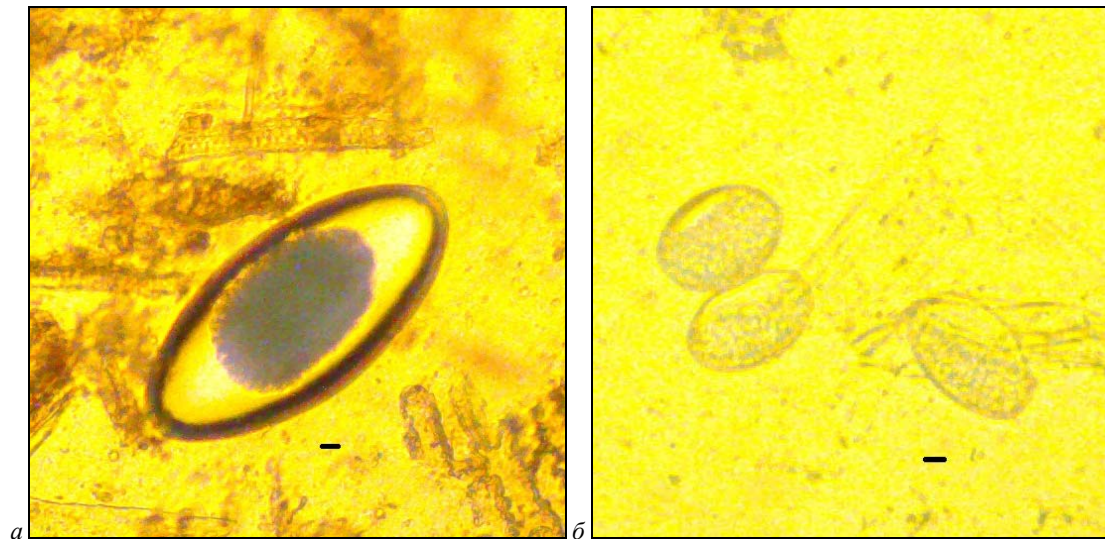


Рис. 1. Яйця нематод дрібних копитних:
a – *Nematodirus* sp., *б* – *H. contortus* Rundolphi, 1802; довжина відрізка відповідає 10 мкм



Рис. 2. Личинка *H. contortus* Rundolphi, 1802:
 довжина відрізка відповідає 10 мкм



Рис. 3. Яйця *D. lanceatum* Stiles et Hassall, 1896:
 довжина відрізка відповідає 10 мкм



Рис. 4. Яйця аноплоцефаліт дрібних копитних:
a – *M. expansa* (Rudolphi, 1810), *б* – *M. benedeni* (Moniez, 1879); довжина відрізка відповідає 10 мкм

Ларвоскопічним методом в екскрементах копитних ідентифіковано личинок нематод дихальних шляхів (*Muellerius sp.* та *Protostrongylus sp.*), а також шлунково-кишкового тракту (*Strongyloides papillosus* Wedl, 1856). Личинки легеневих нематод дрібні за розміром, мають кишечник у вигляді зернистої маси (рис. 5). Між собою відрізняються хвостовими кінцями. У личинок мюлеріусів на хвостовому кінці є малопомітний шипик, протостронгілосів – має форму полум'я свічки.



Рис. 5. Личинка стронгілят дихальних шляхів: довжина відрізка відповідає 10 мкм

У стронгілоїдесів кишечник представлений двома тяжами дрібних клітин. Їх розмір різний залежно від стадії розвитку (рис. 6). Діагностичною ознакою рабдитоподібних личинок цих нематод є страхохід із двома бульбусами.

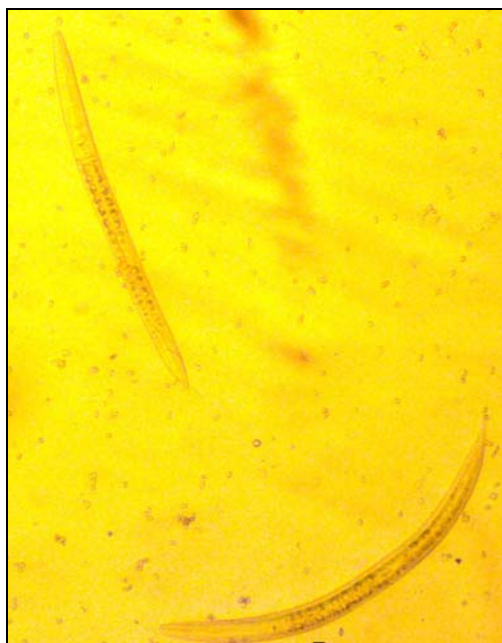


Рис. 6. Личинки *S. papillosus* Wedl, 1856: довжина відрізка відповідає 10 мкм

Інтенсивність протостронгілоїдозних інвазій (мюлеріозу та протостронгільозу) не перевищувала в середньому 33,3, стронгілоїдозної – досягала 850 личинок/г

екскрементів. Показники екстенсивності цих інвазій теж значно різнились: протостронгілоїдозних – 8,3%, стронгілоїдозної – 91,7% (у 11 разів більше).

Домінує серед гельмінтів копитних нематод підряду Strongylata Railliet et Henry, 1913 *H. contortus* Rundolphi, 1802. Найменшу частку в угрупованні складають трематоди *F. hepatica* Linnaeus, 1758 та нематоди – *Trichuris sp.*, щільність яких не перевищує 6,7 яйця/г екскрементів (рис. 7).

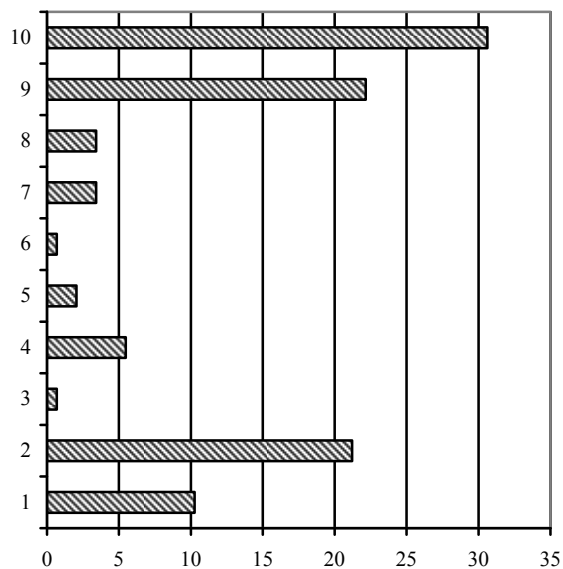


Рис. 7. Видовий склад угруповань нематод овець і кіз Дніпропетровської області: вісь абсцисс – частка в угрупованні (%), вісь ординат – види; 1 – *M. expansa* (Rudolphi, 1810), 2 – *M. benedeni* (Moniez, 1879), 3 – *F. hepatica* Linnaeus, 1758, 4 – *D. lanceatum* Stiles et Hassall, 1896, 5 – *Nematodirus sp.*, 6 – *Trichuris sp.*, 7 – *Protostrongylus sp.*, 8 – *Muellerius sp.*, 9 – *S. papillosus* Wedl, 1856, 10 – *H. contortus* Rundolphi, 1802

Найвищі індекси біологічного різноманіття відмічено у вибірках копроскопічного матеріалу, відібраного від копитних, які регулярно у період із травня по вересень споживають пасовищну рослинність. У цих тварин зареєстровано десять видів гельмінтів: *F. hepatica* Linnaeus, 1758, *D. lanceatum* Stiles et Hassall, 1896, *M. expansa* (Rudolphi, 1810), *M. benedeni* (Moniez, 1879), *Muellerius sp.*, *Protostrongylus sp.*, *Nematodirus sp.*, *Trichuris sp.*, *S. papillosus* Wedl, 1856, *H. contortus* Rundolphi, 1802. Індекси різноманіття гельмінтів, ідентифікованих в екскрементах жуйних, яких утримували без вигулу, удвічі нижчі. У цих копитних виявлено лише три види нематод: *S. papillosus* Wedl, 1856, *H. contortus* Rundolphi, 1802 та *Nematodirus sp.* (рис. 8).

За результатами моніторингу (Kharchenko et al., 2009) різноманіття гельмінтів дрібних копитних (*Capreolus capreolus* L.) інших областей України (Вінницької, Житомирської, Київської, Рівненської, Сумської, Тернопільської, Хмельницької, Черкаської, Чернігівської), у гельмінтофауні зареєстровано також *Dictyocaulus viviparus* (Bloch, 1782), *Bunostomum phlebotomum* (Railliet, 1900), *Chabertia ovina* (Fabricius, 1788), *Trichostrongylus axei* (Cobbold, 1879), *Marshallagia marshalli* (Ransom, 1907), *O. venulosus* (Rudolphi, 1809),

Paramphistomum sp., *Taenia hidatigena* (Pallas, 1766). Проте на території Дніпропетровської області у фауні нематод підряду Strongylata Railliet et Henry, 1913 дрібних копитних встановлено *Muellerius* sp. та *Protostrongylus* sp., цестод *M. benedeni* (Moniez, 1879) та трематод *F. hepatica* Linnaeus, 1758 і *D. lanceatum* Stiles et Hassall, 1896.

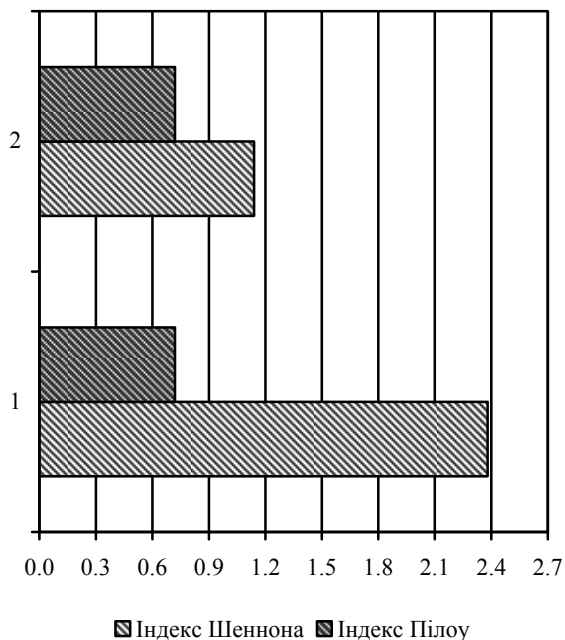


Рис. 8. Індеси різноманіття гельмінтів дрібних копитних Дніпропетровської області:
1 – із випасанням, 2 – за умов утримання у приміщеннях

Висновки

На території Дніпропетровської області у дрібної рогатої худоби (овець і кіз) зареєстровано 10 видів гельмінтів: 6 видів нематод, 2 – трематод та 2 – цестод. Серед визначених гельмінтів класу Nematoda у досліджуваних жуйних ідентифіковано 4 види паразитів шлунково-кишкового тракту (*Nematodirus* sp., *H. contortus* Rondolphi, 1802, *Trichuris* sp., *S. papillosus* Wedl, 1856) та 2 – дихальних шляхів (*Muellerius* sp., *Protostrongylus* sp.). Трематоди представлені *F. hepatica* Linnaeus, 1758 і *D. lanceatum* Stiles et Hassall, 1896. Серед гельмінтів класу Cestoda визначено *M. expansa* (Rudolphi, 1810) та *M. benedeni* (Moniez, 1879).

Домінує серед гельмінтів копитних нематода *H. contortus* Rondolphi, 1802. Найменшу частку в угрупованні складають *F. hepatica* Linnaeus, 1758 та *Trichuris* sp. Найвищі індеси біологічного різноманіття відмічено у вибірках копроскопічного матеріалу копитних, які споживали пасовищну рослинність із травня по вересень (зареєстровано 10 видів гельмінтів із 3 класів).

Бібліографічні посилання

Borji, H., Raji, A., Naghibi, A., 2011. The comparative morphology of *Marshallagia marshalli* and *Ostertagia occiden-*

talis (Nematoda: Strongylida, Trichostrongylidae) by scanning electron microscopy. *Parasitol. Res.* 108, 1391–1395.

Boyko, A.A., 2008. Sezonnaya dinamika kontaminatsii pastbishh na territorii Dnepropetrovskoy oblasti invazionnymi stadiyami nematod podotryadov Strongulata i Rhabditata [Seasonal dynamics of pasture contamination on the territory of the Dnipropetrovsk region of nematodes Strongylata and Rhabditata]. *Questions of Bioindication and Ecology* 13(2), 136–142 (in Ukrainian).

Boyko, A.A., 2010. Vliyanie ehkologicheskikh faktorov na strukturu soobshhestv nematod podotryadov Strongulata i Rhabditata v usloviyakh stepnogo Pridneprov'ya [The influence of ecological factors on the associations structure of Strongylata and Rhabditata in the conditions of steppe Pridneprov'ya]. *Chernoveckiy National University of the name of George Fed'kovich, Chernovec* (in Ukrainian).

Boyko, A.A., 2012. Nematodofauna dikikh i domashnikh svinej Dnepropetrovskogo rajona [Nematodofauna of *Sus scrofa* and domestic pigs of the Dnipropetrovsk region]. *Questions of Bioindication and Ecology* 17(1), 190–196 (in Ukrainian).

Boyko, A., Brygadyrenko, V., Shendryk, L., Loza, I., 2009. Estimation of the role of antropo-zoonosis invasion agents in the counteraction to bioterrorism. *Counteraction to Chemical and Biological Terrorism in East European Countries*. Springer Science, Dordrecht, Netherlands, P. 309–315.

Dovgij, Y.Y., Shendrik, L.I., Feshhenko, D.V., Bojko, A.A., Faly, L.I., 2011. Nematody dykyh kopytnyh Ukrai'ny [Eelworms in wild hoofed mammals of Ukraine]. *Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Med.* 2(2), 29–33 (in Ukrainian).

Idika, I.K., Chiejina, S.N., Mhomga, L.I., Ngongeh, L.A., Nnadi, P.A., 2012. Responses of the humid zone ecotype of the Nigerian West African Dwarf sheep to mixed infections with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Parasitol. Res.* 110(6), 2521–2527.

Idris, A., Moors, E., Sohney, B., Gauly, M., 2012. Gastrointestinal nematode infections in German sheep. *Parasitol. Res.* 110, 1453–1459.

Khan, M.N., Sajid, M.S., Khan, M.K., Iqbal, Z., Hussain, A., 2010. Gastrointestinal helminthiasis: Prevalence and associated determinants in domestic ruminants of district Toba Tek Singh, Punjab, Pakistan. *Parasitol. Res.* 107, 787–794.

Kharchenko, V.A., Kuzmina, T.A., Malega, A.N., 2009. Soobshhestvo parazitov kosuli evropejskoj *Capreolus capreolus* v Ukraine [Community parasites *Capreolus capreolus* in Ukraine]. XIV Conference of Ukrainian scientific society of parasitologists. *Parasites and parasitoses: Present and risks*, 115 (in Russian).

Kuzmina, T., Kornas, S., Basiaga, M., Kharchenko, V., Vyniarska, A., 2011. Biodiversity of strongylids (Nematoda: Strongylidae) communities in domestic horses from Poland and Ukraine. *Helminthologia* 48(2), 77–84.

Kuzmina, T.A., 2004. Biologicheskie osnovy integrirovannogo kontrolya strongilid (Nematoda: Strongylida) – parazitov loshadej v usloviyakh Ukrainy [Biological basis of the integrated control of strongylids (Nematoda: Strongylida) – parasites of horses under conditions of Ukraine]. *Schmalhausen Institute of Zoology, Kyiv* (in Ukrainian).

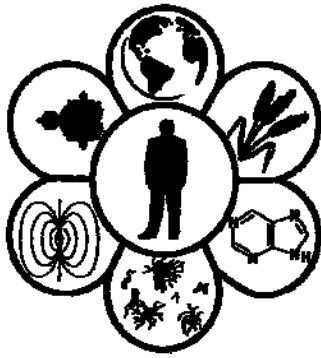
Kuzmina, T.A., 2011. Strongylids of brood horses in Ukraine: Biodiversity and structure of parasites community. *Proceed of the XIX Wroclaw Parasitological Conference [Ewolucyjne i Ecologiczne Aspekty Ukladu Pasozyt-Zywiciel]*. Wroclaw–Karpacz 2–4 czerwca, 36.

Kuzmina, T.A., 2012. Contamination of the environment by strongylid (Nematoda: Strongylidae) infective larvae at horse farms of various types in Ukraine. *Parasitol. Res.* 110(5), 1665–1674.

Kuzmina, T.A., Kharchenko, V.A., Starovir, A.I., Dvojnos, G.M., 2005. Analysis of the strongylid nematodes (Nema-

- toda: Strongylidae) community after deworming of brood horses in Ukraine. *Vet. Paras.* 131(3–4), 283–290.
- Kuzmina, T.A., Kharchenko, V.A., Zvegintsova, N.S., Zhang, L., Liu, J., 2013. Strongylids (Nematoda: Strongylidae) in two zebra species from the “Askania-Nova” Biosphere Reserve, Ukraine: Biodiversity and parasite community structure. *Helminthologia* 50(3), 172–180.
- Lyons, E., Kuzmina, T.A., Tolliver, S.C., Collins, S.S., 2011. Observations on development of natural infection and species composition of small strongyles in young equids in Kentucky. *Parasitol. Res.* 109(6), 1529–1535.
- Panayotova-Pencheva, M., 2011. Species composition and morphology of protostrongylids (Nematoda: Protostrongylidae) in ruminants from Bulgaria. *Parasitol. Res.* 109, 1015–1020.
- Pelgunov, A.N., Maklakova, L.P., 2014. *Fermerskoe okhotnich'e khozyajstvo i parazitologicheskij factor* [Farm hunting economy and parasitological factor]. *Transactions of Center for Parasitology* 48, 216–218 (in Russian).
- Sekretaryuk, K.V., Svarchevskij, O.A., Tafijchuk, R.I., 2005. *Gel'mintologicheskie issledovaniya zivotnykh i okruzhashhej sredy v veterinarnoj meditsine* [Helminthological research animals and the environment in veterinary medicine]. Spolom, Lviv (in Ukrainian).
- Shendrik, L.I., Bojko, A.A., Usenko-Shendrik, K.N., Duda, Y.V., 2010. *Uroven' zarazheniya bespozvonochnykh gel'mintami zhvachnykh na teritorii Dnepropetrovskogo rajona* [Level of defeats of invertebrate by helminths of cattle on the territory of the Dnepropetrovsk region]. *Questions of Bioindication and Ecology* 15(1), 128–133 (in Ukrainian).
- Terentyeva, Z.H., 2014. *Ekologicheskie aspekty v razvitii parazitov koz orenburgskoj porody* [Environmental aspects in the development of parasites orenburg breed goats]. *Transactions of Center for Parasitology*. 48, 302–304 (in Russian).

Надійшла до редколегії 25.08.2015



УДК 577.3+612.017:612.118

Активність радіонуклідів і реалізація функцій імунної системи у мешканців радіаційно забруднених територій

В.Л. Соколенко, С.В. Соколенко

Черкаський національний університет імені Богдана Хмельницького, Черкаси, Україна

Вивчали роль ступеня радіаційного забруднення території у реалізації функцій імунної системи за відсутності та наявності додаткових потенційних імунодепресантів. За відсутності психоемоційного навантаження у мешканців територій, забруднених радіонуклідами, спостерігаються позитивні корелятивні зв'язки між активністю радіонуклідів та концентрацією кортизолу, рівнем нейтрофілів, вмістом IgG та IgM у сироватці крові; негативні корелятивні зв'язки з абсолютною та відносною кількістю функціонально зрілих Т-лімфоцитів із фенотипом CD3+, абсолютною та відносною кількістю їх хелперної субпопуляції CD4+, абсолютною та відносною кількістю природних кілерів із фенотипом CD16+, імунорегуляторним індексом CD4+/CD8+. Рівень кортизолу демонструє корелятивні зв'язки подібного напрямку з такими ж показниками імунної системи, але значення коефіцієнта кореляції нижче. За умов стресового впливу, зумовленого психоемоційним навантаженням під час екзаменаційної сесії, в обстежених достовірно зростає рівень кортизолу. Додатковий короточасний стрес, поєднаний із хронічним впливом малих доз радіації, посилює залежність імуносупресії, зумовленої радіаційним забрудненням місцевості, та викликає збої роботи компенсаторних механізмів.

Ключові слова: радіаційне забруднення; стрес; кортизол; імуносупресія

Radionuclide activity and the immune system functioning in residents of radiation contaminated areas

V.L. Sokolenko, S.V. Sokolenko

Bohdan Khmelnytsky Cherkasy State University, Cherkasy, Ukraine

The objective of this research is to assess the relation of radioactive contamination degree to immune system functioning, in the absence or presence of additional potential immunosuppressants. To achieve the objective, during the period of 1995–2015 we examined 250 people, students of Cherkasy State University, who lived in the areas of enhanced radiation monitoring before. Also we evaluated the additional impact of the emotional stress caused by examinations on examined students. Indicators of cellular immunity were determined by immunophenotyping and dyeing using Romanowsky-Giemsa method. The level of immunoglobulins in blood serum was determined by radial immunodiffusion (Mancini method). The level of cortisol in blood serum was determined by immunoenzyme method. We have found that in absence of the emotional stress among residents of the areas contaminated with radionuclides, cortisol level remained at the upper limit of homeostatic norm. There is an average positive correlation between the activity of radionuclides in the territories of residence and the level of cortisol. There are marked average positive correlations between the activity of radionuclides and the level of neutrophils, and low positive correlations with the levels of IgG and IgM in blood serum. Average negative correlations between the activity of radionuclides and the following parameters are also observed: absolute and relative number of functionally mature T-lymphocytes with phenotype CD3+, absolute and relative number of their helper subpopulation CD4+, absolute and relative number of natural killer cells with phenotype CD16+; and strong negative correlations with immunoregulatory index CD4+/CD8+. Cortisol level shows the similar correlation with the same parameters, but correlation coefficient is lower. Under conditions of additional stress, caused by emotional load during the examinations, cortisol level significantly increases. This enhanced previously discovered correlations and revealed new ones: average negative correlations between radionuclide activity / cortisol level and expression of pan-T cell marker CD5, medium positive correlations with absolute and relative number of suppressor T-lymphocytes with phenotype CD8+, correlation with the level of serum IgG changes from positive to negative. Additional short-term stress factor combined with chronic influence of low doses of radiation increases the dependence

of immunosuppression, caused by radiation contamination of the areas where examined students live, and causes failures in the work of compensatory mechanisms, particularly at the level of serum immunoglobulin products.

Keywords: radiation contamination; stress; cortisol; immunosuppression

Вступ

Іонізуюче випромінювання – фактор, здатний впливати на всі рівні організації живого. Навіть за низьких доз можливий прояв стохастичних ефектів, зокрема, у віддалений період після безпосереднього радіаційного ураження. Аварія на Чорнобильській АЕС спричинила забруднення радіоактивними ізотопами значних територій України. При цьому легколеткі радіонукліди піднялися на значну висоту та сформували у північно-західному напрямку від епіцентру катастрофи забруднену зону протяжністю близько 1 200 км. Головним фактором радіаційного ураження в перший період після аварії стали ізотопи ^{131}I . Протягом наступних років основне дозове навантаження на мешканців територій посиленого радіоекологічного контролю чинили довгоживучі ізотопи ^{137}Cs та ^{90}Sr (Hoshi, 2000).

Після аварії на Чорнобильській АЕС минуло вже 29 років, тобто практично завершується період напіврозпаду ^{137}Cs , активність якого вважається важливим фактором оцінки радіаційного забруднення ґрунтів і, відповідно, визначення територій посиленого радіоекологічного контролю (Godekmerdan, 2004). Як наслідок, певні території Черкаської області вже втратили статус радіаційно забруднених, а їх населення – статус потерпілих внаслідок аварії на ЧАЕС. Проте статистика медичних закладів області свідчить про незадовільний стан здоров'я та тенденцію до зростання відсотка онкологічної та тиреоїдної патологій у мешканців територій, забруднених радіонуклідами. При цьому слід враховувати те, що навіть у межах одного району можна виділити населені пункти з досить високою різницею ґрунтової активності радіонуклідів, забруднення радіонуклідами певних продуктів харчування (Hoshi, 2000; Morita, 2005; McMahan, 2014).

Іонізуюче випромінювання – визнаний імунодепресант, дія якого реалізується на рівні генетичного апарату та біологічних мембран імунокомпетентних клітин, а також чинить стресовий вплив (Telnov, 2002). Найчутливішою до дії радіації та стресорів іншої природи вважається Т-клітинна ланка імунітету, проте робота імунної системи є інтегративною, будь-які дисфункції однієї ланки можуть відбитися на системі в цілому (Manuck, 1991; Sajjadieh, 2009).

Певні контингенти населення зазнають впливу одночасно декількох потенційних імунодепресантів, що може викликати ефекти потенціювання, адитивності чи синергізму. Явище дистресу створює критичні умови роботи гомеостатичних систем організму, у тому числі імунної, призначеної підтримувати антигенний гомеостаз. Важливим критерієм стресових реакцій є рівень кортизолу у сироватці крові (Khaitov, 2001; Shirinsky, 2001). Вважають, що тривале перебування у стресових умовах (зокрема, хронічний вплив малих доз радіації, проживання на територіях, забруднених радіонуклідами) зумовлює певну адаптацію до дії фактора, проте додатковий стресор може виявити адаптаційні можливості та потенційний ресурс імунної системи для функціону-

вання за несприятливих умов (Drannik, 1999; Khaitov, 2001; Sajjadieh, 2009). У більшості досліджень не враховано фактор варіативності радіаційного забруднення території. Це зумовило актуальність наших досліджень і визначило мету.

Мета статті – оцінити зв'язок ступеня радіаційного забруднення території з показниками імунної системи за умов відсутності або наявності додаткових потенційних імунодепресантів.

Матеріал і методи досліджень

Протягом 1995–2015 років обстежено 250 осіб – студентів ЧНУ, які приїхали на навчання з територій посиленого радіоекологічного контролю (IV радіаційна зона, щільність забруднення ґрунтів ізотопами ^{137}Cs – 1–5 Кі/км²). Вік обстежених – 18–24 роки, всі вони на час обстеження не мали гострих захворювань. Серед них 105 осіб чоловічої та 145 – жіночої статі (обстежених у фолікулярну стадію менструального циклу). Між показниками осіб різних статей не спостерігалось статистично вірогідної різниці, тому у подальшому їх розглядали як єдину сукупність. Кров забирали вранці, до вживання їжі. В обстежених відбирали 10 мл венозної крові. Для частини аналізів (оцінка лейкоцитарної формули та рівня лейкоцитів) використовували капілярну кров. Обстеження та забори крові проводили кваліфіковані медичні працівники на базі санаторіо-профілакторію «Едем» при Черкаському національному університеті та біохімічної лабораторії міської лікарні № 1 м. Черкаси.

Аналіз показників імунної системи проводили до (контрольні значення) екзаменаційної сесії та на другий день після останнього іспиту (для оцінки впливу психоемоційного навантаження). Загальну кількість лейкоцитів підраховували в камері Горяєва, лімфоцитів – на основі кров'яного мазка (фарбування барвником Романовського – Гімза). Експресію поверхневих антигенів лімфоцитами периферичної крові визначали імунофлуоресцентним методом із використанням моноклональних антитіл до поверхневих маркерів клітин імунної системи LT1 (для оцінювання експресії пан-Т-клітинного маркера CD5), LT3 (для оцінки експресії пан-Т-клітинного маркера CD3), LT4 (для оцінки експресії Т-клітинного маркера хелперної активності CD4), LT8 (для оцінювання експресії Т-клітинного маркера ефекторної/супресорної активності CD8), LNK16 (для оцінки експресії маркера природної кілерної активності CD16) та F(ab)₂ – фрагментів овежих антитіл до IgG миші, мічених FITC («Сорбент», Росія). Рівень імуноглобулінів у сироватці крові визначали методом радіальної імунодифузії за Манчіні з використанням моноспецифічних сироваток проти IgG(H), IgM(H), IgA(H). Вміст кортизолу у сироватці крові визначали імуноферментним методом із використанням набору «BIO-RAD» (Росія). Дані про стан радіаційного забруднення територій отримали в обласній санітарно-

епідеміологічній станції та регіональній державній лабораторії ветеринарної медицини.

Для оцінки взаємозалежності показників визначали коефіцієнт кореляції Пірсона.

Результати та їх обговорення

За відсутності психоемоційного навантаження у мешканців територій, забруднених радіонуклідами, вміст кортизолу перебував на верхній межі гомеостатичної норми ($637 \pm 6,0$ ммоль/л). Спостерігається середній позитивний корелятивний зв'язок між активністю радіонуклідів, відзначеною для місця проживання обстежених

згідно із загальнодозиметричною паспортизацією, та значенням вмісту кортизолу у сироватці крові. Середні позитивні корелятивні зв'язки відмічені також між активністю радіонуклідів та рівнем нейтрофілів (за абсолютним і відносним числом), низькі позитивні – із рівнем IgG та IgM у сироватці крові. Середні негативні корелятивні зв'язки відмічені між активністю радіонуклідів та такими показниками: абсолютним і відносним числом функціонально зрілих Т-лімфоцитів із фенотипом CD3+, абсолютним і відносним числом їх хелперної субпопуляції CD4+, абсолютним і відносним числом природних кілерів із фенотипом CD16+; сильний негативний зв'язок – з імунорегуляторним індексом CD4+/CD8+ (табл.).

Таблиця

Кореляція між радіаційним забрудненням, продукцією кортизолу та показниками імунної системи в обстежених із територій посиленого радіоекологічного контролю (n = 250)

Характеристика	Кортизол, ммоль/л	Нейтрофіли, % $\times 10^9/\text{л}$	CD3+, % $\times 10^9/\text{л}$	CD5+, % $\times 10^9/\text{л}$	CD4+, % $\times 10^9/\text{л}$	CD8+, % $\times 10^9/\text{л}$	CD16+, % $\times 10^9/\text{л}$	CD4+/CD8+	IgG, мг/мл	IgM, мг/мл
Активність радіонуклідів, Кі/км ² , до стресу	0,521*	0,481* 0,513*	-0,521* -0,502*	-0,112 -0,098	-0,572* -0,531*	0,122 0,111	-0,532* -0,491*	-0,792*	0,252*	0,209*
Кортизол, ммоль/л, до стресу	1,000*	0,415* 0,445*	-0,450* -0,403*	-0,101 -0,109	-0,504* -0,491*	0,131 0,101	-0,443* -0,414*	-0,604*	0,201*	0,215*
Активність радіонуклідів, Кі/км ² , стрес	0,842*	0,571* 0,537*	-0,556* -0,561*	-0,452* -0,404*	-0,684* -0,662*	0,432* 0,444*	-0,621* -0,689*	-0,810*	-0,451*	-0,121
Кортизол, ммоль/л, стрес	1,000*	0,510* 0,513*	-0,601* -0,611*	-0,500* -0,520*	-0,713* -0,704*	0,404* 0,422*	-0,611* -0,645*	-0,852*	-0,433*	-0,112

Примітки: * – достовірність коефіцієнта кореляції, $P < 0,05$; для популяцій і субпопуляцій клітин імунної системи вказано коефіцієнти кореляції з відносною кількістю (верхній показник) і абсолютною кількістю (нижній показник).

Позитивна кореляція активності радіонуклідів на забрудненій території та вмісту нейтрофілів у периферичній крові є логічною, оскільки поліморфноядерні лейкоцити вважаються важливим індикатором стресової реакції. Негативна кореляція хелперних Т-лімфоцитів та природних кілерів дає підстави робити висновок про певні збої в ефективності роботи противірусного та протипухлинного імунітету. Справді, Т-лімфоцити з фенотипом CD4+ стимулюють запуск численних імунних процесів, а лімфоцити з фенотипом CD16+ відіграють важливу роль у розпізнаванні та знищенні малігнізованих клітин (Drannik, 1999; Yarin, 1999). Отримані дані узгоджуються з даними літератури щодо підвищеної чутливості до впливу іонізуючого випромінювання саме хелперних Т-лімфоцитів (Kinet, 2007).

Відсутність кореляційної залежності з активністю радіонуклідів експресії антигену CD8, який є одним із головних маркерів ефекторної та супресорної активності Т-лімфоцитів, зумовлена, очевидно, тим, що клітини з фенотипом CD8+ вважаються відносно кортизолрезистентними та найстійкішими до впливу іонізуючого випромінювання (Finlay, 2011; Hommel, 2007).

Вміст кортизолу за відсутності додаткових стресових чинників демонструє середній позитивний корелятивний зв'язок із відносною та абсолютною кількістю нейтрофілів, низький позитивний зв'язок із рівнем IgG та IgM у сироватці крові, середній негативний корелятивний зв'язок із відносною та абсолютною кількістю функціонально зрілих Т-лімфоцитів із фенотипом CD3+, відносною та абсолютною кількістю хелперних Т-лімфоцитів із фенотипом CD4+, відносною та абсолютною кількіс-

тю природних кілерів із фенотипом CD16+, а також сильний негативний зв'язок з імунорегуляторним індексом CD4+/CD8+ (табл.).

Відповідно, між вмістом кортизолу та оцінюваними показниками імунної системи спостерігаються корелятивні зв'язки того ж напрямку, що і між активністю радіонуклідів, але значення коефіцієнта кореляції нижчі (табл.). Таким чином, за умов відсутності додаткових стресових впливів спостерігається певна адаптація до постійної помірної гіперпродукції кортизолу. Проте, оскільки за майже 20 років спостережень відмічено тенденцію до певного зростання зазначених коефіцієнтів кореляції, можна зробити висновок про посилення залежності показників клітинної ланки від дозового навантаження (як наслідку вищої чи нижчої активності радіонуклідів на певній території) та зумовленої ним гіперпродукції кортикостероїдів.

Виявлені закономірності показують, що імуносупресія клітинної ланки, яка залежить від дозового навантаження, до певної міри компенсується зростанням концентрації сироваткових імунoglobulinів. Ефект узгоджується з даними літератури про вищу чутливість до стресових впливів узагалі та радіаційного чинника зокрема саме Т-клітинної ланки імунної системи (Titov, 1995; Godekmerdan, 2004; Sajjadih, 2009; Weng, 2010; Jahns, 2011; Balogh, 2013).

За умов додаткового стресового впливу, зумовленого психоемоційним навантаженням під час екзаменаційної сесії, в обстежених достовірно зростає вміст кортизолу у сироватці крові ($893 \pm 8,1$ ммоль/л). При цьому спостерігаються корелятивні залежності, подібні до відмічених у

міжсесійний період, проте, є певні особливості. Зокрема, між рівнем кортизолу та активністю радіонуклідів спостерігається сильний позитивний кореляційний зв'язок. Посилюється ступінь кореляційної залежності між радіаційним забрудненням і вмістом кортизолу, з одного боку, та імуносупресією на рівні показників хелперних Т-лімфоцитів, імунорегуляторного індексу, природних кілерних клітин – з іншого. З'являється середній негативний кореляційний зв'язок між активністю радіонуклідів (а також концентрацією кортизолу) та експресією пан-Т-клітинного маркера CD5, середній позитивний – з абсолютним та відносним числом супресорних Т-лімфоцитів із фенотипом CD8+, змінюється з позитивної на негативну кореляційна залежність із рівнем сироваткового IgG (табл.).

Таким чином, додатковий короткочасний стресовий чинник, поєднаний із хронічним впливом малих доз радіації, посилює залежність імуносупресії, зумовленої радіаційним забрудненням місцевості проживання обстежених, і викликає збої у компенсаторних механізмах, зокрема, на рівні продукції сироваткових імуноглобулінів.

Виражена імуносупресія в обстежених із населених пунктів, що мали вищі дозові навантаження, була підставою для надання рекомендації даному контингенту щодо подальших обстежень у санаторії-профілакторії при університеті, а після огляду лікарів санаторію (для окремих осіб) – в обласних ендокринологічній та онкологічній лікарнях.

Висновки

В обстежених, які зазнали хронічного впливу малих доз радіації, важливим фактором, що визначає вираженість імуносупресії, можна вважати активність радіонуклідів на території проживання та зумовлену їх дією гіперпродукцію кортикостероїдів. Додаткове стресове навантаження, зокрема, емоційної природи, посилює залежність імуносупресії від ступеня радіаційного забруднення та здатне викликати збої у роботі компенсаторних механізмів. Незважаючи на зниження протягом 1995–2015 рр. дозового навантаження на мешканців територій посиленого радіоекологічного контролю, вони є групами ризику розвитку порушень стану здоров'я, зокрема, на рівні роботи імунної та ендокринної систем, і потребують регулярних медичних оглядів.

Бібліографічні посилання

Balogh, A., Persa, E., Bogdarndi, E.N., Benedek, A., Hegyesi, H., Sarfrany, G., Lumniczky, K., 2013. The effect of ionizing radiation on the homeostasis and functional integrity of murine splenic regulatory T cells. *Inflamm. Res.* 62, 201–212.

Drannik, G.N., 1999. Clinical immunology and allergology [Klinicheskaja immunologija i allergologija]. Astroprint, Odessa (in Russian).

Finlay, D., Cantrell, D.A., 2011. Metabolism, migration and memory in cytotoxic T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 109–117.

Godekmerdan, A., Ozden, M., Ayar, A., 2004. Diminished cellular and humoral immunity in workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation. *Arch. Med. Res.* 35, 324–328.

Hommel, M., Hodgkin, P.D. 2007. TCR affinity promotes CD8+ T cell expansion by regulating survival. *J. Immunol.* 179, 2250–2260.

Hoshi, M., Konstantinov, Y.O., Evdeeva, T.Y., Kovalev, A.I., Akseonov, A.S., Koulikova, N.V., Sato, H., Takatsui, T., Takada, J., Endo, S., Shibata, Y., Yamashita, S. 2000. Radiocesium in children residing in the western districts of the Bryansk oblast from 1991–1996. *Health Phys.* 79, 182–186.

Jahns, J., Anderegg, U., Saalbach, A., Rosin, B., Patties, I., Glasow, A., Kamprad, M., Scholz, M., Hildebrandt, G. 2011. Influence of low dose irradiation on differentiation, maturation and T-cell activation of human dendritic cells. *Mutat. Res.* 709–710, 32–39.

Khaitov, R.M., Leskov, V.P., 2001. Immunity and stress [Immunitet i stress]. *Rossijskij Fiziologicheskij Zhurnal* 87(8), 1060–1072 (in Russian).

Kinet, S., Swainson, L., Lavanya, M., Mongellaz, C., Montel-Hagen, A., Craveiro, M., Manel, N., Battini, J.L., Sitbon, M., Taylor, N., 2007. Isolated receptor binding domains of HTLV-1 and HTLV-2 envelopes bind Glut-1 on activated CD4+ and CD8+ T cells. *Retrovirology* 4, 31.

Manuck, S.B., Cohen, S., Rabin, B.S., 1991. Individual differences in cellular immune response to stress. *Psychol. Sci.* 2, 111–114.

McMahon, D., Vdovenko, V., Karmaus, W., 2014. Effects of long-term low-level radiation exposure after the Chernobyl catastrophe on immunoglobulins in children residing in contaminated areas: prospective and cross-sectional studies. *Environ. Health* 13(1), 36–50.

Morita, N., Takamura, N., Ashizawa, K., Shimasaki, T., Yamashita, S., Okumura, Y., 2005. Measurement of the whole-body ¹³⁷Cs in residents around the Chernobyl nuclear power plant. *Radiat. Prot. Dosim.* 113, 326–329.

Sajjadih, M.R., Sheikh, L.V., Kuznetsova, V.B., 2009. Effect of ionizing radiation on development process of T-cell population lymphocytes in Chernobyl children. *Iran. J. Radiat. Res.* 7, 127–133.

Shirinsky, I., Shirinsky, V., 2001. Social stress disorders and immunity. *Russ. J. Immunol.* 6(2), 207–214.

Telnov, V.I., Zhuntova, G.V., 2002. Genotypic analysis of biochemical status of people received radioactive irradiation [Genotipicheskij analiz biohimicheskogo statusa u ljudej, obluchennyh v znachitel'nyh dozah]. *Voprosy Medicinskoj Khimii* 44(5), 56–60 (in Russian).

Titov, L., Kharitonic, G., Gourmanchuk, I., Ignatenko, S., 1995. Effects of radiation on the production of immunoglobulins in children subsequent to the Chernobyl disaster. *Allergy Asthma Proc.* 16(4), 185–193.

Weng, L., Williams, R.O., Vieira, P.L., Screatton, G., Feldmann, M., Dazzi, F., 2010. The therapeutic activity of low-dose irradiation on experimental arthritis depends on the induction of endogenous regulatory T cell activity. *Ann. Rheum. Dis.* 69, 1519–1526.

Yarilin, A.A., 1999. Osnovy immunologii [Immunology fundamentals]. Medicine, Moscow (in Russian).

Надійшла до редколегії 14.09.2015



УДК 612.57:612.08+612.014.461.3

Особливості фракційного складу тканинної води в умовах загальної гіпертермії в експерименті

О.В. Кузнецова

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ, Україна

Оцінено вплив загальної гіпертермії на міжфракційний розподіл води у тканині головного мозку, передсердь серця та нирок щурів методом ^1H -ЯМР-релаксометрії. Нагрівання щурів у термокамері за температури $+43 \dots +45 \text{ }^\circ\text{C}$ протягом 60 хвилин спричинило у тварин гіпертермію, дегідратацію, алкалоз і гіпернатріємію. Швидкий розвиток гіпернатріємії сприяє різкому підвищенню осмоляльності плазми, що створює градієнт між внутрішньо- та позаклітинною рідиною тканин організму та викликає у тканинах перерозподіл води між фракціями, про що свідчить динаміка ЯМР-релаксаційних показників тканинної води. За умов гіпертермії фракційний склад тканинної води передсердь серця щурів не змінився (час поздовжньої (T_1) і поперечної (T_2) релаксації достовірно не відрізнявся від показників інтактної тканини). За впливу гіпертермії у головному мозку формується фракція кристалізованої води (подовження T_1 та вкорочення T_2 показників релаксації), що запобігає втраті води клітинами. У тканині нирок за гіпертермії збільшується фракція вільної води та частка внутрішньоклітинної рідини (різке подовження T_1 і T_2 показників релаксації). У кірковій речовині нирок виявлено потовщення гідратаційної фракції позаклітинної води (подовження T_1 показника релаксації, T_2 достовірно не відрізнявся порівняно з інтактною тканиною) завдяки збільшенню вмісту іонів натрію у тканині. Якісний спектр змін тканинної води за умов гіпертермії спрямований на зниження об'єму рідини, що виводиться з організму.

Ключові слова: ЯМР-релаксометрія; час поздовжньої (T_1) релаксації; час поперечної (T_2) релаксації; внутрішньоклітинна вода; позаклітинна вода; тепловий стрес

Peculiarities of tissue water fractional composition in case of experimental whole-body hyperthermia

O.V. Kuznetsova

Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

The present study, using proton nuclear magnetic resonance relaxation (NMR) method, was undertaken to compare the water fractional composition in nature tissues (group 1) with those damaged by experimental whole-body hyperthermia (group 2). We measured longitudinal or "spin-lattice" (T_1) and transverse or "spin-spin" (T_2) relaxation times of protons of tissues (brain, the atria of the heart, the kidneys and the renal cortex) from adult Wistar rats. The differences in T_1 , T_2 and percentage of the intra- and extracellular water between group 1 and 2 were studied to help understand how the water moves in tissues at hyperthermia. The results of this study and the literature data allow to make conclusions about tissue water fractional composition in case of experimental whole-body hyperthermia: (1) fractional composition of water and the distribution of intra- and extracellular fluid in the tissue of the atria of the heart did not change (T_1 and T_2 relaxation times remained unchanged); (2) the crystalline water fraction increased in brain (longer T_1 relaxation rate and shorter T_2 relaxation rate). This is obstructing the exchange of protons between free and bound water in brain. Thus, loss of water by brain cells is prevented. The distribution between intra- and extracellular fluid in brain remained unchanged; (3) fraction of free water increased in renal tissue (simultaneous longer T_1 and T_2 relaxation rates) by reducing the volume of extracellular fluid; (4) thick hydration layer of water (longer T_1 relaxation rate, T_2 remained unchanged) was formed in the extracellular fluid of renal cortex. This water layer is formed around the sodium ions which concentration is increased in renal cortex tissue of rats from group 2. As a result, the amount of fluid secreted by kidneys is reduced, i.e. there is a retention of water in the body. The relevance of our research for the understanding of high temperatures' adaptation mechanisms is discussed in this paper.

Keywords: NMR-relaxometry; longitudinal (T_1) relaxation time; transverse (T_2) relaxation time; intracellular water; extracellular water; heat stress

Вступ

Вода – одна з найважливіших хімічних сполук у живих організмах. Від її вмісту в організмі залежать швидкість біохімічних реакцій, транспортування речовин, показники гомеостазу, здатність протистояти стресовим факторам. Втрата організмом близько 10–20% води небезпечна для життя та може спричинити загибель. Дослідження структурних особливостей внутрішньоклітинної та позаклітинної води в живих організмах виявили, що вода у тканинах існує у вигляді двох фракцій: вільної та зв'язаної (Aksyonov, 1987).

Фракція вільної води характеризується високою рухливістю, її присутність інтенсифікує фізіологічні процеси (Despa, 2005; Cameron and Fullerton, 2014). У клітинах вільна вода є розчинником або середовищем для перебігу ферментативних реакцій і транспортування речовин. Молекули вільної води перебувають на віддаленій відстані від поверхні розчинених речовин і взаємодіють тільки між собою. Якщо вільна вода затримується в організмі, вона збирається під шкірою та утворює набряки. При її втраті зменшується об'єм плазми крові, кровопостачання тканин і, відповідно, транспортування до них поживних речовин і кисню, що впливає на роботу скелетних м'язів, серцево-судинної системи та мозку.

Друга, менш рухлива, фракція зв'язаної води розташована ближче до поверхні біомолекул і знаходиться у гідрофобних каналах і порожнинах різної форми, що існують усередині біополімерів і мембран. Вона міцно прилягає до поверхні часток матеріалу, густина її значно перевищує звичайну густину води (Davidson et al., 2013). Фракція зв'язаної води необхідна для стабілізації структури та функціональної інтеграції внутрішньоклітинних макромолекул і дифузії речовин через мембрану (Zhou et al., 2004; Fullerton and Cameron, 2007). Зв'язана вода поділяється на два різновиди: міцно зв'язана зі структурами макромолекул, наприклад, білків (кристалізована вода), і гідратаційна вода, яка входить до складу гідратних оболонок органічних молекул, як біополімерів (насамперед білків), так і низькомолекулярних речовин. Міцність зв'язування молекул води з біополімерами має велике значення для формування та стабілізації їх нативної структури та функціональної активності у живих системах. За низького ступеня гідратації поверхневих полярних груп між молекулами виникають додаткові контакти, які знижують конформаційну рухливість глобул білків, що спричинює втрату ферментативної активності (Zhang and Stemer, 2006). Тому участь води у формуванні біоструктур зумовлює, з одного боку, виникнення стабілізуювальних гідрофобних взаємодій, а з іншого – створення конформаційної рухливості молекул.

Співвідношення вільної та зв'язаної води у тканині має для неї велике фізіологічне значення. Швидкість окремих реакцій та інтенсивність фізіологічних процесів у цілому залежать від вмісту вільної води у тканині (Sulyok, 2006). Стійкість до несприятливих зовнішніх впливів, навпаки, має пряму кореляцію з умістом зв'язаної води. Між різними фракціями води існує динамічна рівновага та можливість їх взаємних

переходів. Наприклад, вміст гідратаційної води може збільшуватися за рахунок вільної та кристалічної води (Hortelano et al., 2001).

Останніми роками у науковій літературі йде активна дискусія про механізми дії локальної та загальної гіпертермії на організм людини, її вплив на патогенез різних захворювань (Falk and Issels, 2001; Litvitsky, 2010). Нині гіпертермія успішно застосовується у клініках США, країн Європи та Азії для лікування різних захворювань (Bull et al., 2008; Kok et al., 2015). Клінічному застосуванню загальної гіпертермії має передувати її експериментальне моделювання з метою повнішого та детальнішого вивчення патогенетичних аспектів впливу високої зовнішньої температури на клітини, тканини, органи та організм у цілому.

Стабільність регуляції всіх життєвих функцій гарантується здатністю організму до утримання температури тіла у вузьких межах. Будь-яка зміна у стані теплообміну негайно викликає перебудову у гетерогенній функціональній системі – апараті терморегуляції, характерною рисою якого є відсутність спеціальних органів і використання різних органів і функцій. Зміна теплового режиму у бік підвищення загальної температури тіла викликає значні зміни на всіх рівнях багатоклітинного організму: молекулярному, клітинному та тканинному (Kozlov, 1990; Sreenivasa et al., 2003; Efremov et al., 2006; Dayanc et al., 2008; Peer et al., 2010). Вода відіграє важливу роль у підтриманні постійної температури тіла організму. З підвищенням температури вона інтенсивно випаровується у вигляді поту, що запобігає перегріванню організму (Chvyrev et al., 2000). Внутрішньоклітинний об'єм є важливим інтегральним показником клітинного гомеостазу. Зміни внутрішньоклітинного об'єму ініціюють запуск механізмів регуляції метаболічних процесів у клітині (Ling and Tucser, 1988). Гомеостатичні механізми організму досить ефективно регулюють обмін води та електролітів, підтримуючи в межах фізіологічної норми осмотичний тиск позаклітинної, а через неї і внутрішньоклітинної рідини.

Великий інтерес становлять дослідження процесів транспорту води та іонів через біологічні мембрани, з'ясування індивідуальних характеристик гідратації органів за умов гіпертермії. Ці питання мають першорядне значення для розкриття біохімічних механізмів адаптації біологічних систем до зміни температури навколишнього середовища, причин їх загибелі за високої температури.

Мета статті – охарактеризувати зміни фракційного складу води тканин головного мозку, передсердя та нирок шурів за впливу високої температури (+43...+45 °C) протягом 60 хвилин.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проводили на статевозрілих білих щурах-самцях лінії Вістар масою 200–250 г. Догляд за тваринами здійснювали згідно з Директивами Європейського союзу 2019/10/63 ЄС про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших

наукових цілей, і відповідно до Закону України №3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження». Тварин утримували в умовах віварію на звичайному збалансованому раціоні та вільному доступі до води.

Методом випадкової вибірки тварин поділили на дві групи по 10 особин у кожній: I група – інтактні тварини, які слугували контролем, II – дослідні, яких нагрівали в термокамері з температурою повітря +43...+45 °С, відносною вологістю повітря 75–85%, концентрацією кисню в межах 20,0–20,5% протягом 60 хвилин. До і після перегріву тварин зважували та вимірювали у них ректальну температуру. Після закінчення теплового впливу тварин декапітували під легким ефірним наркозом із наступною екстирпацією досліджуваних органів (головний мозок, серце та нирки). Кров тварин збирали у дві пробірки: із гепарином (для вимірювання рН плазми крові) та без антикоагулянту (для визначення концентрації іонів натрію у сироватці крові). Пробірки з кров'ю центрифугували за +4 °С протягом 10 хв (3 000 об./хв). рН крові вимірювали на цифровому аналізаторі рН і газів крові ОР-215 (Угорщина). Вміст іонів натрію визначали методом полум'яної фотометрії (Kolb and Kamyshnikov, 1982).

Фракції тканинної води визначали методом ядерно-магнітно-резонансної (ЯМР)-релаксометрії, який має високу чутливість до внутрішньомолекулярних рухів і дає можливість оцінити структуру води у клітині (MacFall et al., 1987; Tregnaghi, 1991). Кожна із фракцій тканинної води характеризується різними ЯМР-показниками: часом поздовжньої, або «спін-граткової» (T_1) і поперечної, або «спін-спінової» (T_2) релаксації протонів. Підготовку проб для ЯМР-релаксометрії виконували як описано у роботах Bell (1989) і Krik (1990). Досліджувані тканини зважували, поміщали у скляну пробірку діаметром 10 мм і прогрівали у термобані «Нааке» (Німеччина) до +40 °С протягом 10 хв. У тканині головного мозку, передсердя, нирок і кіркової речовини нирок щурів аналізували час поздовжньої, або «спін-граткової» (T_1) і поперечної, або «спін-спінової» (T_2) ЯМР-релаксації протонів на релаксометрії Minispec PC 120 (Bruker Optik GmbH, Німеччина) з робочою частотою 25 МГц. T_1 показник релаксації визначали за 40 точками методом інверсії-відновлення, в якому спочатку задається 180° імпульс, а через певний час – 90° імпульс, що зчитується. T_2 показник вимірювали за 25 точками, використовуючи класичну послідовність імпульсів Кара – Парселла – Мельбума – Гілла, в основі якої лежить опромінення зразка зондувальними імпульсами 90°-τ-180° та реєстрація спінового відлуння. Час повторення обрано однаковим в обох вимірах (3 с).

Математичну обробку отриманих значень T_1 і T_2 показників проведено автоматично з використанням програмного пакета Experiment Supervisor (Bruker Optik GmbH, Німеччина). За наявності двокомпонентних кривих показники часу релаксації розкладали на біекспоненти та за показниками T_a і T_b розраховували частки внутрішньо- (P_a) та позаклітинної (P_b) води за формулою:

$$P_a = [T_a / (T_a + T_b)] \cdot 100\%,$$

$$P_b = 100\% - P_a, \%$$

де T – час релаксації (мс), P_a – частка внутрішньоклітинної води (%), P_b – частка позаклітинної води (%).

Статистичну обробку експериментальних даних виконували з використанням ліцензійного пакета приклад-

них програм статистичного аналізу Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США). Розраховували середнє арифметичне варіаційного ряду (M) і помилку (m). Достовірність відмінностей між дослідною та контрольною групами оцінювали за t -критерієм Стьюдента. Відмінності вважали достовірними за $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Перебування тварин у термокамері за температури +43...+45 °С протягом 60 хвилин викликало зростання їх ректальної температури на $3,1 \pm 0,25$ °С: $36,5 \pm 0,2$ °С і $39,6 \pm 0,3$ °С до і після нагрівання відповідно. Після перегрівання у щурів зменшилась вага на $4,5 \pm 0,6$ г (2% маси тіла). Ці дані свідчать про дегідратацію організму дослідних тварин. Облігатна втрата води зумовлена потребами процесів терморегуляції, які забезпечують життєдіяльність організму в умовах теплового стресу. Утворення поту відбувається за рахунок позаклітинної, внутрішньосудинної рідини, а також незначною мірою за рахунок води еритроцитів (Chvuyev, 2000). Активація потовиділення та дихання у дослідних тварин спричинило зсув рН плазми крові: $7,66 \pm 0,03$ у дослідних тварин порівняно з $7,42 \pm 0,02$ у інтактних тварин ($P < 0,05$). Зміна рН крові викликана як посиленням виділенням з організму CO_2 , так і накопиченням в організмі тварин лужних сполук при затриманні натрію. У сироватці крові щурів із гіпертермією концентрація іонів натрію зросла у 1,2 раза: $161,7 \pm 5,5$ ммоль/л порівняно з $136,0 \pm 2,0$ ммоль/л у інтактних тварин ($P < 0,05$). Швидкий розвиток гіпернатріємії спричинює різке підвищення осмолярності плазми крові щурів, що створює осмотичний градієнт між внутрішньо- та позаклітинною рідинами тканин організму та зумовлює гідратацію або дегідратацію клітин.

На основі аналізу динаміки показників ЯМР-релаксації протонів води тканин головного мозку, передсердя, нирок і кіркової речовини нирок інтактних і дослідних щурів, ми охарактеризували зміни фракційного складу води органів, що задіяні у механізмах регуляції водно-сольового балансу організму в умовах високої температури навколишнього середовища.

Вимірювання часу поздовжньої (T_1) та поперечної (T_2) релаксації протонів тканинної води головного мозку, передсердь, нирок і кіркової речовини нирок інтактних тварин показало, що, кожна досліджена тканина характеризується індивідуальним значенням часу поздовжньої релаксації протонів (рис. 1). При цьому T_1 кіркової речовини нирок $< T_1$ нирок $< T_1$ головного мозку $< T_1$ передсердь. За часом поперечної релаксації досліджувані тканини відрізнялися несуттєво: T_2 передсердь = T_2 кіркової речовини нирок = T_2 нирок $< T_2$ головного мозку (рис. 2). В усіх досліджених тканинах переважала фракція внутрішньоклітинної (P_a) води (рис. 3). Отриманні результати відповідають даним літератури (MacFall, 1987).

У механізмі адаптації організму до високих температур велике значення має коригувальна функція центральної нервової системи. Особливо чутливі до дегідратації чи надмірної гідратації клітини головного мозку. Втрата тканинної рідини спричинює зморщуван-

ня тканини центральної нервової системи, викликаючи кровотечі внаслідок розриву судин, що з'єднують тверду мозкову оболонку та поверхню головного мозку (Kozlov, 1990). У тканині головного мозку щурів із гіпертермією встановлено подовження часу поздовжньої (T_1) та вкорочення часу поперечної (T_2) релаксації протонів води тканини (рис. 1, 2). Така динаміка T_1 і T_2 показників характерна для кристалізованої фракції води (Ling, 2003). Формування фракції зв'язаної води свідчить про наявність великої кількості місць зв'язування: іонізованих ($-\text{COO}^-$, $-\text{NH}_3^+$) і полярних груп

($-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{CONH}_2$, $=\text{C}=\text{O}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{CONH}_2$, $-\text{SH}$, $=\text{NH}$), що входять до складу біомолекул (Garcia-Martin et al., 2001). За присутності білків та інших молекул, які зв'язують воду, суттєво зменшується коефіцієнт самодифузії, що ускладнює обмін протонами між вільною та кристалізованою водою. Тим самим гальмується втрата води клітинами головного мозку за умов гіпертермії. У щурів із гіпертермією розподіл між внутрішньо- (P_a) та позаклітинною (P_v) рідиною головного мозку не змінився порівняно з інтактними тваринами (рис. 3).

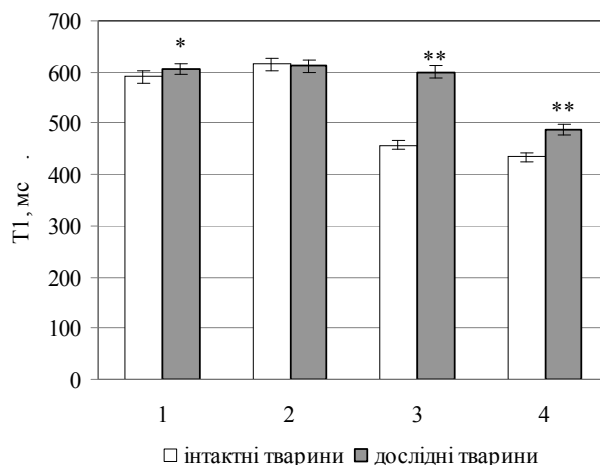


Рис. 1. Час поздовжньої (T_1) релаксації протонів води тканин щурів в умовах загальної гіпертермії:

1 – головний мозок, 2 – передсердя, 3 – нирки, 4 – кіркова речовина нирок;

* – $P < 0,05$, ** – $P < 0,025$ порівняно з інтактними тваринами, $n = 10$

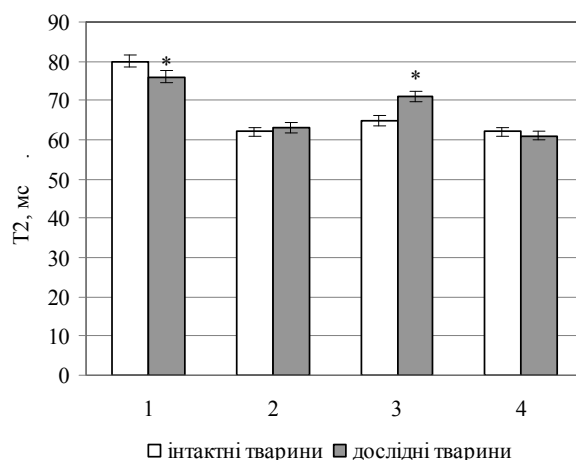


Рис. 2. Час поперечної (T_2) релаксації протонів води тканин щурів в умовах загальної гіпертермії:

1 – головний мозок, 2 – передсердя, 3 – нирки, 4 – кіркова речовина нирок;

* – $P < 0,05$ порівняно з інтактними тваринами, $n = 10$

Реакцію організму на вплив високих температур навколишнього середовища багато в чому визначає стан серцево-судинної системи. Кров, яка надходить у периферичні судини на поверхні тіла, віддає частину тепла, що утворюється у результаті окисних процесів у клітині. Порушення серцево-судинної системи в умовах загальної гіпертермії організму відбуваються внаслідок впливу гіпертермії на центральну нервову систему або через зміни у самому серці. У дослідних тварин не встановлено достовірних змін T_1 і T_2 показників релаксації протонів тканинної води передсердь порівняно з

інтактними тваринами (рис. 1, 2). Дані літератури свідчать, що вміст води у тканинах серця за дії високих температур навколишнього середовища майже не змінюється (Chvuguev, 2000). Кров згущується, порушується кровообіг, що зумовлює подальше зростання температури тіла.

Одна з лімітувальних ланок у системі регуляції теплообміну – стан водно-сольової рівноваги організму, у чому особливо важлива роль належить екскреторній функції нирок. У нирковій тканині щурів із гіпертермією встановлено суттєве подовження часу поздовжньої (T_1) та поперечної (T_2) релаксації протонів води (рис. 1, 2)

порівняно з інтактною тканиною. Така динаміка показників ЯМР-релаксації протонів свідчить про підвищення рухливості молекул тканинної води, прискорення протонного обміну між кристалічною та вільною фракціями тканинної води, зменшення гідрованого шару (Kuchel et al., 1994). Зростання у нирках щурів із гіпертермією фракції вільної води відбувається за рахунок зменшення частки позаклітинної (Pb) води (рис. 3). Порушення гідратації клітин нирок зумовлене змінами концентрації у плазмі крові розчинних речовин, зокрема, іонів натрію (Titze, 2008).

Характер змін показників релаксації тканинної води кіркової речовини нирок дослідних тварин був іншим, ніж ниркової тканини. У кірковій речовині нирок щурів із гіпертермією виявлене зрушення тільки часу поздовжньої (T_1) релаксації протонів тканинної води, який збільшився

порівняно з інтактною тканиною (рис. 1). Час поперечної (T_2) релаксації протонів тканинної води кіркової речовини нирок щурів із гіпертермією був таким, як у інтактних тварин (рис. 2). Таке поєднання показників свідчить про повільний протонний обмін між зв'язаною та вільною фракціями води, зменшення структуризації води (Camegon et al., 1984). Проте не за рахунок гідрованого шару, що формується навколо іонів натрію, концентрація яких зросла у кірковій речовині нирок щурів із гіпертермією: $133,3 \pm 3,36$ і $145,4 \pm 2,84$ ммоль/л відповідно в інтактних і дослідних тварин ($P < 0,05$). Потужний шар води у частині позаклітинної рідини (рис. 3) тканини кіркової речовини нирок дослідних щурів перешкоджає надходженню води у клітину. Зменшення частки вільної води у клітині веде до зниження її активності та об'єму рідини, що виділяється нирками.

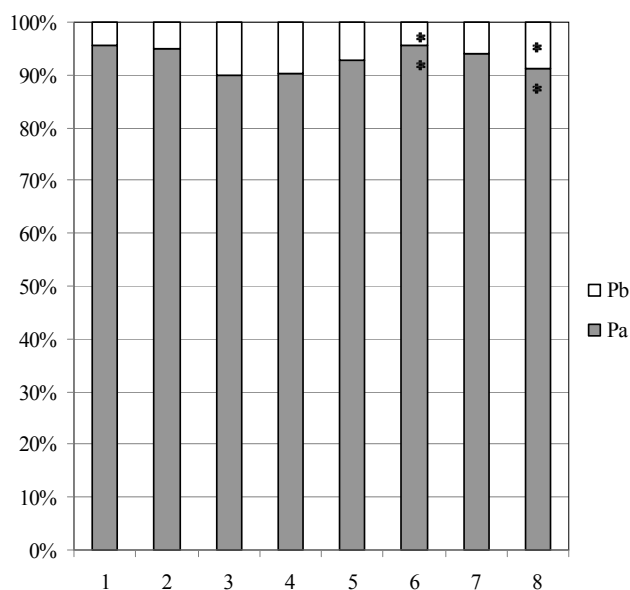


Рис. 3. Співвідношення внутрішньо- (Pa) та позаклітинної (Pb) води тканин щурів в умовах загальної гіпертермії: 1 – головний мозок, інтактні тварини, 2 – головний мозок, дослідні тварини, 3 – передсердя, інтактні тварини, 4 – передсердя, дослідні тварини, 5 – нирки, інтактні тварини, 6 – нирки, дослідні тварини, 7 – кіркова речовина нирок, інтактні тварини, 8 – кіркова речовина нирок, дослідні тварини; * $P < 0,05$ порівняно з інтактними тваринами, $n = 10$

На основі вищевикладеного матеріалу є підстави стверджувати, що за дії загальної гіпертермії на організм можливі два шляхи розвитку подальших змін: по-перше, підвищення температури різних органів і тканин і безпосередній вплив температурного чинника на їх структуру та обмін речовин у них, по-друге, активація механізмів адаптації до високих температур із наступним впливом на організм зрушень, що відбулися внаслідок регуляції температури тіла. Подальші дослідження наслідків впливу перегріву на стан організму тварин і людини дозволять розкрити закономірності розвитку патологічних процесів, що виникають під впливом екзогенної гіпертермії, та розширити теоретичний базис для розроблення засобів профілактики розвитку теплового стресу.

Висновки

Гіпертермія у тварин спричинила різноспрямовані зміни показників часу поздовжньої (T_1) та поперечної

(T_2) релаксації протонів тканинної води головного мозку, передсердь, нирок і кіркової речовини нирок органів.

T_1 і T_2 показники релаксації протонів тканинної води передсердь дослідних тварин достовірно не відрізнялись від показників інтактних тварин.

За впливу гіпертермії в головному мозку щурів формується міцно зв'язана з макромолекулярними структурами фракція кристалічної води, що ускладнює обмін протонами між вільною та кристалічною водою у клітинах, тим самим відводиться втрата води головним мозком.

У щурів із гіпертермією спостерігається міжфракційний перерозподіл води ниркової тканини, що супроводжується зміною фільтраційно-реабсорбційної здатності нирок.

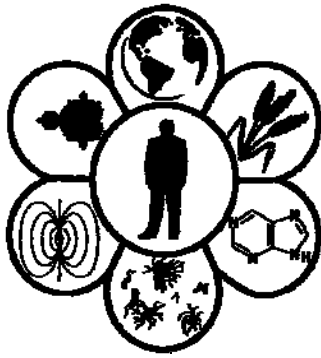
Подяка

Моя подяка професору Ірині Олександрівні Комаревцевій за допомогу у проведенні експериментального етапу досліджень.

Бібліографічні посилання

- Aksyonov, S.I., 1987. Water and its importance in the cell. Zinatne, Riga (in Latvian).
- Bell, J.D., Brown, C.C.J., Sadler, P.J., 1989. NMR studies of body fluids. *NMR Biomed.* 2(5–6), 246–256.
- Bull, J.M., Strebel, F.R., Jenkins, G.N., Deng, W., Rowen, R.W., 2008. The importance of schedule in whole body thermochemotherapy. *Int. J. Hyperther.* 24(2), 171–181.
- Cameron, I.L., Ord, V.A., Fullerton, G.D., 1984. Characterization of proton NMR relaxation times in normal and pathological tissues by correlation with other tissue parameters. *Magnet. Reson. Imaging* 2(2), 97–106.
- Cameron, I.L., Fullerton, G.D., 2014. Lack of appreciation of the role of osmotically unresponsive water in cell volume regulation. *Cell Bio. Int.* 38(5), 610–614.
- Chvyrev, V.G., Azhaev, V.N., Novozhilov, G.N., 2000. Heat stress. *Medicine, Moscow* (in Russian).
- Davidson, R.M., Lauritzen, A., Seneff, S., 2013. Biological water dynamics and entropy: A biophysical origin of cancer and other disease. *Entropy* 15, 3822–3876.
- Dayanc, B.E., Beachy, S.H., Ostberg, J.R., Repasky, E.A., 2008. Dissecting the role of hyperthermia in natural killer cell mediated anti-tumor responses. *Int. J. Hyperther.* 24(1), 41–56.
- Despa, F., 2005. Biological water: Its vital role in macromolecular structure and function. *Ann. NY Acad. Sci.* 1066(1), 1–11.
- Efremov, A.B., Pakhomov, Y., Michurina, C.B., Pakhomov, E.A., 2006. The role of metabolites of lipid peroxidation in acute hyperthermia. *Palliative Medicine and Reabilitaciya* 2, 27 (in Russian).
- Falk, M.H., Issels, R.D., 2001. Hyperthermia in oncology. *Int. J. Hyperther.* 17(1), 1–18.
- Fullerton, G.D., Cameron, I.L., 2007. Chapter one – Water compartments in cells. *Methods Enzymol.* 28, 1–28.
- Garsia-Martin, L.M., Ballesteros, P., Cerdán, S., 2001. The metabolism of water in cells and tissues as detected by NMR methods. *Prog. Nucl. Mag. Res. Spec.* 39(1), 41–77.
- Hortelano, S., Garcia-Martín, M.L., Cerdán, S., Castrillo, A., Alvarez, A.M., Boscá, L., 2001. Intracellular water motion decreases in apoptotic macrophages after caspase activation. *Cell Death Differ.* 8(10), 1022–1028.
- Kirk, K., 1990. NMR methods for measuring membrane transport rates. *NMR Biomed.* 3(1), 1–16.
- Kok, H.P., Wust, P., Stauffer, P.R., Bardati, F., van Rhoon, G.C., Crezee, J., 2015. Current state of the art of regional hyperthermia treatment planning: A review. *Radiat. Oncol.* 10(1), 196.
- Kolb, V.G., Kamyshnikov, V.S., 1982. Handbook of clinical chemistry. Minsk (in Byelorussian).
- Kozlov, N.B., 1990. Hyperthermia: Biochemical basis of pathogenesis, prevention, treatment. Voronezh Univ. Press, Voronezh (in Russian).
- Kuchel, P.W., Kirk, K., King, G.F., 1994. NMR methods for measuring membrane transport. *Subcell. Biochem.* 23, 247–327.
- Ling, G.N., 2003. A new theoretical foundation for the polarized-oriented multilayer theory of cell water and for inanimate systems demonstrating long-range dynamic structuring of water molecules. *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR.* 35(2), 91–130.
- Ling, G.N., Tucser, M., 1988. A physical theory of the living state: Application to water and solute distribution. *Scanning Microsc.* 2(2), 899–913.
- Litvitsky, P.F., 2010. Violations heat balance: Hyperthermia, hyperthermic reactions, heat stroke, sunstroke. *Voprosy Sovremennoi Pediatrii* 1, 96–102 (in Russian).
- MacFall, J.R., Wehrli, F.W., Breger, R.K., Johnson, G.A., 1987. Methodology for the measurement and analysis of relaxation times in proton imaging. *Magnet. Reson. Imaging* 5(3), 209–220.
- Peer, A.J., Grimm, M.J., Zynda, E.R., Repasky, E.A., 2010. Diverse immune mechanisms may contribute to the survival benefit seen in cancer patients receiving hyperthermia. *Immunol. Res.* 46(1–3), 137–154.
- Sreenivasa, G., Gellermann, J., Rau, B., Nadobny, J., Schlag, P., Deufflhard, P., Felix, R., Wust, P., 2003. Clinical use of the hyperthermia treatment planning system HyperPlan to predict effectiveness and toxicity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 55(2), 407–419.
- Sulyok, E., 2006. Physical water compartments: A revised concept of perinatal body water physiology. *Physiol. Res.* 55(2), 133–138.
- Titze, J., 2008. Water-free Na⁺ retention: Interaction with hypertension and tissue hydration. *Blood Purif.* 26(1), 95–99.
- Tregnaghi, A., Lacognata, C., Pellizzo, M.R., Muzzio, P.C., Coletta, F., 1991. The proton relaxation times in normal and neoplastic thyroid tissue. An *in vitro* study. *Radiol. Med.* 82(5), 613–616.
- Zhang, Y., Cremer, P.S., 2006. Interactions between macromolecules and ions: The Hofmeister series. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10, 658–663.
- Zhou, J., Wilson, D.A., Sun, P.Z., Klaus, J.A., van Zijl, P.C., 2004. Quantitative description of proton exchange processes between water and endogenous and exogenous agents for WEX, CEST, and APT experiments. *Magnet. Reson. Med.* 51, 945–952.

Надійшла до редколегії 07.09.2015



UDC 577+589.1+51.082

Protective/detoxicative function of metallothionein in the rat brain and blood induced by controlled cadmium doses

H.N. Shiyntum, G.A. Ushakova

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine

Cadmium classified as a major carcinogen is considered a poisonous and unwanted heavy metal to a lot of tissues in many organisms. Of many publications already available, the general consensus is that the cadmium attenuating element is metallothionein (MT) through its interchangeable mechanism with Zn triggered by the presence of Cd, providing binding sites for Cd ions. MT was first discovered in the kidney cortex of the horse; it represents a low molecular weight protein, rich in cysteine residues which effectively bind with metals. Its functions consist in detoxification of heavy metals like mercury, arsenic, cadmium, homeostasis of essential metals including copper and zinc, anti-oxidation against reactive oxygen species, protection against DNA damage, oxidative stress, cell survival, angiogenesis, apoptosis, and increase of proliferation. In this work, we sought to highlight the protective function of MT in the brain and serum of rats by means of detoxification under induced effects of controlled Cd doses. We have done this by exposing Wistar rats to Cd at different doses in drinking water at different time intervals. In two independent experiments, 58 rats were subjected to 0.1 or 1.0 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{kg}$ of body weight for 15 or 36 days under different conditions. The obtained data indicates the different functioning systems for the brain and the blood for MT metabolism under Cd effect. Our results indicate significant loss of metallothionein level in the brain and important increases in the amount of MT in serum proving that even minimal ingestion of toxic Cd is enough to trigger the release of MT protein in blood.

Keywords: protein; brain; blood; metallothionein; cadmium

Защитные/детоксикационные функции металлотиионеинов в мозге и крови крыс при действии кадмия в контролируемой дозе

О.Н. Шийнтум, Г.А. Ушакова

Днепропетровский национальный университет имени Олеся Гончара, Днепропетровск, Украина

Согласно современной классификации канцерогенов кадмий считается одним из самых ядовитых и нежелательных тяжелых металлов для многих тканей большинства организмов. Доказана лидирующая роль металлотиионеинов как защитных белков в плане ингибирования действия кадмия за счет уникального механизма конкурентного связывания ионов цинка (Zn) в результате наличия ионов Cd за счет реципрокного связывания ионов. МТ был впервые обнаружен в почках лошади и охарактеризован как низкомолекулярный белок, обогащенный остатками цистеина, которые эффективно связываются с металлами. Главная функция данных белков рассматривается в плане детоксикации тяжелых металлов, таких как ртуть, мышьяк и кадмий, а также поддержания гомеостаза внутриклеточных металлов, включая медь и цинк. Металлотиионеины также выполняют защитные функции в плане обезвреживания реактивных форм кислорода, защиты от повреждения ДНК, окислительного стресса, активно принимая участие в механизмах регуляции выживания клетки, ангиогенеза, апоптоза и пролиферации клеток. В этой работе мы стремились подчеркнуть защитную функцию металлотиионеинов в мозге и крови крыс при индуцировании контролируемых доз Cd. Эксперимент проведен на крысах линии Вистар, которые получали строго контролируемую дозу Cd с питьевой водой в течение 15 и 36 дней. В ходе двух независимых экспериментов 58 крыс подвергались интоксикации кадмием в дозе 0,1 или 1,0 мкг $\text{Cd}^{2+}/\text{кг}$ массы тела каждый день в течение 36 суток. Полученные результаты указывают на специфичность продукции металлотиионеинов в мозге и крови исследуемых животных в зависимости от дозы Cd и времени аккумуляции. Отмечена особенность регуляции продукции металлотиионеинов в мозге и крови в ходе хронической аккумуляции кадмия. Полученные данные свидетельствуют о том, что даже минимальная доза 0,1 мкг/кг тела один раз в день в течение 15 суток приводит к стимуляции продукции МТ в крови, при этом отмечается истощение пула МТ в мозге, начиная с 15-го дня аккумуляции. В случае большей хронизации накопления кадмия

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Gagarin Ave., 72, Dnipropetrovsk, 49010, Ukraine
Днепропетровский национальный университет имени Олеся Гончара, Днепропетровск, Украина
Tel.: +38-066-309-13-86. E-mail: hnkafor@yahoo.com

наблюдается еще большее снижение уровня металлотioneинов в мозге. Хотя ранее была показана индукция синтеза данных белков как первичный ответ на интоксикацию в мозге.

Ключевые слова: белок; мозг; кровь; металлотioneин; кадмий

Introduction

Cd is one of the most toxic heavy metals and its toxicity has been widely investigated and reported. This metal is a serious environmental and occupational contaminant and may cause a severe hazard to the health of man and animals (Wang et al., 2014; Kar et al., 2015). Most of the harmful effects of heavy metals on human health are mediated through oxidative stress (Kar et al., 2015). Cadmium has been shown to increase lipid peroxidation and decrease antioxidant reserve of cells, cadmium ions activate lipid peroxidation causing increased loss of antioxidant capacity in response to formation of free radicals. It is important that cadmium salts are classified as “thiol poisons” which block the sulfhydryl group of proteins including enzymes-antioxidants, inhibiting their antioxidant effects (Wang et al., 2014). In addition, Cd exposure also results in pathological conditions in liver, testis, brain, and nervous system, kidney, spleen, and bone marrow; cadmium exposure may lead to apoptosis in testes of rat, mouse liver, and human T-cells and also appears to inhibit microtubule sliding in bovine sperm axoneme (Wang et al., 2014).

Metallothioneins have been found to exist in numerous organisms ranging from mammals to eukaryotes and some prokaryotes (Babula et al., 2014; Vasak, 2005). The human body expresses at least ten known very closely related MT proteins. The production of MT is zinc and selenium is dependent on dietary minerals as well as histidine and cysteine present in the body. They are largely synthesized in the liver and kidney in humans but are found at a number of other sites. The presence of cysteine in metallothionein is necessary for its functioning and Cd can be bound to these proteins for up to a month (Higashimoto et al., 2009). MTs are classified based on the similarities of their structures. All mammalian MTs are placed in Class I. The amino acids sequences of MTs of mammalian origin contain approximately 61 amino acids of similar composition. They all contain 20 cysteine residues that remain unchanged along the polypeptide sequence. These cysteines participate in the coordination of 7 mol of Cd or Zn per mol of MT, explaining why they feature high affinity for Cd (10^{-22}) and Zn (10^{-18}). MTs are involved in the homeostatic regulation of metals which provides a reservoir of metals for other metalloproteins or metallo-enzymes, in heavy metal detoxification, in protection of tissues against various forms of oxidative injuries and transferring of essential metals (Coyle et al., 2002; Baird et al., 2006). Qu and Waalkes (2013) demonstrated that MT-competent cells activate MT in response to Cd, while MT-deficient cells adapt to Cd primarily by turning on oxidant response systems.

Like the brain, blood is absolutely vital for any mammal's system and since it flows through every major vein associated with every organ of the body, its purity is a priority as any infection is destined to affect the rest of the body. There are numerous manuscripts proving MT functioning in different organs and other parts of the body (Kar et al., 2015; Nair et al., 2013, Yang and Shu, 2015, Braga et al., 2015,

Shiyntum and Ushakova, 2015) and in blood serum related to Cd (Kowalska et al., 2015) also suggesting it detoxifies the plasma. An increase in serum MT has also been registered with human serum under poisoning by other heavy metals (Petrlová et al., 2005).

We strived in this work to show the protective function of MT induced by the presence of controlled doses of Cd in the brain and blood of rats.

Materials and Methods

The experiment was carried out in two steps. In the first step, 18 Wistar rats, aged 20–26 weeks, weighing 150–200 g were subjected to poisoning with Cd at different dose levels for 36 days. 18 rats were divided into 3 groups of 6 rats each: group I was exposed to standard conditions with a standard diet, group II rats were exposed to Cd at a dose of 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of body weight, and 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of body weight of Cd was administered to group 3 rats. The administration of Cd to the experimental groups was carried out intragastrically through a sterile stainless steel probe integrated with adjustable dispenser. Two doses were prepared from High-purified $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ (Sigma, USA) with pure deionized water “Malyatko” (Econiya, Ukraine) and administered daily. Control animals received the same volume of water. The animals were weighed prior to each cadmium solution introduction. The volume of the solution was calculated on the basis of the dose under study. The rats were maintained under standard conditions with natural day/night cycle receiving standard diet. Water and food were freely available. The experiment lasted 36 days and was performed accordingly to “Provisions for the use of animals in biomedical experiments” (Medical ethics and human rights: Provisions on the use of animals in biomedical experiments, 2003). For the next experiment 40 Wistar rats were subjected to different doses of Cd under different conditions at different time intervals as indicated below:

- 1) under controlled experiment with pure water for 15 days;
- 2) exposed to 0.1 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{kg}$ of body weight for 15 days;
- 3) 1.0 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{kg}$ of body weight for 15 days;
- 4) under controlled experiment with pure water for 36 days;
- 5) 0.1 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{kg}$ of body weight for 36 days;
- 6) 1.0 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{kg}$ of body weight for 36 days;
- 7) 0.1 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{kg}$ of body weight for 35 days + 1.0 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{kg}$ of body weight on day 36;
- 8) 1.0 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{kg}$ of body weight for 35 days + 10.0 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{kg}$ of body weight on day 36.

At the end of the experiment, the animals were decapitated under mild anesthesia (isofluran) and cerebellum, and their hippocampus and thalamus were isolated. In order to study MT function induced by Cd, soluble cytosolic protein fractions of these brain parts and blood were obtained by homogenization and differential centrifugation at 20 000 g per 60 min. The initial buffer contained Tris 0.25 mM (pH 7.4) ethylenediaminetetraacetate (EDTA) 1.0 mM, dithiothreitol 2.0 mM, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 0.2 mM, sodium azide (NaN_3) 3 mM (all indicated reagents

from Sigma, USA). The level of MT in obtained brain extracts and blood serum was measured by competitive ELISA using polyclonal antibody to MT (Santa Cruz, USA), and purified MT as a standard (Sigma, USA). Blood serum was extracted according to the standard protocol (blood incubation at room temperature for 30 min and centrifugation at 12 000 g for 10 min). Statistical analysis of the results was performed using SPSS 10.0 for Windows, the difference was considered significant at $P < 0.05$.

Results and Discussion

Expression of MTs is induced by many factors including physical stress, chemical stress and endogenous factors. Induction of MTs in relation to heavy metals, important environment pollutants, has been demonstrated in many tissues including liver, kidney, intestine or pancreas – (Petr et al., 2012). Due to the abundant thiol groups in their cysteine residues, having high affinity to metal ions, MTs are thought to play an important role not only in the homeostasis of physiological metal ions, such as zinc, copper, and selenium, but also in protection from the toxicity of heavy metals, such as cadmium, mercury, lead, and arsenic (Yang and Shu,

2015). In our recent publications we proved that presence of $0.1 \mu\text{g}$ of Cd^{2+} was enough to induce the secretion of MT (Shiyntum and Ushakova, 2015) and increase in the total protein amount in the brain (Kovalchuk et al., 2015, Shiyntum and Ushakova, 2015). In this present work, we compared this inductive effect of Cd^{2+} under different experimental doses in the brain and in blood in an attempt to demonstrate the protective function of MT against Cd and we came out with the results illustrated below.

In case of the brain, there is a sharp fall in the amount of MT in both the cerebellum and the hippocampus and a less significant decrease in the thalamus after 36 days of poisoning (Fig. 1). Deducing from the figure above, we realized the differences in MT presence percentages of 82.2% for $0.1 \mu\text{g}$ Cd^{2+} and 74.2% for $1.0 \mu\text{g}$ Cd^{2+} from 100% control in case of the cerebellum, 72.0% for $0.1 \mu\text{g}$ Cd^{2+} and 58.1% for $1.0 \mu\text{g}$ Cd^{2+} for hippocampus, and 93.4% per $0.1 \mu\text{g}$ Cd^{2+} and 82.7% per $1.0 \mu\text{g}$ Cd^{2+} for thalamus. Although the decrease in the thalamus is less significant, it still proves that Cd is a strong inducer of MT gene (Françoise et al., 2014) as in the other two cases. The decrease in MT is certainly due to the protective function which entails redistribution to other organs (Yang and Shu, 2015) occurring only after 36-day period.

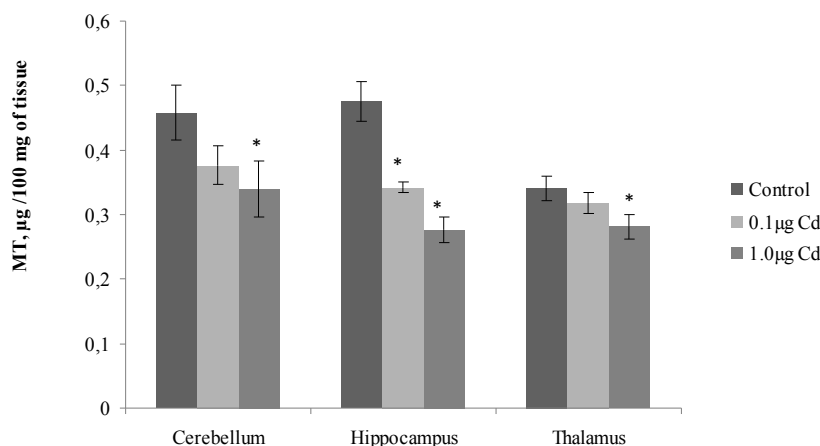


Fig. 1. MT levels in the brain under Cd controlled doses introduced intragastrically for 36 days: * – $P < 0.05$; $n = 6$

Cadmium–metallothionein (Cd–MT) is then released to the circulation system; due to small size of MTs, the complex is easily filtered through the glomerulus and reabsorbed by the proximal tubular (PT) epithelial cells via endocytosis (Dudley et al., 1985; Zalups and Ahmad, 2003). With major increases in MT levels after the first few days, this result implies that the longer the presence of Cd in the brain, the less MT we have present in the brain. This confirms the function of MT as heavy metal detoxifying and protective agent. Expression analyses based on RT-PCR experiments show that, as for MT-1 and MT-2, human MT-3 is also ubiquitously expressed while MT-4 transcripts are present in brain, testes, esophagus and mainly in thymus (Moleirinho et al., 2011).

The data obtained in our experiment indicates dose-dependent effect of cadmium on the content of MT in the rat brain. Furthermore, the specificity of this effect is determined by the peculiarities of different parts of the brain that affect the functional properties of the respective brain parts and the central nervous system as a whole. According to our results, we can see that hippocampus is more sensitive brain structure to the cadmium intoxication compared to the cerebellum and

thalamus. Fig. 2 and 3 show different effects of varying Cd doses on MT in blood serum. It explicitly shows the rise in the levels of MT in serum under the administration of Cd. In Fig. 2, there is an increase in MT levels by 131% and 128% under 0.1 and $1.0 \mu\text{g}$ respectively, showing that the induction of MT is easily triggered even at minimum amounts of Cd.

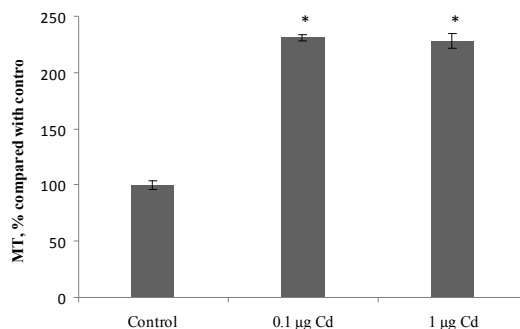


Fig. 2. Cd effect on MT levels in blood serum under 0.1 and $1.0 \mu\text{g}$ administered doses compared to control for 15 days: * – $P < 0.05$ compared to control group; $n = 5$

Two concentrations are at the same level because any first Cd administration almost always causes the same inductive effect. Fig. 3 almost mirrors Fig. 2 to perfection except for the addition of the last two concentrations shown in the last two bars. The spikes in these last two bars of the histogram prove that instant induction of the higher dose than the previously constant dose is capable of causing an increase in MT secretion. In the cases where 1.0 $\mu\text{g Cd}^{2+}$ and 10.0 μg

Cd^{2+} were added to rats that were already exposed to 0.1 $\mu\text{g Cd}^{2+}$ and 1.0 $\mu\text{g Cd}^{2+}$ respectively, increase in MT was slightly (191.5% from 158.5%) and significantly (273.7% from 157.6%) noted. Thus, any addition of a new dose of Cd at any time initially induces high provision of MT which after a while stabilizes and then begins to fall during transportation to other organs.

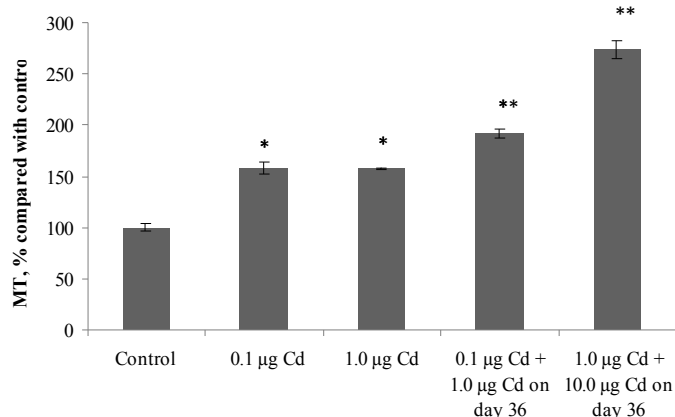


Fig. 3. Cd effect on MT levels in blood serum under administration of varying doses in different conditions for 36 days: * – $P < 0.05$ compared to control group, ** – $P < 0.05$ compared to 2 and 3 groups, respectively; $n = 5$

Conclusion

The obtained data indicates the different functioning systems for the brain and the blood for MT metabolism under Cd effect. In the brain, there is a rise in MT levels after the first few days of induction by Cd but with the longer period of Cd administration, there is a fall in MT levels enhanced most probably by redistribution of the MT-Cd complex to other organs. Meanwhile in blood there is much more production of MT which accounts for high amounts on days 15 and 36 and even in as small a dose as 0.1 μg of cadmium.

Acknowledgement

We send our thanks to the colleagues from V.N. Karazin Kharkiv National University, Dept. of Biochemistry – Prof. E.E. Persky and Dr. Y.G. Kot for their cooperation.

References

Babula, P., Masarik, M., Adam, V., Eckschlager, T., Stiborova, M., Trnkova, L., Skutkova, H., Provaznik, I., Hubalekadi, J., Kizek, R., 2012. Mammalian metallothioneins: Properties and functions. *Metallomics* 4, 739–750.

Baird, S.K., Kurz, T., Brunk, U.T., 2006. Metallothionein protects against oxidative stress-induced lysosomal destabilization. *Biochem. J.* 394, 275–283.

Braga, M.M., Dick, T., de Oliveira, D.L., Scopel-Guerra, A., Mussulini, B.H.M., Souza, D.O., da Rocha, J.B.T., 2015. Evaluation of zinc effect on cadmium action in lipid peroxidation and metallothionein levels in the brain. *Toxicology Reports* 2, 858–863.

Coyle, P., Philcox, J.C., Carey, L.C., Rofe, A.M., 2002. Metallothionein: The multipurpose protein. *Cell Mol. Life Sci.* 59(4), 627–647.

Dudley, E.R., Gammal, L.M., Klaassen, C.D., 1985. Cadmium-induced hepatic and renal injury in chronically exposed rats: Likely role of hepatic cadmium-metallothionein in nephrotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 77, 414–426.

Françoise, V.-H., Amélie, C., Catherine, G.-F., 2014. Metallothionein mRNA induction is correlated with the decrease of DNA strand breaks in cadmium exposed zebra mussels. *Mutat. Res.-Gen. Tox. En.* 766, 10–15.

Higashimoto, M., Isoyama, N., Ishibashi, S., Inoue, M., Takiguchi, M., Suzuki, S., Onishi, Y., Sato, M., 2009. Tissue dependent preventive effect of metallothionein against DNA damage in dyslipidemic mice under repeated stresses of fasting or restraint. *Life Sci.* 84, 569–575.

Hogervorst, J., Plusquin, M., Vangronsveld, J., Nawrot, T., Cuypers, A., Van Hecke, E., Roels, H.A., Carleer, R., Staessen, J.A., 2007. House dust as possible route of environmental exposure to cadmium and lead in the adult general population. *Environ. Res.* 103(1), 30–37.

Kagi, J.H., Valee, B.L., 1960. Metallothionein: A cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. *J. Biol. Chem.* 235, 3460–3465.

Kar, R., Garg, S., Halder, S., Galav, V., Chandra, N., Mehndiratta, M., 2015. Cadmium exposure induces oxidative stress by decreasing expression of antioxidant enzymes in mice liver. *Int. J. Clin. Biochem. Res.* 2(2), 89–96.

Klaassen, C.D., Liu, J., Diwan, B.A., 2009. Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238(3), 215–220.

Kovalchuk, Y.P., Ushakova, G.A., Shiyntum, H.N., Kot, Y.G., 2015. Distribution of the contents of S100b protein in different parts of the rat brain under the influence of cadmium. *Theoretical and Applied Problems of Modern Science and Education, Kursk*, 97–101.

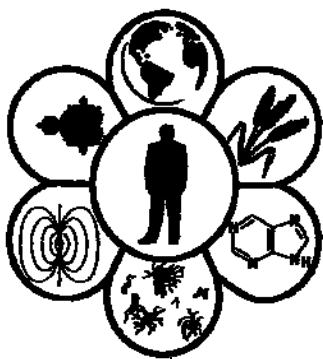
Kowalska, K., Bizon, A., Zalewska, M., Milnerowicz, H., 2015. The influence of biological and environmental factors on metallothionein concentration in the blood. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 29, 99–103.

Moleirinho, A., Carneiro, J., Matthesen, R., Silva, R.M., Amorim, A., Azevedo, L., 2011. Gains, losses, and changes of function after gene duplication: study of the metallothionein family. *PLoS One* 6(4), e18487.

Nair, A.R., DeGheselle, O., Smeets, K., van Kerkhove, E., Cuypers, A., 2013. Cadmium-induced pathologies: Where is the oxidative balance lost (or not)? *Int. J. Mol. Sci.* 14(3), 6116–6143.

- Petrlová, J., Blašík, O., Průša, R., Kukačka, J., Potěšil, D., Mikelová, R., Adam, V., Zehnálek, J., Kizek, R., 2005. Using of electrochemical methods for studying of metallothionein content in the human blood serum of a patient poisoned by lead and treated by platinum. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc. Czech. Repub.* 149(2), 485–488.
- Qu, W., Pi, J., Waalkes, M.P., 2013. Metallothionein blocks oxidative DNA damage *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87(2), 311–321.
- Shiyntum, H.N., Ushakova, G.A., 2015. Distribution of metallothioneins I & II in the rat brain under Cd-inhalation. *Proceedings of First International Workshop “Actual problems of fundamental science”*, Luck, 334–337.
- Vasak, M., 2005. Advances in metallothionein structure and functions. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 19(1), 13–17.
- Waalkes, M.P., 2003. Cadmium carcinogenesis. *Mutat. Res.* 533(1–2), 107–120.
- Wang, J., Zhu, H., Liu, X., Liu, Z., 2014. N-acetylcysteine protects against cadmium-induced oxidative stress in rat hepatocytes. *J. Vet. Sci.* 15(4), 485–493.
- Wang, W.-C., Mao, H., Ma, D.-D., Yang, W.-X., 2014. Characteristics, functions, and applications of metallothionein in aquatic vertebrates. *Front. Mar. Sci.* 1, 34.
- Yang, H., Shu, Y., 2015. Cadmium transporters in the kidney and cadmium-induced nephrotoxicity. *Int. J. Mol. Sci.* 16(1), 1484–1494.
- Zalups, R.K., Ahmad, S., 2003. Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 186(3), 163–188.

Надійшла до редколегії 15.09.2015



УДК 616.155.392-036.1:547.631.7

Вільні та зв'язані форми сіалових кислот у плазмі крові хворих на хронічний лімфолейкоз

О.В. Нетроніна

Державний заклад «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», Дніпропетровськ, Україна

Досліджено рівень вільних і зв'язаних форм сіалових кислот (СК) при хронічному лімфолейкозі (ХЛЛ) та на різних етапах отримання хіміотерапевтичного лікування. Визначення сіалових кислот у плазмі крові хворих на ХЛЛ проводили до лікування, у першу добу та через два місяці після уведення хіміотерапевтичних препаратів за комбінованими схемами. Групою контролю виступали гематологічно здорові донори. Визначення рівня СК проводили тиобарбітуровим методом, із використанням трихлороцтової кислоти для розподілу загальних сіалових кислот на вільні, протеїнзв'язані та олігозв'язані. Виявлено значне підвищення концентрації вільних СК відносно норми: 43,2% відносно загальної їх кількості у плазмі. Рівень зв'язаних СК був зниженим відносно групи гематологічно здорових донорів, при цьому виявлено збільшення олігозв'язаних і зменшення протеїнзв'язаних СК. Проведення хіміотерапевтичного лікування по-різному впливає на вільні та зв'язані форми СК. У першу добу лікування зафіксоване збільшення концентрації вільних СК на фоні зниження загального рівня СК, зниження протеїнзв'язаних СК і відсутність впливу на олігозв'язані СК. Через два місяці після проведення хіміотерапевтичного лікування досліджувані показники повернулися до значень, близьких до таких, які були у пацієнтів до початку лікування. Отримані дані можуть служити додатковим критерієм ефективності проведеного хіміотерапевтичного лікування.

Ключові слова: глікокон'югати; поліхіміотерапевтичне лікування; N-ацетилнейрамінова кислота; нейрамінідаза; сіалілтрансфераза

Free and bound forms of sialic acid in blood plasma of patients with chronic lymphocytic leukemia

O.V. Netronina

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

The level of free and bound forms of sialic acids (SA) was investigated in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and at different stages of receiving chemotherapy. Determination of sialic acid in blood plasma of patients with CLL before treatment were carried out on the first day and 2 months after taking chemotherapy drugs for combination schemes. Hematologically healthy donors represented the control group. Determination of SA was conducted by thiobarbituric method using trichloroacetic acid for distribution of total sialic acids onto free, protein bound sialic acid, and oligo bound sialic acid. Level of free sialic acid in serum in chronic lymphocytic leukemia was equal to 43.2% compared to the total number of plasma. On the first day of chemotherapy on background of the general level of oligo bound sialic acids we observed increase in free sialic acid by 24.2% compared to patients not receiving treatment. The level of sialic acids increased 2.6 times compared to norm and featured no significant changes at different stages of treatment. The concentration of sialic acids bound to proteins at 73.4% was lower compared to the control group. After receiving chemotherapy on the first day there was a decline of this indicator to 56.2% compared to groups of patients before treatment. Two months after the treatment the level of all parameters under study returned back to the values obtained at the start of treatment. This data can serve as an additional efficiency criterion of the chemotherapy.

Keywords: glycoconjugate; polychemotherapy; N-acetylneuraminic acid; neuraminidase; sialyltransferase

*Державний заклад «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», вул. Дзержинського, 9, Дніпропетровськ, 49044, Україна
State Institution "Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine", Dzerzhynskiy Str., 9, Dnipropetrovsk, 49044, Ukraine*

Tel.: +38-097-696-32-65. E-mail: kostyuk-olga@mail.ua

Вступ

На поверхні кожної клітини живого організму міститься шар гліканів, його глікокалікс, який забезпечує її зв'язок із навколишнім середовищем. В еукаріотів глікокалікс складається з глікокон'югатів: глікопротеїнів, гліколіпідів, протеогліканів, більшість вуглеводних компонентів яких містять кінцеві сіалові кислоти (СК), які в основному представлені N-ацетилнейраміновою кислотою (NeuAc) (Schnaag et al., 2014). Сіалові кислоти у складі гліканів впливають на процеси адгезії, розпізнавання речовин, визначають тривалість циркуляції у крові деяких гормонів та білків, беруть участь у гормон-рецепторній взаємодії (Varki and Gagneux, 2012).

Хронічний лімфолейкоз являє собою неопластичне захворювання, яке характеризується зміною рівня диференціювання лімфоцитів і зростанням їх кількості. Порушення процесу дозрівання білих клітин крові суттєво впливає на їх імунологічні властивості. За різних варіантів імунних патологій у першу чергу змінюються структурно-механічні властивості мембран лімфоцитів (Gornik and Lauc, 2008; Sladkova and Skorkina, 2013). Структури вуглеводного компонента глікопротеїнів та гліколіпідів, які містять сіалові кислоти, істотно змінюються за непластичної трансформації. Найчастіше порушення глікозилування виникає внаслідок зміни ферментативної активності нейрамінідаз і сіалілтрансфераз, що зумовлює відщеплення залишків сіалових кислот від глікопротеїнів. Ці процеси можуть спричинити до збільшення концентрації вільних сіалових кислот у крові (Bose et al., 2013; Gruszevska et al., 2014).

Аналіз літературних даних свідчить про те, що загальний рівень СК у плазмі крові підвищується при багатьох захворюваннях, наприклад, запальних або онкологічних (Nigam et al., 2006). Але мало відомостей про розподіл різних форм сіалових кислот. Загальні сіалові кислоти в організмі представлені двома формами: вільними та зв'язаними. Зв'язані, у свою чергу, поділяються на сіалові кислоти, зв'язані з білками (сіалоглікопротеїни) та з олігомерами (сіалоолігосахариди, сіалопептиди, сіалоглікопептиди). Концентрація вільних сіалових кислот у плазмі крові незначна (Varki, 2008; Ozkan et al., 2014).

Протипухлинні засоби – препарати, які застосовують для лікування злоякісних пухлин. Лікарська терапія не замінює оперативні та променеві методи лікування, а доповнює їх і лише за деяких пухлинних захворювань може бути використана як основний або єдиний метод лікування. Серед цих захворювань – хронічний лімфолейкоз (Delgado et al., 2009; Geisler et al., 2011). Нині найпоширеніші комбіновані схеми лікування лейкозів, які включають різні групи препаратів: кортикостероїди (преднізолон), алкілувальні препарати (циклофосфамід), препарати на основі алкалоїдів барвінка (онковін, вінкристин), антрацикліни (доксирубіцин), аналоги пуринів (флударабін) (Allan, 2006; Fijas' and Frenkel, 2011).

Зважаючи на вищевикладене, мета даної статті – визначити розподіл різних форм сіалових кислот у хворих на хронічний лімфолейкоз за впливу хіміотерапевтичного лікування.

Об'єкт дослідження – сироватка крові хворих на хронічний лімфолейкоз на різних етапах лікування. Клінічне обстеження пацієнтів проводили згідно зі стандартами медичної допомоги в умовах спеціалізованого стаціонару – гематологічного відділення комунального закладу «Міська багатопрофільна клінічна лікарня № 4» м. Дніпропетровськ. Всі пацієнти давали письмову згоду на участь в обстеженні.

Залежно від етапу проведення поліхіміотерапії хворі складали три дослідні групи. До першої входили хворі до проведення курсу лікування, другу складали хворі у першу добу проведення хіміотерапії, третя група – через два місяці після проведення стандартного курсу поліхіміотерапії. Контрольну групу складали гематологічно здорові донори віком 50–60 років. Виділення різних форм сіалових кислот здійснювали за допомогою трихлортової кислоти (ТХУ). Під час нагрівання глікопротеїнів плазми із трихлортовою кислотою від них відщеплюються сіалові кислоти, які гідролізують із відщепленням вільної сіалової та оцтової кислот. Для визначення сіалових кислот використовували кольорову реакцію з тіобарбітуровою кислотою (Karpishhenko, 2013).

До 0,5 мл сироватки крові додавали рівний об'єм охолодженої 9% ТХУ. Для видалення білків та сіалопротеїнів суміш перемішували та центрифугували 10 хв за 3 000 об./хв. У першу пробірку для визначення вільних сіалових кислот (ВСК) відбирали 0,3 мл надосадової рідини та зберігали для подальшого дослідження у воді з льодом. Для визначення олігозв'язаних сіалових кислот (ОЗСК) у другу пробірку поміщали 0,2 мл супернатанта і гідролізували на киплячій водяній бані (7–8 хв), після чого охолоджували до 10–20 °С. До отриманого осаду, який попередньо двічі відмивали 1 мл холодною ТХУ, додали 2 мл ТХУ. Отриману суміш гідролізували на кип'ячій водяній бані (7–8 хв), охолодили до 18–24 °С та центрифугували (3 000 об./хв, 5–6 хв). 0,2 мл отриманого супернатанта переносили до третьої пробірки для визначення протеїнзв'язаних сіалових кислот (ПЗСК).

В усі досліджені проби додавали по 0,3 мл реактиву, що містить 25 мМ йодної кислоти, розчиненої в 0,125 н сірчаній кислоті. Отриману суміш залишали на 18–24 °С на 18–20 хв, після чого вносили у пробірки по 0,5 мл 2% арсенату натрію, розчиненого в 0,5 н соляній кислоті. Вміст пробірок ретельно перемішували та додавали 2 мл тіобарбітурової кислоти (0,1 М), рН якої доводили до 9,0 насиченим гідроксидом натрію (1,25 М). Отримані суміші нагрівали на кип'ячій водяній бані протягом 7–8 хв, охолоджували, рН доводили до 4,8–5,0 гідроксидом натрію. Для видалення хромогенів, які не характерні для сіалових кислот, до проб додавали по 4 мл н-бутанолу. Після перемішування та центрифугування (3 000 об./хв, 5–6 хв) шар бутанолу із суміші видаляли. Потім у пробірки додавали по 2 краплі 10,5 М сірчаної кислоти та знову екстрагували хромоген. Вміст ВСК (I пробірка), ОЗСК (II пробірка), та ПЗСК (III пробірка) визначали спектрофотометричним методом за довжини хвилі 549 нм і виражали в ммоль/л. За різницею вмісту СК у першій і другій пробірках знаходили кількість ОЗСК.

Результати та їх обговорення

У групі гематологічно здорових донорів рівень сіалових кислот, які вільно циркулюють у плазмі крові склав $0,08 \pm 0,0058$ ммоль/л (табл.). Отримані дані підтверджуються літературними джерелами (Uslu et al., 2003). У групі хворих на хронічний лімфолейкоз до проведення хіміотерапевтичного лікування спостерігали достовірне ($P < 0,05$) збільшення рівня ВСК, який значно перевищував норму і склав $1,27 \pm 0,074$ ммоль/л. У першу добу проведення стандартного курсу поліхіміотерапії на

фоні зниження загального рівня сіалових кислот відбулося на 24,2% підвищення вмісту ВСК відносно хворих до лікування. Через два місяці після проходження хіміотерапевтичного лікування рівень ВСК повернувся до значень, отриманих на початку лікування.

Рівень вільних сіалових кислот у групі гематологічно здорових донорів склав 3,1% відносно загальної кількості їх у плазмі крові (рис.). У групі хворих до проведення хіміотерапевтичного лікування вільні СК склали 43,2%. У першу добу цей показник зріс до 60%, а через два місяці після лікування знизився до 44,1%.

Таблиця

Концентрація різних форм сіалових кислот у сироватці крові здорових волонтерів і хворих на хронічний лімфолейкоз

Група досліджуваних	Концентрація сіалових кислот, ммоль/л		
	вільні СК	олігозв'язані СК	протеїнзв'язані СК
Здорові донори (контроль), n = 30	$0,08 \pm 0,058$	$0,20 \pm 0,018$	$1,65 \pm 0,120$
ХЛЛ до лікування, n = 30	$1,27 \pm 0,074^*$	$0,52 \pm 0,680^*$	$0,95 \pm 0,050$
ХЛЛ у першу добу лікування, n = 30	$1,58 \pm 0,085$	$0,60 \pm 0,052$	$0,41 \pm 0,030$
ХЛЛ через 2 місяці після лікування, n = 30	$1,29 \pm 0,110$	$0,70 \pm 0,050$	$0,82 \pm 0,060$

Примітка: * – достовірна різниця порівняно з контрольною групою за $P < 0,05$.

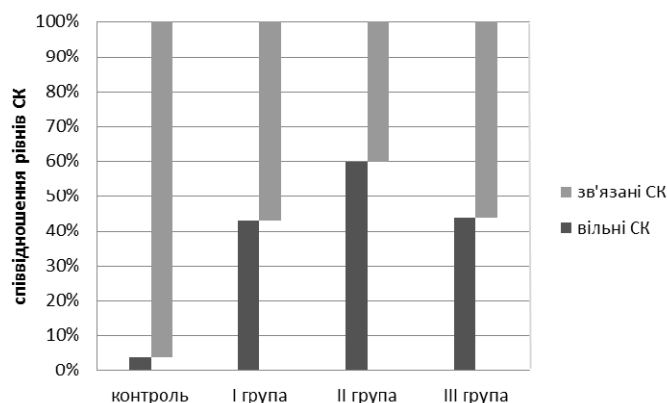


Рис. Співвідношення рівня вільних і зв'язаних форм сіалових кислот у плазмі крові хворих на хронічний лімфолейкоз: I група – до початку хіміотерапевтичного лікування, II група – перша доба проведення хіміотерапії, III група – через два місяці після поліхіміотерапії

При різних видах лейкемії (Patel et al., 1991) рівень ВСК підвищується, і цей показник разом з іншими біохімічними маркерами може бути використаний для диференціювання різних видів лейкозів. У попередньому дослідженні ми визначили активність нейрамінідази – ферменту, який відщеплює залишки сіалових кислот. У цій групі хворих її активність зростала відносно норми, чим можна також пояснити підвищений рівень ВСК у плазмі (Maslak et al., 2013). Також нами показано збільшення експресії NEU1 за еритремії (Maslak et al., 2014). За даними інших авторів, дослідження, проведені на клітинній лінії лімфоми Дальтона, показали, що після уведення циклофосфаміду та цисплатину до живильного середовища відбувається зниження концентрації СК. Існує думка, що внаслідок втрати клітинами сіалових кислот знижується негативний поверхневий заряд, що може спричинити деформації клітин і підвищення їх чутливості до фагоцитозу (Nicol and Prasad, 2002). Можливо, підвищення ВСК є показником ефективності хіміотерапії.

Збільшення рівня вільних сіалових кислот може бути зумовлене збільшенням експресії NEU1, що показано

нами під час досліджень мієлопроліферативного захворювання еритремії (Maslak et al., 2014).

Також встановлено збільшення кількості сіалових кислот, які зв'язують олігомери в 2,6 раза частіше в I групі порівняно з нормою. У першу добу лікування та через два місяці після його проходження значних відмінностей за даним показником не виявилось. Щодо вмісту сіалових кислот, зв'язаних із білками, виявлене зменшення їх концентрації на 73,6% порівняно з групою гематологічно здорових донорів. Під час проведення поліхіміотерапії відбулося зниження цього показника на 56,2% відносно групи хворих до лікування та на 75,1% відносно норми. Через два місяці після лікування рівень ПЗСК майже повернувся до значень, отриманих на початку лікування.

Вільні олігосахариди – продукти клітинного метаболізму глікокон'югатів, будова яких аналогічна вуглеводній частині глікополімерів. Відомо, що концентрація вільних олігосахаридів у плазмі крові хворих на сублейкемічний мієлоз (одна з форм хронічних мієлопроліферативних захворювань) значно вища, ніж у здорових донорів, чим можна пояснити підвищений рівень

олігозв'язаних сіалових кислот (Pis'meneckaja and Batters, 2013). Сіалові кислоти, як правило, займають термінальне положення у складі глікокон'югатів, надаючи молекулі негативного заряду. Будь-яка зміна глікопротеїнів викликає зміни сіалових кислот і навпаки (Shantaram et al., 2009; Colucci et al., 2015). При хронічному лімфолейкозі показане зниження у плазмі крові концентрації імуноглобулінів G, M, A, які за хімічною природою є сіалованими глікопротеїнами (Colovic et al., 2001; Al-Dabagh and Al-Maya, 2011). Так, IgG належить до N-гліканів комплексного типу та складає 75% імуноглобулінів плазми крові (Vidarsson et al., 2014). IgA на своїй поверхні містить O- та N-сайти глікозилювання та становить 10–20% імуноглобулінів плазми крові (Takahashi, 2014). IgM – високоглікозилюваний білок, який має 5 сайтів N-глікозилювання комплексного та олігоманозного типів (Shade and Anthony, 2013). Відомо, що різні види хіміотерапевтичного лікування знижують рівень імуноглобулінів (Zugmaier et al., 2014). Отже, загальний рівень сіалових кислот підвищується при хронічному лімфолейкозі, що може бути пов'язаним із посиленням біосинтезом і виходом у кров білків гострої фази, які містять сіалові кислоти.

Висновки

При хронічному лімфолейкозі у сироватці крові рівень вільних сіалових кислот склав 43,2% відносно загальної кількості їх у плазмі крові.

У першу добу проведення хіміотерапевтичного лікування на фоні зниження загального рівня сіалових кислот спостерігається підвищення концентрації вільних сіалових кислот на 24,2% відносно хворих, які не отримували лікування.

Рівень олігомерзв'язаних сіалових кислот зростає у 2,6 раза порівняно з нормою і незначно змінювався на різних етапах лікування.

Концентрація сіалових кислот, зв'язаних із білками, на 73,4% нижча порівняно з групою контролю. Після отримання поліхіміотерапевтичного лікування у першу добу спостерігається зниження цього показника на 56,2% відносно групи хворих до лікування.

Через два місяці після лікування рівень усіх досліджених показників повернувся до значень, отриманих на початку лікування.

Бібліографічні посилання

Al-Dabagh, M.A., Al-Maya, K.S., 2011. Evaluation of immune response in patients with chronic lymphocytic leukemia. Humoral immune response. *Iraqi J. Sci.* 52(3), 388–393.

Allan, J.M., 2006. The molecular mechanisms of alkylating agent-related acute myeloid leukaemia. *Haematologica reports.* 2(15), 28–29.

Bose, K.S., Gokhale, P.V., Dwivedi, S., Singh, M., 2013. Quantitative evaluation and correlation of serum glycoconjugates: Protein bound hexoses, sialic acid and fucose in leukoplakia, oral sub mucous fibrosis and oral cancer. *J. Nat. Sci. Biol. Med.* 4(1), 122–125.

Büll, C., Boltje, T.J., van Dinther, E.A.W., Peters, T., de Graaf, A.M., Leusen, J.H.W., Kreutz, M., Figdor, C.G., den Brok, M.H., Adema, G.J., 2015. Targeted delivery of a sialic acid-

blocking glycomimetic to cancer cells inhibits metastatic spread. *ACS Nano.* 9(1), 733–745.

Colovic, N., Bogdanovic, A., Martinovic-Cemerikic, V., Jankovic, G., 2001. Prognostic significance of serum immunoglobulins in B-chronic lymphocytic leukemia. *Archive of Oncology* 9(2), 79–82.

Colucci, M., Stöckmann, H., Butera, A., Masotti, A., Baldassarre, A., Giorda, E., Petrini, S., Rudd, P.M., Sitia, R., Emma, F., Vivarelli, M., 2015. Sialylation of N-linked glycans influences the immunomodulatory effects of IgM on T cells. *J. Immunol.* 194(1), 151–157.

Delgado, J., Milligan, D.W., Dreger, P., 2009. Allogenic hematopoietic cell transfusion for chronic lymphocytic leukemia: Ready for prime time. *Blood* 14(13), 2581–2588.

Fijas', A.T., Frenkel', B.I., 2011. Hronicheskij limfolejkoz: Diagnostika i lechenie [Chronic lymphocytic leukemia: Diagnosis and treatment]. *Zhurnal Grodnenskogo Medicinskogo Universiteta* 4, 93–97 (in Russian).

Geisler, C.H., van T' Veer, M.B., Jurlander, J., Walewski, J., Tjønnfjord, G., Itälä Remes, M., Kimby, E., Kozak, T., Polliack, A., Wu, K.L., Wittebol, S., Abrahamse-Testroote, M.C.J., Doorduijn, J., Ghidry Alemayehu, W., van Oers, M.H.J., 2011. Frontline low-dose alemtuzumab with fludarabine and cyclophosphamide prolongs progression-free survival in high-risk CLL. *Blood* 123(21), 3255–3262.

Gornik, O., Lauc, G., 2008. Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases. *Dis. Markers* 25(4–5), 267–278.

Gruszewska, E., Cylwik, B., Panasiuk, A., Szmitkowski, M., Flisiak, R., Chrostek, L., 2014. Total and free serum sialic acid concentration in liver diseases. *Bio. Med. Res. Int.* ID876096, 1–5.

Karpishhenko, A.I., 2013. Medicinskie laboratornye tehnologii: Rukovodstvo po klinicheskoy laboratornoj diagnostike [Medical laboratory technology: Guidelines for clinical laboratory diagnostics]. *Geotar-Media, Moscow* (in Russian).

Maslak, G.S., Kostjuk, O.V., Brazaluk, O.Z., 2013. Syrovatochnyj riven' sialovyh kyslot ta aktyvnist' nejraminidazy za umov hronichnogo limfo lejkozu ta na foni himioterapevtychnogo likuvannja [Serum level of sialic acid and neuraminidase activity in chronic lymphocytic leukemia and background chemotherapy]. *Vcheni Zapysky Tavrijs'kogo Nacional'nogo Universytetu. Serija Biologija, Himija* 26(1), 105–111 (in Ukrainian).

Maslak, G.S., Kostjuk, O.V., Minchenko, D.O., Brazaluk, O.Z., Shevcova, A.I., Minchenko, O.G., 2014. Sial'ovanist' glikoprotei'viv i riven' ekspresii' nejraminidazy NEU1 ta sialil-transferazy ST6GAL1 u limfocytah hvoryh na erytremiju [Glycoprotein sialation and NEU1 and ST6GAL1 expressions in erythremia disease]. *Fiziol. Zhurn.* 60(5), 14–22 (in Ukrainian).

Nicol, B.M., Prasad, S.B., 2002. Sialic acid changes in Dalton's lymphoma-bearing mice after cyclophosphamide and cisplatin treatment. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35(5), 549–553.

Nigam, P.K., Narain, V.S., Kuma, A., 2006. Sialic acid in cardiovascular diseases. *Indian. J. Clin. Biochem.* 21(1), 54–61.

Ozkan, O.F., Cıkman, O., Roach, E.C., Kemik, A.S., Gunes, F., Karaayvaz, M., 2014. Effects of acute pancreatitis on plasma total and lipid bound sialic acid levels: An experimental study in rats. *Chirurgia* 4(109), 486–492.

Patel, P.S., Adhvaryu, S.G., Baxi, B.R., 1991. Tumor markers in leukemia: Evaluation of serum levels of different forms of sialic acid, regan isoenzyme and lactate dehydrogenase. *Int. J. Biol. Markers* 6(3), 177–182.

Pis'meneckaja, I.J., Batters, T.D., 2013. Izmenenie hromatograficheskikh spektrov svobodnyh oligosaharidov plazmy krovi pri sublejkemicheskomo mielozze [Chromatographic profile changes of plasma free oligosaccharides in subleukemic myelosis]. *Uchenye Zapiski Tavricheskogo*

- Nacional'nogo Universiteta im. V.I. Vernadskogo. Serija Biologija, Himija 26(1), 153–160 (in Russian).
- Schnaar, R.L., Gerardy-Schahn, R., Hildebrandt, H., 2014. Sialic acids in the brain: Gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration. *Physiol. Rev.* 94(2), 461–518.
- Shade, K.T.C., Anthony, R.M., 2013. Antibody glycosylation and inflammation. *Antibodies* 2, 392–414.
- Shantaram, M., Rao, A., Rao, A.A., Raja, A., Rao, S., Monteiro, F., 2009. Assessment of total sialic acid and lipid-bound sialic acid in management of brain tumors. *Ann. Indian. Acad. Neurol.* 12(3), 162–166.
- Sladkova, E.A., Skorkina, M.J., 2013. Strukturno-funkcional'nye osobennosti limfocitov bol'nyh limfoblastnym lejkozom [Structural and functional peculiarities of lymphocytes from patients with lymphoblastic leukemia]. *Citologija* 55(6), 388–393 (in Russian).
- Takahashi, K., Raska, M., Stuchlova Horynova, M., Hall, S.D., Poulsen, K., Kilian, M., Hiki, Y., Yuzawa, Y., Moldoveanu, Z., Julian, B.A., Renfrow, M.B., Novak, J., 2014. Enzymatic sialylation of IgA1 O-glycans: Implications for studies of IgA nephropathy. *PLoS One* 9(11), e113577.
- Tomaszewska, R., Sonta-Jakimeczyk, D., Dyduch, A., Olejnik, I., Mazur, B., 1997. Sialic acid concentration in different stages of malignant lymphoma and leukemia in children. *Pediatr. Int.* 39(4), 448–450.
- Uslu, C., Taysi, S., Akcay, F., Sutbeyaz, M.Y., Bakan, N., 2003. Serum free and bound sialic acid and alpha-1-acid glycoprotein in patients with laryngeal cancer. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 33(2), 156–159.
- Varki, A., 2008. Sialic acids in human health and disease. *Trends. Mol. Med.* 6, 351–359.
- Varki, A., Gagneux, P., 2012. Multifarious roles of sialic acids in immunity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1253, 16–36.
- Vidarsson, G., Dekkers, G., Rispen, T., 2014. IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. *Front. Immunol.* 5, 520.
- Zugmaier, G., Topp, M.S., Alekar, S., Viardot, A., Horst, H.A., Neumann, S., Stelljes, M., Bargou, R.C., Goebeler, M., Wessiepe, D., Degenhard, E., Gökbüget, N., Klingler, M., 2014. Long-term follow-up of serum immunoglobulin levels in blinatumomab-treated patients with minimal residual disease-positive B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood Cancer J.* 4, 244.

Надійшла до редколегії 16.08.2015



УДК 577.112:612.8+576.311

Наночастинки C_{60} фулерену попереджають реактивний гліоз у сітківці старих щурів при гіперглікемії

I.V. Прищеп¹, O.G. Прокушенкова², V.C. Недзвєцький¹

¹Дніпропетровський національний університет імені Олеса Гончара, Дніпропетровськ, Україна

²Дніпропетровський державний аграрно-економічний університет, Дніпропетровськ, Україна

Реактивація гліальних клітин, що індукується метаболічним розладом утилізації глюкози та розвитком окисного стресу в сітківці при цукровому діабеті, є центральним фактором патогенезу діабетичної ретинопатії. Наночастинки фулерену C_{60} та окремі його водорозчинні похідні характеризуються потужними антиоксидантними властивостями та нейропротекторною дією у випадку значної кількості патологій та несприятливих впливів. Уперше досліджено вплив низьких доз гідратованого C_{60} фулерену ($C_{60}HyFn$) на експресію та поліпептидний склад гліального фібрилярного кислого протеїну (ГФКП) у сітківці щурів при діабеті, індукованому стрептозоточином (СТЗ). Із застосуванням методу імуноблотингу показано зростання експресії ГФКП у сітківці щурів із діабетом порівняно з контролем у 1,93 раза, що свідчить про суттєву реактивацію гліальних клітин ретини при гіперглікемії. Підвищення ГФКП-імунореактивності, асоційоване з розвитком реактивного астрогліозу у сітківці діабетичних щурів, підтверджено імуногістохімічно на фіксованих зрізах сітківки. Споживання діабетичними щурами розчину $C_{60}HyFn$ (90 нМ) з питною водою протягом 12 тижнів викликало зниження вмісту ГФКП у 1,51 раза порівняно з цим показником у групі діабетичних тварин. $C_{60}HyFn$ сприяв достовірному (у 1,58 раза) зниженню вмісту глікозильованого гемоглобіну в сироватці крові щурів з СТЗ-діабетом. Наночастинки $C_{60}HyFn$ не змінювали рівень інсуліну та глюкози у крові діабетичних щурів. Отримані результати свідчать про те, що протекторна дія гідратованого фулерену при діабетичній ретинопатії зрілих тварин реалізується через пригнічення ним надмірної активації ГФКП-позитивних клітин сітківки.

Ключові слова: цукровий діабет; діабетична ретинопатія; астрогліоз; гліальний фібрилярний кислий протеїн (ГФКП); гідратований C_{60} фулерен

Nanoparticles C_{60} fullerene prevent reactive gliosis in retina of aged rats under hyperglycemia

I.V. Prischepa¹, O.G. Prokushenkova², V.S. Nedzvetsky¹

¹Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine

²Dnipropetrovsk State Agrarian-Economic University, Dnipropetrovsk, Ukraine

Reactivation of glial cells, induced by metabolic disorders of glucose utilization and development of oxidative stress in retina under diabetes mellitus, is the key pathogenetic factor of diabetic retinopathy. Nanoparticles of C_{60} fullerene and some of their water-soluble derivatives are known as one of the strongest antioxidants having neuroprotective effect in a number of pathologies and harmful influences. In the present study, for the first time, the effects of nanostructures of hydrated C_{60} fullerene ($C_{60}HyFn$) on the expression and polypeptide composition of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in retina of rats with streptozotocin (STZ)-induced diabetes have been evaluated. Using immunoblotting, 1.93-fold up-regulation of GFAP in diabetic rat retina as compared with control was shown, as a result of retinal glial cells reactivation induced by hyperglycemia. Increase in GFAP-immunolabeling associated with the reactive gliosis development in retina of diabetic rats was also confirmed by immuno-histochemical method. Consumption of $C_{60}HyFn$ solution (90 nM) as drinking water by diabetic rats for 12 weeks caused 1.51-fold decrease of GFAP level compared to untreated diabetic animals. In addition, $C_{60}HyFn$ caused statistically significant lowering of glycosylated hemoglobin concentration in blood serum of STZ-diabetic rats 1.58-fold. However, nanoparticles C_{60} did not affect neither insulin nor glucose levels in blood of diabetic rats. In conclusion, results obtained indicate that

protective action of hydrated fullerene in the initial period of diabetic retinopathy of aged animals is realized through suppression of excessive activation of GFAP-positive retinal cells.

Key words: diabetes mellitus; diabetic retinopathy; astrogliosis; glial fibrillary acidic protein (GFAP); hydrated C₆₀ fullerene

Вступ

Діабетичною ретинопатією (ДР) вважають комплексне мікроциркуляторне захворювання сітківки, що індукується гіперглікемією як за інсулін-залежного, так і інсулін-незалежного типів діабету. Характерна риса патогенезу ДР – розвиток нейродегенеративних змін. Ретинальна нейродегенерація виявляється до того, як можуть бути визначені мікроциркуляторні порушення (Rungger-Brandle et al., 2000). Молекулярні механізми нейродегенеративних змін у сітківці критичні для терапії у ранній період ДР.

ДР відносять до найпоширеніших ускладнень цукрового діабету. За оцінками Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВОЗ), у 2025 році кількість хворих на діабет може сягнути 380 мільйонів (Tagg et al., 2013). Діабетичні порушення у сітківці можуть бути результатом активації загальнопоширених типів клітинної відповіді: апоптозу, запальних процесів і окисного стресу. Окисний стрес впливає на широке коло біохімічних процесів, регуляції метаболічних шляхів та клітинних функцій. Однією з головних рис ДР є розвиток окисного стресу та пов'язаних із ним метаболічних порушень.

Гліальні клітини забезпечують структурну та метаболічну підтримку нейронів та кровоносних судин сітківки ока. Нейродегенеративні процеси активуються безпосередньо після початку розвитку діабету. Однак астроцити та клітини Мюллера сітківки виявляють реактивність лише через декілька місяців (Rungger-Brandle et al., 2000). Високий рівень аеробного метаболізму в нервових клітинах зумовлює активізацію процесів генерації вільних радикалів, зокрема, при гіперглікемії. Нейрони чутливі до ушкоджувальної дії вільних радикалів завдяки високому вмісту поліненасичених жирних кислот і відносно слабкій антиоксидантній системі. Патологічні зміни сітківки за ДР достатньо ретельно досліджені в мікроваскулярних і нейрональних патернах (Liu et al., 2012). У той же час, роль гліальних клітин ДР, патогенез нейронально-гліальних та гліально-судинних взаємодій залишаються не зрозумілими.

Найбільш визнаний маркер стану глії – гліальний фібрилярний кислий протеїн (ГФКП). Клітинна відповідь на дію різних за природою чинників супроводжується надмірною експресією ГФКП, проліферацією та гіпертрофією астроцитів. Цей феномен отримав назву «астрогліоз». ГФКП-позитивні клітини виконують широке коло функцій, які забезпечують захист нейронів від нейротоксичного впливу вільних радикалів. Астроцити мають потужнішу антиоксидантну спроможність, ніж нейрони (Dringen et al., 2005). Враховуючи всі ці факти, саме астроцити розглядають як головні протектори нейронів від ушкоджувальної дії оксидативного стресу.

Враховуючи той факт, що ДР – головна причина втрати зору серед людей зрілого віку, пошук засобів, спрямованих на корекцію цього ускладнення, – актуальне медико-соціальне завдання. Широко досліджуються ефекти сполук, що мають антиоксидантні властивості.

Нещодавно показано нейропротекторну ефективність гідратованої форми фулерену C₆₀ (C₆₀HуFn) в окремих відділах мозку та збереження тестикулярної функції у діабетичних тварин (Etem et al., 2014). Незважаючи на численні дослідження нейропротекторних ефектів фулерену C₆₀, його потенційне застосування для корекції пошкоджень сітківки, індукованих гіперглікемією, залишається не вивченим. Саме тому комплексний аналіз молекулярних та клітинних порушень сітківки при ДР важливий для розкриття механізмів розвитку патології та розроблення нейропротекторних засобів.

Мета статті – визначити ефекти гідратованого C₆₀ фулерену на стан ГФКП-позитивних клітин сітківки дорослих щурів та біохімічні показники при СТЗ-індукованому діабеті у щурів.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проведено на щурах лінії Вістар (самці, 10–11 місяців), отриманих із виварію ДНУ імені Олеса Гончара. Тварин утримували в умовах постійної температури (22 ± 2 °C) та тривалості світлового дня (12/12-годинний цикл). Протоколи досліджень розглянуті та затверджені місцевим комітетом із питань етичного поводження з тваринами Дніпропетровської державної медичної академії. Рандомізовані тварини поділені на чотири групи (n = 5): 1 – контрольна група (К) (інтактні тварини), 2 – «нормальний» контроль (тварини, які отримували розчин C₆₀HуFn із питною водою), 3 – щури із СТЗ-діабетом (СТЗД), 4 – діабетичні тварини, які отримували розчин C₆₀HуFn із питною водою (СТЗД+C₆₀). Тваринам третьої та четвертої груп одноразово вводили інтраперитонеально СТЗ (Sigma, St. Louis, MO, USA) у дозі 50 мг/кг для індукції діабету. Тварини другої та четвертої групи отримували розчин 60 нг/мл C₆₀ (~90 нМ) у питній воді протягом 12 тижнів.

Для дослідження відбирали щурів із концентрацією глюкози в крові не менше 20 мМ/л. За 12 тижнів із моменту індукції діабету щури всіх груп були декапітовані під дієтилефірним наркозом. У сироватці визначали концентрацію глюкози, інсуліну (Rat Insulin Kit, Linc Research, St Charles, MO, USA) імуноензимним аналізом (ELISA, Elx-800, BioTek Instruments, Winooski, VT) та вміст глікозильованого гемоглобіну (HbA1c) (Alfabiotech, Milano, Italy).

Із тканини сітківки отримували протеїнові екстракти та фіксовані зразки для імуногістохімії. Гомогенат сітківки (10%, вага/об'єм) готували у 50 мМ трис-буфері (рН 7,8), який додатково містив 0,5% додецилсульфату Na (DSN), 0,15 М NaCl, 2,5 мМ етилендіамінтетраоцтової кислоти (EDTA) та суміш інгібіторів протеїнази. Гомогенати центрифугували за 16 000 g протягом 30 хв за температури 4 °C. Вміст загального протеїну у пробах визначали методом Bradford (1976). Вміст ГФКП і склад його поліпептидних фрагментів визначали методом імуноблотингу за методикою, описаною раніше (Nedzvetsky et al., 2012). Імуногістохімічне визначення астрогліозу прово-

дили на фіксованих зрізах сітківки з використанням антитіл проти ГФКП (1/200, Santa Cruz). Вихідний розчин C_{60} із концентрацією $8,88 \times 10^{-4}$ М (Andrievsky et al., 2009) використовували для робочого розведення 90 нМ (~60 нг/мл). Статистичну обробку даних виконували із застосуванням методів математичної статистики для малих вибірок із застосуванням пакета Statistica® for Windows 6.0 (StatSoft Inc.). Відносний вміст ГФКП відображали у вигляді $M \pm m$, вірогідність міжгрупової різниці оцінювали за допомогою t-критерію Стюдента ($P < 0,05$) після перевірки нормальності розподілу та різниці між генеральними дисперсіями.

Результати та їх обговорення

Результати визначення концентрації глюкози у сироватці крові щурів до індукції СТЗ-діабету та за 12 тижнів показали значні відмінності відносно контрольної групи та групи нормального контролю (C_{60}). Отримані дані свідчать про розвиток стійкої гіперглікемії (рис. 1). Достовірної різниці за вмістом глюкози у групах тварин СТЗД та СТЗД+ C_{60} не виявлено. Споживання C_{60} HyFn не впливало на метаболічне порушення утилізації глюкози у СТЗ-діабетичних щурів.

Концентрація інсуліну у крові СТЗД та СТЗД+ C_{60} груп діабетичних тварин зрілого віку була нижча за контрольну групу у 1,54 та 1,41 раза відповідно ($P > 0,05$). Отриманий результат може відображати тенденцію часткового відновлення β -клітин островків Лангерганса за дії C_{60} HyFn.

Визначним показником порушення шляхів утилізації глюкози є вміст глікозильованого гемоглобіну. У крові щурів СТЗД-групи вміст глікозильованого гемоглобіну був достовірно вищим за такий показник у контрольній групі ($P < 0,05$) (табл.). Споживання C_{60} HyFn з питною водою (СТЗД+ C_{60} група) викликало зниження вмісту глікозильованого гемоглобіну у 1,58 раза ($P < 0,05$), що свідчить про його здатність частково попереджати метаболічний розлад утилізації глюкози.

Результати імуногістохімічного забарвлення ГФКП на зрізах сітківки щурів діабетичної групи виявили значний гліоз в астроцитах і клітинах Мюллера внутрішнього шару порівняно з контрольною групою (рис. 2). Не виявлено різниці в імунозабарвленні зрізів контрольної групи та групи нормального контролю. Суттєве зменшення рівня ГФКП-позитивного забарвлення виявлене на зрізах сітківки діабетичних щурів, які споживали C_{60} HyFn, порівняно з групою СТЗД.

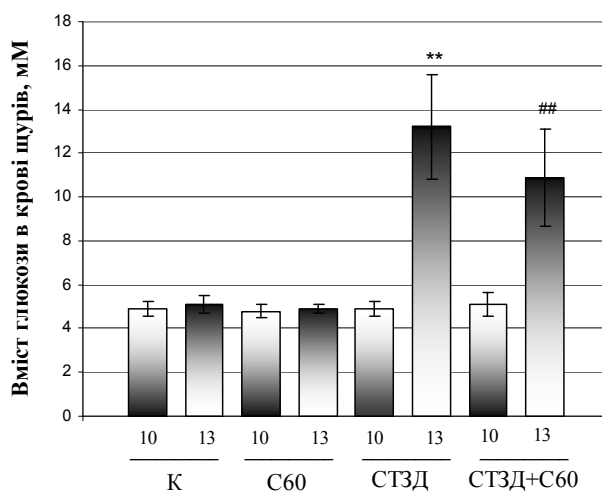


Рис. 1. Вміст глюкози в сироватці крові щурів: 10, 13 – вік тварин (місяці); К – контроль; C_{60} – група нормального контролю; СТЗД – діабетична група; СТЗД+ C_{60} – діабетична група щурів, які отримували розчин 90 нМ C_{60} ; ** – $P < 0,01$ відносно контрольної групи, ## – $P < 0,01$ відносно нормального контролю

Таблиця

Вага та біохімічні показники крові щурів на початку та за 12 тижнів СТЗ-індукованого діабету

Характеристика, період експерименту		Інтактний контроль (К)	Нормальний контроль (C_{60})	Діабетичні щури (СТЗД)	Діабетичні, які отримували C_{60} (СТЗД+ C_{60})
Вага тварин, г	10 місяців	291 ± 14,5	288 ± 15,7	290 ± 13,4	292 ± 14,1
	+ 12 тижнів СТЗ-діабет	305 ± 15,1	307 ± 14,2	263 ± 12,2	282 ± 13,7
Інсулін, мкОд/мл	10 місяців	46,1 ± 2,03	44,5 ± 1,76	21,3 ± 2,02**	22,5 ± 1,55**
	+ 12 тижнів СТЗ-діабет	45,7 ± 2,43	45,5 ± 1,87	29,7 ± 1,55**	32,5 ± 1,73*
Глікозильований гемоглобін, мг/г білка	10 місяців	0,37 ± 0,028	0,35 ± 0,014	0,35 ± 0,022	0,32 ± 0,023
	+ 12 тижнів СТЗ-діабет	0,38 ± 0,016	0,29 ± 0,017	0,84 ± 0,076**	0,53 ± 0,033 [#]

Примітки: достовірність змін відносно контрольної групи ** – $P < 0,01$, * – $P < 0,05$, відносно СТЗД групи [#] – $P < 0,05$.

У зразках сітківки контрольної та нормального контролю груп щурів ГФКП визначений поліпептид 49 кДа (рис. 3). У сітківці щурів групи СТЗД виявлено інтактний 49 кДа та його фрагменти в у діапазоні 49–40 кДа. Спо-

живання C_{60} HyFn суттєво запобігало деградації ГФКП. Останнім часом запропоновано використання продуктів обмеженого протеолізу як додаткового маркера астрогліозу (Sugaya-Fukasawa et al., 2010).

Лімітований протеоліз проміжних філаментів можуть здійснювати лише окремі ферменти, наприклад, калпаїни або каспази, які активуються в ході астрогліозу (Dringen et al., 2005). Результати вказують на те, що гіперглікемія індукує надмірну активацію протеаз і перебудови цитоскелета гліальних клітин. У той же час, споживання C_{60} НуFn із питною водою протягом 12 тижнів запобігало розвитку астрогліальної реактивації у сітківці разом із попередженням протеолізу проміжних філаментів глії у щурів із СТЗ-індукованим діабетом. Результати, отримані у групах контролю та нормального контролю, практично не відрізнялися за всіма визначеними показниками, що свідчить про відсутність токсичності та безпечності споживання C_{60} НуFn в

обраній дозі та режимі надходження відносно клітин сітківки.

Результати визначення вмісту ГФКП із застосуванням денситометричного аналізу блотограм (рис. 4) повністю збігалися з даними імуногістохімії. Вміст ГФКП у групі СТЗД щурів був вищим у 1,93 раза за контрольну ($P < 0,01$). Натомість, споживання розчину C_{60} НуFn щурами із СТЗ-діабетом зумовило зменшення вмісту маркера реактивного гліюзу в 1,51 раза порівняно з групою СТЗД ($P < 0,05$), причому рівень ГФКП у групі СТЗД+ C_{60} статистично не відрізнявся від такого у групі контрольних тварин. Споживання C_{60} НуFn у питній воді протягом 12 тижнів також не викликало змін експресії ГФКП.

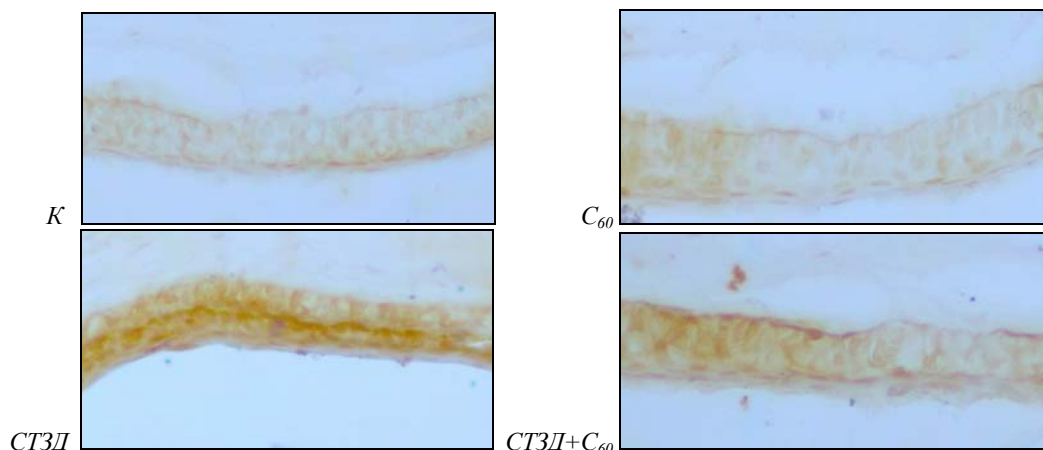


Рис. 2. Результати імуногістохімії зрізів сітківки (забарвлення внутрішнього шару клітин):

К – контроль, C_{60} – група нормального контролю, СТЗД – діабетична група, СТЗД+ C_{60} – діабетична група щурів, які отримували розчин 90 нМ C_{60}

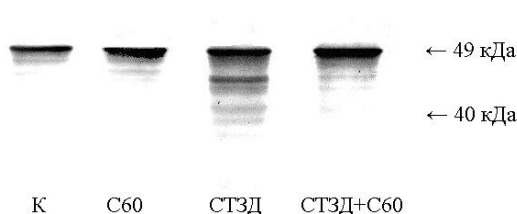


Рис. 3. Результати імуноблотингу екстрактів ретини:

К – контроль, C_{60} – група нормального контролю, СТЗД – діабетична група, СТЗД+ C_{60} – діабетична група щурів, які отримували розчин 90 нМ C_{60}

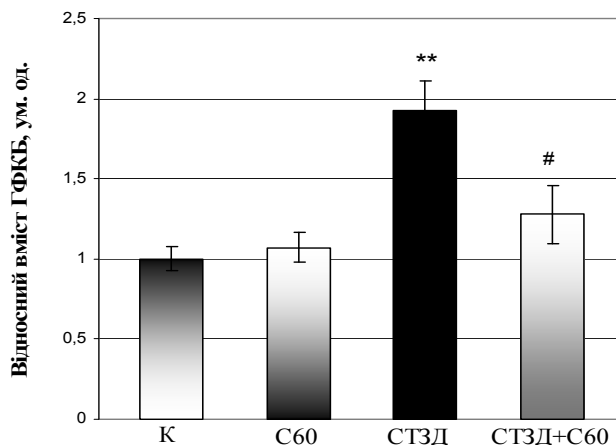


Рис. 4. Відносний вміст ГФКБ в екстрактах ретини за денситометричним аналізом результатів імуноблотингу:

К – контроль, C_{60} – група нормального контролю, СТЗД – діабетична група, СТЗД+ C_{60} – діабетична група щурів, які отримували розчин 90 нМ C_{60} ; ** – $P < 0,01$ відносно контрольної групи, # – $P < 0,05$ відносно СТЗД групи

Нині молекулярні та клітинні механізми розвитку ДР залишаються не з'ясованими. Певний внесок у патогенез ДР роблять порушення активації протеїнкіназ, синтезу клітинних факторів росту (Haurigot et al., 2009), розвиток окисного стресу та утворення кінцевих продуктів глікозилювання (Zong et al., 2011), запалення (Klein et al., 2009). ГФКП-позитивні клітини забезпечують структурну та метаболічну підтримку нейронів і гангліозних клітин сітківки. Гліальна реактивність сітківки підвищується в ході розвитку ДР і збігається зі зниженням швидкості конвертації глутамату на глутамін. Підвищений рівень глутамату та надмірна експресія компонентів ренін-ангіотензинової системи відіграють важливу роль у розвитку патологій сітківки при діабеті. Астроцити – головні клітини, які забезпечують рециклінг глутамату, захищаючи нейрони від ексайтотоксичності. Гліальний гліколіз щільно пов'язаний із викидом глутамату з нейронів та його поглинанням глією (Mamczur et al., 2015). Гіперглікемія викликає порушення гліколітичного розщеплення глюкози в астроцитах (Ganesh et al., 2011). Лактат – важливий метаболіт глюкози та енергетичний субстрат, який астроцити постачають до нейронів (Pellerin et al., 2012). Таким чином, зниження утворення лактату спричинює енергетичний дефіцит у нейронах.

Враховуючи складну взаємозалежність сигнальних шляхів між клітинами судин, глії та нейронами, гіперглікемія може викликати порушення одночасно усіх цих клітинних типів. Генерація окисного стресу у сітківці діабетичних щурів супроводжується зниженням ефективності транспортерів глюкози та зростанням вмісту кінцевих продуктів ПОЛ (Ulas et al., 2015). Враховуючи наведені факти, саме ГФКП-позитивні клітини є мішенню для нейропротекторних засобів і корекції діабетичної ретинопатії.

Виявлене у проведеному дослідженні гальмування надмірного астрогліозу у сітківці діабетичних щурів може бути опосередковане антиоксидантними властивостями фулерену (Nedzvetsky et al., 2012). Отримані дані щодо поліпшення стану глії у сітківці при патології збігаються з результатами попередніх досліджень, в яких показані глія-протекторні ефекти саме гідратованої форми хімічно не модифікованого C_{60} у головному мозку свавців за хронічного впливу етилового спирту (Tykhomyrov et al., 2008) та експериментального СТЗ-діабету (Nedzvetsky et al., 2012). У ході дослідження вперше отримано експериментальні докази ефективності використання $C_{60}H_{y}Fn$ для запобігання надмірного гліозу у сітківці. Виявлені ефекти гідратованого C_{60} фулерену відносно астрогліозу ретиноглії, деградації ГФКП та вмісту глікозилюваного гемоглобіну свідчать про мультифакторіальну дію цих наночастинок. Подібна дія показана для захисту тестикулярної функції у діабетичних щурів (Etem et al., 2014).

Механізм антирадикальної дії $C_{60}H_{y}Fn$ кардинально відрізняється від усіх відомих антиоксидантів. Фулерен каталізує реакції дисмутації та знешкодження вільних радикалів завдяки унікальним властивостям водної фази, яка оточує поверхню як окремих молекул C_{60} , так і їх нанокластерів (Andrievsky et al., 2009). Отримані дані збігаються з результатами інших авторів, які показали ефективність таких антиоксидантів як ебселен (Tan et al.,

2015) і мелатонін (Jiang et al., 2012), які відновлюють нормальне функціонування глії при діабет-індукованому окисному стресі у сітківці. Гідратований фулерен, на відміну від більшості відомих антиоксидантів, вважається нетоксичною та біосумісною речовиною, яка проявляє високу біологічну активність навіть за низьких доз (Tykhomyrov et al., 2008). Ці обставини відкривають широкі перспективи для використання $C_{60}H_{y}Fn$ як безпечного та ефективного агента для профілактики та терапії таких діабетичних ускладнень як ретинопатії.

Висновок

Немодифікований гідратований фулерен ($C_{60}H_{y}Fn$) попереджає порушення цитоскелета та надмірну активацію ретиноглії у щурів при діабеті. $C_{60}H_{y}Fn$ може бути використаний як молекулярний інструмент для вивчення механізмів реципрокної регуляції між ендотелієм, мікроглією та гангліозними клітинами сітківки при гіперглікемії.

Подяка

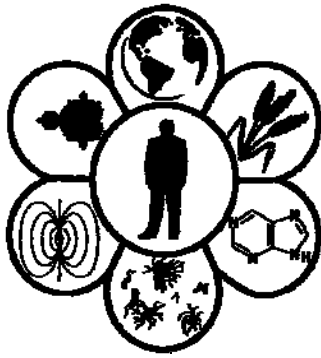
Автори вдячні к. х. н. Г.В. Андрієвському за люб'язне надання препарату гідратованого C_{60} фулерену для проведення досліджень.

Бібліографічні посилання

- Andrievsky, G., Bruskov, V.I., Tykhomyrov, A.A., Gudkov, S.V., 2009. Peculiarities of the antioxidant and radioprotective effects of hydrated C_{60} fullerene nanostructures *in vitro* and *in vivo*. *Free Rad. Biol. Med.* 47, 786–793.
- 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.
- Dringen, R., Pawlowski, P.G., Hirrlinger, J., 2005. Peroxide Detoxification by brain cells. *J. Neurosci. Res.* 79, 157–165.
- Etem, E.O., Bal, R., Akağaç, A.E., Kuloglu, T., Tuzcu, M., Andrievsky, G.V., Buran, I., Nedzvetsky, V.S., Baydas, G., 2014. The effects of hydrated $C(60)$ fullerene on gene expression profile of TRPM2 and TRPM7 in hyperhomocysteinemic mice. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* 34(4), 317–324.
- Ganesh, B.S., Chintala, S.K., 2011. Inhibition of reactive gliosis attenuates excitotoxicity-mediated death of retinal ganglion cells. *PLoS ONE* 6, e18305.
- Haurigot, V., Villacampa, P., Ribera, A., Llombart, C., Bosch, A., Nacher, V., Ramos, D., Ayuso, E., Segovia, J.C., Bueren, J.A., Ruberte, J., Bosch, F., 2009. Increased intraocular insulin-like growth factor-I triggers blood-retinal barrier breakdown. *J. Biol. Chem.* 284(34), 22961–22969.
- Jiang, T., Chang, Q., Zhao, Z., Yan, S., Wang, L., Cai, J., Xu, G., 2012. Melatonin-mediated cytoprotection against hyperglycemic injury in Müller cells. *PLoS One* 7(12), e50661.
- Klein, B.E., Knudtson, M.D., Tsai, M.Y., Klein, R., 2009. The relation of markers of inflammation and endothelial dysfunction to the prevalence and progression of diabetic retinopathy: Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. *Arch. Ophthalmol.* 127(9), 1175–1182.
- Liu, B., Ma, X., Guo, D., Guo, Y., Chen, N., Bi, H., 2012. Neuroprotective effect of alpha-lipoic acid on hydrostatic pres-

- sure-induced damage of retinal ganglion cells in vitro. *Neurosci. Lett.* 526(1), 24–28.
- Mamczur, P., Borsuk, B., Paszko, J., Sas, Z., Mozrzymas, J., Wiśniewski, J.R., Gizak, A., Rakus, D., 2015. Astrocyte-neuron crosstalk regulates the expression and subcellular localization of carbohydrate metabolism enzymes. *Glia* 63(2), 328–330.
- Nedzvetsky, V., Andrievsky, G., Chachibaia, T., Tykhomyrov, A., 2012. Differences in antioxidant/protective efficacy of hydrated C₆₀ fullerene nanostructures in liver and brain of rats with streptozotocin-induced diabetes. *J. Diabetes Metab.* 3(8), 1–9.
- Pellerin, L., Magistretti, P.J., 2012. Sweet sixteen for ANLS. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32, 1152–1166.
- Rungger-Brandle, E., Dosso, A.A., Leuenberger, P.M., 2000. Glial reactivity, an early feature of diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41(7), 1971–1980.
- Sugaya-Fukasawa, M., Watanabe, T., Tamura, M., Egashira, S., Hisatomi, H., 2010. Glial fibrillary acidic protein is one of the key factors underlying neuron-like elongation in PC12 cells. *Exp. Ther. Med.* 2(1), 85–87.
- Tan, S.M., Deliyanti, D., Figgett, W.A., Talia, D.M., de Haan, J.B., Wilkinson-Berka, J.L., 2015. Ebselen by modulating oxidative stress improves hypoxia-induced macroglial Müller cell and vascular injury in the retina. *Exp. Eye Res.* 136, 1–8.
- Tarr, J.M., Kaul, K., Chopra, M., Kohner, E.M., Chibber, R., 2013. Pathophysiology of diabetic retinopathy. Hindawi Publish. Corp. ISRN Ophthalmol. ID 343560, 1–13.
- Tykhomyrov, A.A., Nedzvetsky, V.S., Klochkov, V.K., Andrievsky, G.V., 2008. Nanostructures of hydrated C₆₀ fullerene (C₆₀HyFn) protect rat brain against alcohol impact and attenuate behavioral impairments of alcoholized animals. *Toxicology* 246(2–3), 158–165.
- Ulas, M., Orhan, C., Tuzcu, M., Ozercan, I.H., Sahin, N., Gencoglu, H., Komorowski, J.R., Sahin, K., 2015. Anti-diabetic potential of chromium histidinate in diabetic retinopathy rats. *BMC Complement. Altern. Med.* 15(16), 1–8.
- Zong, H., Ward, M., Stitt, A.W., 2011. AGEs, RAGE, and diabetic retinopathy. *Diabet. Rep.* 11(4), 244–252.

Надійшла до редколегії 19.09.2015



УДК 616.12-05-06+517.112:612.8

Вплив короткотривалої дії адреналіну на рівень протеїнів S-100b та НМКА у різних відділах головного мозку щурів

Ю.П. Ковальчук, О.О. Довбань, А.М. Канга, Г.О. Ушакова

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпропетровськ, Україна

Рівень адреналіну різко підвищується через стреси, відчуття небезпеки, тривоги, страху, при травмах, опіках і шоківих станах. У високих концентраціях адреналін посилює катаболізм білків. За допомогою імуноферментного аналізу досліджено рівень астроцит-специфічного протеїну (S-100b) та нейрональної молекули клітинної адгезії (НМКА) у мозку щурів за умов адреналінового впливу. У мозку S-100b продукується головним чином астроцитами та залежно від концентрації чинить трофічну або токсичну дію на нейрони та гліальні клітини. Сильний стрес та ішемічний стан індукують перерозподіл кальцій-зв'язувального протеїну S-100b та підвищення його рівня. Кількісні зміни S-100b на сьогодні розглядаються як маркер мозкового пошкодження (кортикального, ішемічного тощо), порушення обміну речовин у мозку або за впливу різноманітних факторів на організм. Більшість НМКА – трансмембранні білки, які лише один раз перетинають плазматичну мембрану; внутрішньоклітинні домени мають різні розміри та, вважають, що вони беруть участь у зв'язуванні із цитоскелетом або у клітинній передачі сигналу. Отримані дані в нашому дослідженні не показали вагомого ефекту адреналіну при введенні щурам (під шкіру) у дозі 0,45–0,60 мг на щура один раз на добу протягом 10 діб щодо розподілу астроцит- і нейрон-специфічних досліджуваних протеїнів та їх концентрації у різних відділах головного мозку щурів, що може бути пояснено коротким часом дії адреналіну. Одноразове збільшення дози адреналіну на фоні хронічного впливу зумовлює зниження загального пулу мембранних білків у мозку щурів.

Ключові слова: адреналін; кора великих півкуль; гіпокамп; таламус; протеїн S-100b; НМКА

Short-term effect of adrenalin on S-100b and N-CAM level in the different rat brain areas

Y.P. Kovalchuk, O.O. Dovban, A.M. Kanga, G.A. Ushakova

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine

The level of adrenalin grows under stress conditions, sense of danger, anxiety, fear, trauma, burns and shock. In high concentrations adrenaline increases the speed of protein catabolism. Working through the circulatory system, adrenaline affects almost all the functions of organs, causing the body mobilization to counter stressful situations. Due to ELISA the astrocytes-specific protein (S-100b) and neural cell adhesion molecule (N-CAM) were studied. S-100b is produced mainly by astrocytes in the brain and depending on the concentration it causes trophic or toxic effect on the neurons and glial cells. Strong stress and ischemia induce re-distribution of calcium-binding protein S-100b and elevation of its level. Quantitative changes of S-100b under the influence of various factors on the body which lead to the metabolic disorder in the brain are considered today as a sign of brain damage (cortical, ischemic one, etc.). Fluctuations in the concentration of S-100b in the brain are not always accompanied by marked deterioration of the physical condition of animals, but they can also lead to a number of violations of integrative functions of the brain depending on over-production of this protein. Most N-CAM are transmembrane proteins that cross the plasma membrane once; intracellular domains have different size and it is thought they are involved in binding to cytoskeleton or cell signaling. Violation of N-CAM functions leads to disruption of nerve sprouts. Data obtained in our study showed no serious re-distribution of S-100b and N-CAM level in the different areas of rat brain (cerebral cortex, hippocampus and thalamus) under effect of adrenalin administered to the animals (under skin) in dosage of 0.45–0.60 mg per rat, 1 time per day during 10 days, probably because of the type of injection and/or short time of adrenalin action. Increased dosage of adrenaline 1 hour before decapitation leads to the decrease of level of total protein in membrane fraction extracted from brain tissue without changing the level of S-100b and N-CAM.

Keywords: adrenalin; cerebral cortex; hippocampus; thalamus; S-100b protein; N-CAM

Вступ

Дія адреналіну пов'язана із впливом на α - і β -адренорецептори та багато у чому збігається з ефектами порушення симпатичних нервових волокон. Його секреція різко підвищується через стреси, відчуття небезпеки, тривоги, страху, травм, опіків і шоків станів. У високих концентраціях адреналін посилює катаболізм білків. Діючи через систему кровообігу, адреналін впливає практично на всі функції всіх органів, у результаті чого мобілізуються сили організму щодо протидії стресовим ситуаціям.

S-100b – кальцій-зв'язувальний протеїн нервової тканини, здатний утворювати димери, уперше виявлений Муром (Beharier, 2012). За даними Мура, молекулярна вага цього протеїну дорівнює приблизно 20 кДа. Протеїн S-100b розглядають як один із вузлових молекулярних компонентів складних внутрішньоклітинних систем, які забезпечують функціональний гомеостаз клітин мозку шляхом сполучення та інтеграції різних кальцій-залежних метаболічних процесів. S-100b бере участь у регуляції гомеостазу як астроцитів, так і нервових клітин (Sorci et al., 2010). У лабораторії Р. Донато проведено роботи, які показали, що S-100b бере участь у регуляції багатьох процесів (Donato et al., 2009). Як внутрішньоклітинний регулятор S-100b бере участь у регуляції енергетичного метаболізму, транскрипції, фосфорилуванні білків, проліферації клітин, виживанні, диференціації та рухливості, у підтриманні Ca^{2+} гомеостазу, взаємодіючи із широким спектром білків (ферментами, субстратами ферментів, цитоскелетними частинами, допоміжними/адаптерними білками, транскрипційними факторами, убіквілін E3 лігазою, іонними каналами) в обмежених типах клітин. Як позаклітинний сигнальний елемент S-100b бере участь у розпізнаванні рецепторів, рецептор для глікерування кінцевих продуктів (RAGE), як на імунних клітинах так і на нейронах, астроцитах і клітинах мікроглії, судинних гладких м'язових клітинах, скелетних м'якоцитах і кардіоміоцитах. І все ж, RAGE не може бути єдиним рецептором, що активує S-100b. Білок здатний підвищувати сигналізацію bFGF-Fgfr1, взаємодіючи з FGFR1-зв'язаним bFGF у деяких типах клітин.

Позаклітинні ефекти S-100b варіюють залежно від його локальної концентрації. З'являється все більше доказів того, що концентрація S-100b міститься в позаклітинній рідині в нормальних фізіологічних умовах і локально підвищується у разі гострої травми тканини, таким чином S-100b передає трофічні ефекти у центральну та периферичну нервову систему, скелетну м'язову тканину, підтримуючи тканинний гомеостаз.

У мозку S-100b продукується головним чином астроцитами та залежно від концентрації чинить трофічну або токсичну дію на нейрони та гліальні клітини.

У мікромолярних концентраціях позаклітинний S-100b у формі гомо- та гетеродимеру може мати ефекти нейротоксину для нейронів та глії, індукуючи як апоптоз, так і некроз клітин (Hu, 1997; Lam, 2001; Bianchi, 2007). S-100b здатний посилювати експресію інтерлейкіну-1 (IL-1) та інтерлейкіну-6 (IL-6) у мікроглії та нейронах, що може спричинювати патологічні зміни вла-

стивостей нейронів (Li, 2000; Liu, 2005). При ураженні головного мозку спостерігається зростання рівня S-100b (Kochanek et al., 2008). Коливання концентрації S-100b у мозку не завжди супроводжуються помітним погіршенням соматичного стану тварин, але одночасно можуть виникати різноманітні порушення інтегративної функції мозку, залежно від ступеня гіперпродукції цього протеїну.

Нейрональна молекула клітинної адгезії (НМКА) належить до великої надродини імуноглобулінів, більшість представників якої беруть участь в організації міжклітинних контактів адгезивного типу. За своєю хімічною природою нейрональна молекула є гомофільним глікопротеїном. Більшість НМКА – трансмембранні білки, які лише один раз перетинають плазматичну мембрану; внутрішньоклітинні домени мають різні розміри та, як вважають, беруть участь у зв'язуванні із цитоскелетом або в клітинній передачі сигналу (Sheng, 2015). Одна із форм НМКА не перетинає плазматичну мембрану та прикріплюється до неї за рахунок глікозилфосфатидилінозиту (ГФІ), який «заякорює» дану форму в мембрані. Інша форма НМКА – секреторна, може включатися у позаклітинний матрикс. Порушення функцій НМКА зумовлює руйнування нервових відростків, а також гальмування росту відростків нервових клітин, які прикріплюються один до одного з утворенням пучків (Sytnyk, 2001). Вивчення цього типу білків – достатньо важливе питання, оскільки дозволяє визначити їх роль у формуванні нервової системи (особливо під час синаптогенезу) та використовувати їх як специфічні маркери низки захворювань нервової системи (фокальної ішемії тощо). Безумовно, існують відмінності розвитку процесів пошкодження мозку гризунів та приматів, проте багато спільних рис дозволяють певною мірою екстраполювати дані експериментів на розуміння клітинних механізмів ішемії у випадку інсульту в людини (Edelman, 2004).

Один із факторів ризику зміни кровонаповнення судин і капілярів – концентрація адреналіну в крові. Тому мета статті – оцінити короткотривалий вплив адреналіну (одного із факторів ризику розвитку ішемії мозку) на загальний пул цитозольних і мембранних білків, рівень астроцит-специфічного білка S-100b і нейрональної молекули клітинної адгезії у різних відділах головного мозку щурів.

Матеріал і методи досліджень

У роботі використано мозок 24 дорослих щурів лінії Вістар вагою 150–190 г, яких поділили на чотири групи ($n = 6$). І група – контрольна, 18 тваринам II–IV груп протягом 10 діб вводили підшкірно адреналін: перша доба – по 0,33 мл 0,18% розчину, друга – сьома – по 0,25 мл, восьма – десята доба – по 0,33 мл кожній тварині. Першу (контрольну) та другу (6 тварин, які отримували адреналін, Адр(X)) групи вивели з експерименту після завершення ін'єкцій адреналіну. Третю та четверту групи тварин лікували Корвітином (Борщівський хіміко-фармацевтичний завод, Україна) протягом 6 діб за схемою: перша доба – 25 мг на тварину, друга – третя доба – по 17 мг, четверта – шоста доба – по 8 мг. Перед декапітацією тваринам III групи вводили ударну

дозу адреналіну (Адр(О), 0,5 мл 0,18% розчину адреналіну). Експеримент проведено згідно з «Положенням про використання тварин у біомедичних досліджах» (Етика лікаря та права людини: положення про використання тварин у біомедичних досліджах, 2003). Наприкінці експерименту тварин декапітували під слабким наркозом (ізофлуран). Із мозку виділяли три відділи: кору великих півкуль, таламус та гіпокамп, які у подальшому використовували для отримання цитозольної та мембранної фракції білків за допомогою диференційного центрифугування гомогенату (Fomenko et al., 2011). Вихідний буфер містив трис – 0,25 мМ (рН 7,4), етилендіамінтетраоцет (ЕДТО) – 1 мМ, дигітотрейтол – 2 мМ, фенілметилсульфонілфторид (ФМСФ) – 0,2 мМ, азид натрію (NaN₃) – 3 мМ (вказані реагенти були придбані у Sigma, США). Мембранні білки екстрагували за допомогою тритон Х-100 – 2% у вихідному буфері. Рівень загального протеїну в отриманих фракціях визначали методом Bradford (1985) і виражали у мг/мл.

Вміст S-100b у корі великих півкуль, таламусі та гіпокампі визначали згідно з методикою конкурентного твердофазного імуноферментного аналізу з використанням моноспецифічних поліклональних антитіл проти S-100b (Sigma, США) та відповідного очищеного протеїну S-100b (Sigma, США) як стандарту (Нго, 1998). Кількісне визначення нейрональної молекули клітинної адгезії проводили також згідно зі стандартною методикою ІФА з використанням відповідних антитіл проти НМКА (отриманих у нашій лабораторії) та очищеного НМКА як стандарту (Protein Lab, Копенгаген, Данія). Отримані результати вимірювали за допомогою ІФА-

рідеру Anthos 2010 (Фінляндія) за довжини хвилі 492 нм. Кількість НМКА та S-100b виражали в мкг білка на 100 мг тканини. Статистичну обробку результатів проведено із застосуванням t-критерію Стьюдента. Достовірними вважали відмінності за P < 0,05.

Результати та їх обговорення

Результати аналізу в отриманих фракціях мозку щурів показали, що при введенні адреналіну підшкірно в дозі 0,45–0,60 мг на тварину 1 раз на добу протягом 10 діб вірогідних змін загального пулу цитозольних протеїнів у досліджуваних відділах мозку щурів не відбувалось (рис. 1). У щурів контрольної групи вміст загального протеїну в цитозольній фракції, отриманій з кори великих півкуль, становив $2,82 \pm 0,30$ мг/мл, гіпокамп – $3,09 \pm 0,61$ мг/мл, таламуса – $4,71 \pm 0,62$ мг/мл. За умов одноразового впливу адреналіну протягом 10 діб у гіпокампі встановлено тенденцію до зменшення рівня загального протеїну, а у таламусі відмічено тенденцію до збільшення рівня загального пулу цитозольних протеїнів, але ці відмінності не достовірні, оскільки вміст протеїнів коливався у широкому діапазоні. За введенням Корвітину (антиоксидантного препарату) після 10-добового впливу адреналіну в указаній вище дозі спостерігали тільки тенденцію коливання рівня загального протеїну у дослідних відділах мозку в межах нормальної варіації порівняно як із групою тварин, яким вводили адреналін, так і з контрольними тваринами.

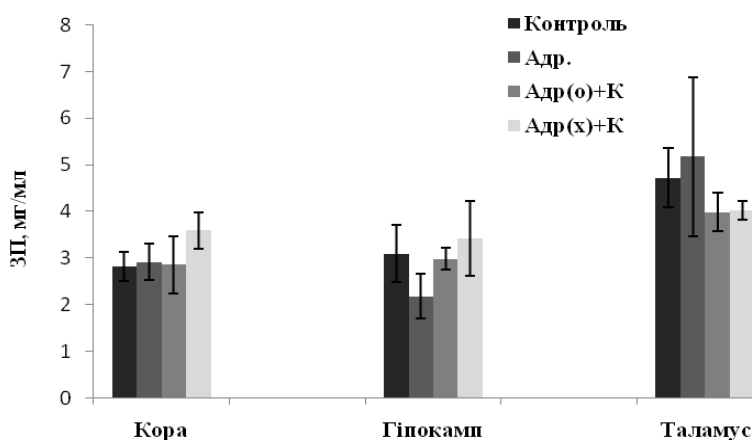


Рис. 1. Рівень загального протеїну (ЗП) у цитозольних фракціях, отриманих із різних відділів

головного мозку щурів: контроль – контрольні тварини, які отримували підшкірно фізіологічний розчин протягом 10 діб, Адр. – отримували підшкірно адреналін один раз на добу у дозі 0,45–0,60 мг протягом 10 діб; Адр(о)+К – отримували підшкірно адреналін та в останні дні ще і Корвітин, із додаванням ударної дози адреналіну на останньому дні експерименту; Адр(х)+К – отримували підшкірно адреналін та в останні дні ще і Корвітин; n = 6

Дослідження загального пулу мембранних протеїнів у мозку тварин визначило тенденцію для всіх відділів мозку. У гіпокампі контрольних тварин рівень протеїнів у мембранній фракції становив 2,3 мг/мл (рис. 2). За умов введення адреналіну один раз на добу у дозі 0,45–0,60 мг на тварину протягом 10 діб (група Адр (х)) рівень мембранних протеїнів достовірно не змінився. У разі додаткового збільшення дози адреналіну (гостре уведення) у дозі 0,9 мг на тварину перед декапітацією на тлі дії адреналіну протягом 10 діб та дії Корвітину (Адр

(О) + Кор) спостерігали вірогідне зменшення рівня мембранних білків у даній структурі мозку порівняно з контрольною групою. У разі адреналінового навантаження протягом 10 діб (без збільшення дози) за одночасного використання терапевтичного уведення Корвітину достовірних змін загального пулу мембранних білків у гіпокампі щурів не зареєстровано. Подібну тенденцію також помічено у корі великих півкуль та таламусі.

Щодо рівня S-100b протеїну, то у контрольній групі щурів у корі великих півкуль вміст даного протеїну

складав $0,13 \pm 0,010$ мкг/100 мг тканини, у гіпокампі – $0,10 \pm 0,006$ мкг/100 мг тканини, у таламусі – $0,11 \pm 0,010$ мкг/100 мг тканини (рис. 3).

У гіпокампі та таламусі за уведення адреналіну підшкірно в дозі 0,45–0,60 мг на тварину один раз за добу протягом 10 діб помічено тенденцію до зниження рівня S-100b, вміст даного протеїну в гіпокампі – на рівні $0,08 \pm 0,02$ мкг/100 мг тканини, у таламусі – $0,10 \pm 0,01$ мкг/100 мг тканини, але відмінності були не достовірними, оскільки вміст S-100b протеїну коливався

в межах нормальної варіації. У мозочку також зазначено тільки тенденцію до збільшення рівня S-100b протеїну за умов уведення адреналіну. Корвітин після 10-добового впливу адреналіну в указаній вище дозі також не викликав вірогідного зниження рівня S-100b у корі великих півкуль порівняно із групою тварин, яким вводили адреналін. У гіпокампі та таламусі досліджуваних груп тварин вірогідних змін концентрації S-100b також не спостерігали (відбувалися коливання в межах 0,10–0,15 мкг/100 мг тканини).

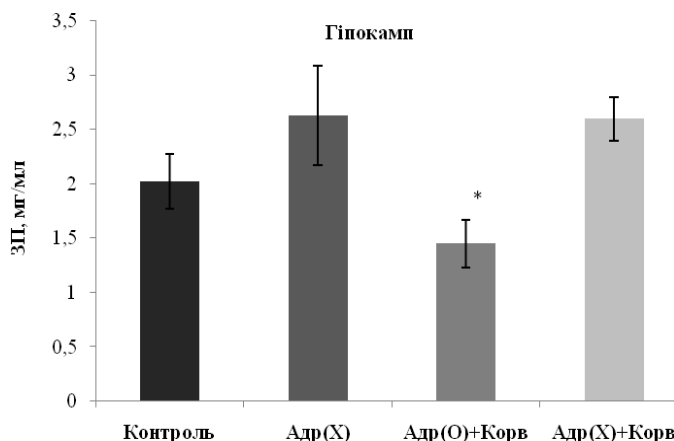


Рис. 2. Рівень загального протеїну (ЗП) у мембранних фракціях, отриманих із гіпокампа великих півкуль мозку щурів: назви груп тварин див. рис. 1; n = 6; * – P < 0,05 відносно контролю

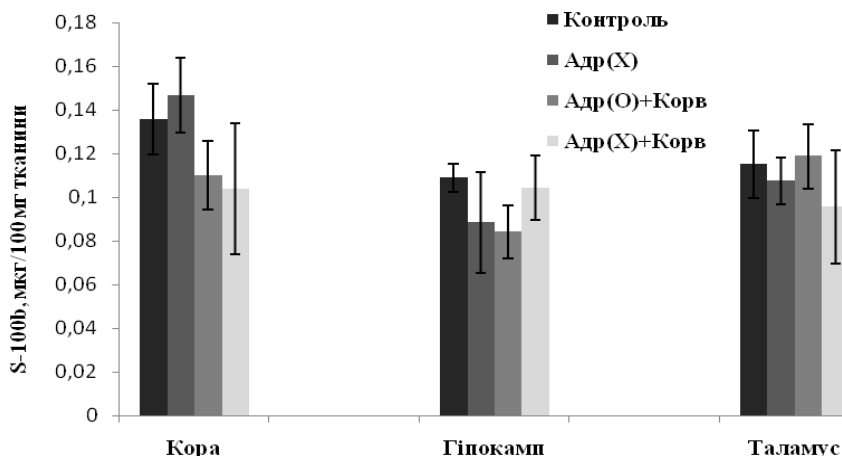


Рис. 3. Рівень S-100b протеїну в цитозольних фракціях, отриманих із різних відділів головного мозку щурів: назви груп тварин див. рис. 1; n = 6

Згідно з отриманими результатами дослідження мозку щурів показано, що для контрольних тварин рівень нейрональної молекули клітинної адгезії в мембранній фракції гіпокампа склав 62 мкг/100 мг тканини (рис. 4). За впливу адреналіну один раз на добу у дозі 0,45–0,60 мг на тварину протягом 10 діб (група Адр (x)) рівень НМКА недостовірно зменшувався до 57 мкг/100 мг тканини. У випадку додаткового збільшення дози адреналіну (гостре уведення) у дозі 0,90 мг на тварину перед декапітацією, але на тлі дії Корвітину (Адр(O)+Корв) достовірних змін рівня мембранної форми нейрональної молекули клітинної адгезії в даній структурі мозку не спостерігали порівняно з контрольною групою. У разі адреналінового навантаження протягом 10 діб за одночасного терапевтичного уведення Корвітину рівень

мембранної нейрональної молекули клітинної адгезії в гіпокампі щурів був підвищений порівняно з контрольною групою тварин ($77,7 \pm 1,5$ мкг/100 мг тканини). Подібну тенденцію також спостерігали для кори великих півкуль і таламуса.

Отримані дані вказують, що за уведення адреналіну підшкірно в дозі 0,45–0,60 мг на тварину один раз на добу протягом 10 діб рівень загального пулу протеїну цитозольної та мембранної фракції із досліджуваних відділів головного мозку щурів суттєво не змінюється. У разі додаткового збільшення дози адреналіну до 0,9 мг на тварину перед декапітацією на тлі дії Корвітину спостерігається значне зменшення рівня мембранних білків у всіх досліджуваних відділах мозку порівняно з контрольною групою. Рівень S-100b протеїну достовірно

не змінюється у різних відділах головного мозку тварин при уведенні адреналіну у вищезазначеній дозі, що може бути пояснено типом ін'єкції та коротким періодом дії

адреналіну. Рівень НМКА недостовірно зменшується у мозку щурів, але таке зниження не критичне для виконання функцій у досліджуваних відділах мозку.

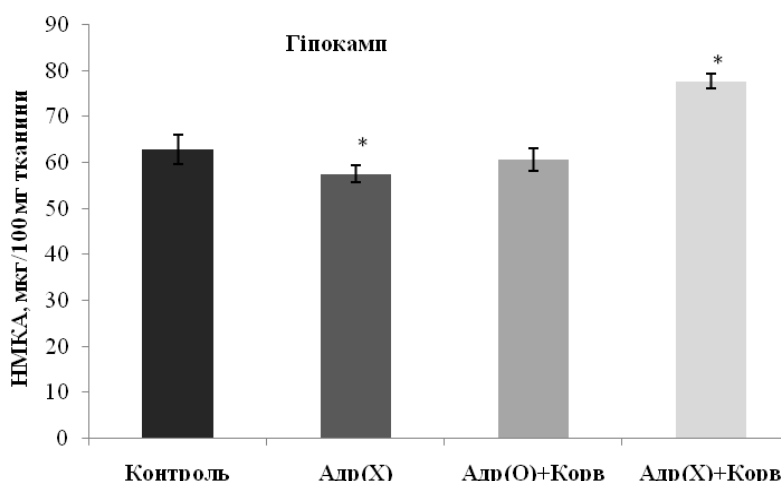


Рис. 4. Рівень нейрональної молекули клітинної адгезії (НМКА) у мембранній фракції з гіпокампа мозку щурів: назви груп тварин див. рис. 1; n = 6; * – P < 0,05 відносно контролю

Нині проведено багато досліджень щодо S-100b як маркера ішемічного пошкодження мозку, що має прогностичне значення. Тому велика кількість публікацій присвячена оцінюванню кореляції рівнів S-100b із клініко-неврологічним обстеженням і оцінюванням обсягу інфаркту. Рівень S-100b у лікворі підвищується за умов судинних мозкових пошкоджень (Lamers et al., 1995) і корелює із розміром інфаркту та клінічним результатом (Wunderlich et al., 1999). Збільшення концентрацій S-100b після гострого ішемічного інсульту досягає максимуму через 2–3 доби (Elting et al., 2000). За даними досліджень Bottiger et al. (2001) після гіпоксичного ушкодження мозку у результаті зупинки серця концентрація S-100b досягає піку в інтервалі 2–24 години. При указаних хворобах відбувається зміна рівня S-100b у рази. Але отримані нами дані вказують на те, що короткотривалий вплив адреналіну не індукує суттєвої зміни метаболізму вказаного протеїну в мозку щурів, хоча за даними електрокардіограм у дослідних тварин були зареєстровані ознаки розвитку ішемії серця за умов використаного протоколу впливу адреналіну.

Попередні дослідження (Tur et al., 2013) в експериментальній моделі ішемічної кардіопатії показали, що тривала ішемія провокує гіперекспресію ізоформи білка НМКА-140. Припускається, що даний протеїн може виступати індуктором адгезивно-опосередкованого клітинного сигналу на певні гормональні стимули, але тільки за тривалого підвищення концентрації адреналіну.

Висновки

За умов короткотривалого впливу адреналіну (підшкірної ін'єкції) 0,45–0,60 мг на тварину один раз на добу протягом 10 діб не відбувається суттєвої зміни розподілу кальцій-зв'язувального протеїну S-100b у мозку щурів, але індукується незначне зменшення концентрації нейрональної молекули клітинної адгезії у різних відділах головного мозку щурів. Застосування антиок-

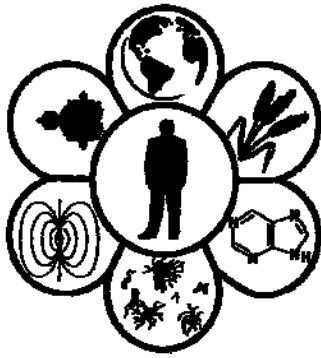
сидантного препарату Корвітину запобігає катаболізму вказаних протеїнів за хронічної дії адреналіну. Характер уведення адреналіну (підшкірно) та тривалість напівжиття даного гормону не дають підґрунтя для суттєвого впливу на рівень дослідних протеїнів у мозку щурів.

Бібліографічні посилання

- Beharier, O., 2012. S100B – a potential biomarker for early detection of neonatal brain damage following asphyxia. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 25(9), 1523–1528.
- Bianchi, R., Adami, C., Giambanco, I., Donato, R., 2007. S100B binding to RAGE in microglia stimulates COX-2 expression. *J. Leukoc. Biol.* 81(1), 108–118.
- Bradford, M., 1985. Rapid and sensitive methods for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bottiger, B.W., Mobes, S., Glatzer, R., Bauer, H., Gries, A., Brtsch, P., Motsch, J., Martin, E., 2001. Astroglial protein S-100 is an early and sensitive marker of hypoxic brain damage and outcome after cardiac arrest in humans. *Circulation* 103, 2694–2698.
- Donato, R., Sorci, G., Riuzzi, F., Arcuri, C., Bianchi, R., Brozzi, F., Tubaro, C., Giambanco, I., 2009. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim. Biophys. Acta* 1793(6), 1008–1022.
- Edelman, J.M., 2004. Expression of cell adhesion molecules during embryogenesis and regeneration. *Exp. Cell Res.* 161(1), 1–16.
- Elting, J.W., De Jager, A.E.J., Teelken, A.W., Schaaf, M.J., Maurits, N.M., van der Naalt, J., Sibinga, C.T., Sulter, G.A., De Keyser, J., 2000. Comparison of serum S-100 protein levels following stroke and traumatic brain injury. *J. Neurol. Sci.* 181, 104–110.
- Fomenko, O.Z., Ushakova, G.O., Piyerzhynovsky, S.G., 2011. Proteins of astroglia in the rat brain under experimental chronic hepatitis condition and 2-oxoglutarate effect. *Ukr. Biochem. J.* 83(1), 69–75.
- Hu, J., 1997. S100 beta induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes. *J. Neurochem.* 69, 2294–2301.

- Kochanek, P.M., Berger, R.P., Bayir, H., Wagner, A.K., Jenkins, L.W., Clark, R.S., 2008. Biomarkers of primary and evolving damage in traumatic and ischemic brain injury: Diagnosis, prognosis, probing mechanisms, and therapeutic decision making. *Curr. Opin. Crit. Care* 14(2), 135–141.
- Krawczyk, A., Jaworska-Adamu, J., 2010. Synantocytes: The fifth type of glia? In comparison with astrocytes. *Folia Histochem. Cyto.* 48(2), 173–177.
- Lam, A.G., 2001. Mechanism of glial activation by S100B: Involvement of the transcription factor NFκB. *Neurobiol. Aging* 22, 765–772.
- Lamers, K.J., Van Engelen, B.G., Gabreels, F.J., Hommes, O.R., Borm, G.F., Wevers, R.A., 1995. Cerebrospinal neuron-specific enolase, S-100 and myelin basic protein in neurological disorders. *Acta Neurol. Scand.* 92, 247–251.
- Li, Y., 2000. S100β induction of the pro-inflammatory cytokine interleukin-6 in neurons. *J. Neurochem.* 74, 143–150.
- Liu, L., 2005. S100B-induced microglial and neuronal IL-1 expression is mediated by cell type-specific transcription factors. *J. Neurochem.* 92, 546–553.
- Sheng, L., Leshchyns'ka, I., Sytnyk, V., 2015. Neural cell adhesion molecule 2 promotes the formation of filopodia and neurite branching by inducing submembrane increases in Ca²⁺ levels. *J. Neurosci.* 35(4), 1739–1752.
- Sorci, G., Bianchi, R., Riuzzi, F., Tubaro, C., Arcuri, C., Giambanco, I., Donato, R., 2010. S100B protein, a damage-associated molecular pattern protein in the brain and heart, and beyond. *Cardiovasc. Psychiatry Neurol.* ID 656481, 1–13.
- Sytnyk, V.N., Dityatev, A.E., Korogod, S.M., 2001. Distribution of cell adhesion molecules on the surface of branching neurites: Model-inherited effects of branch diameter and mode of transport. *Neurophysiology* 33(1), 15–19.
- Wunderlich, M.T., Ebert, A.D., Kratz, T., Goertler, M., Jost, S., Herrmann, M., 1999. Early neurobehavioral outcome after stroke is related to release of neurobiochemical markers of brain damage. *Stroke* 30, 1190–1195.

Надійшла до редколегії 20.09.2015



UDC [57.04+616.5]616-003+616-008

Biochemical mechanisms of skin radiation burns inhibition and healing by the volumetric autotransplantation of fibroblasts and of keratinocytes with fibroblasts composition

L.V. Altukhova, K.V. Kot, Y.G. Kot, K.S. Morozova, Y.E. Persky

V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

Mechanisms of influence of volumetric autotransplantation of fibroblasts and of the mixture of fibroblasts and keratinocytes on the development of the local 3rd degree X-ray burn and the radiation skin ulcer in guinea pigs were investigated. We used deep administration into the irradiation zone on its perimeter of 6 doses, which contained $(150-160) \times 10^3$ fibroblasts and $(130-140) \times 10^3$ keratinocytes in 100 μ l. It is shown that this autotransplantation carried out 1 hour after the irradiation, and then every 24 hours, reduces the area of burn on the 35th day, compared to the control by 63%. Radiation ulcer appears on the 10th day after irradiation and is completely healed on the 25th day. With the same regimen of administration of only fibroblasts containing $(200-210) \times 10^3$ cells in 100 μ l, these parameters of treatment were equal to 31% on 4th and 35th day, respectively. It is shown that as a result of radiation in the area of burn the level of gene expression of collagen types I and III, elastin, fibronectin, vinculin, decorin, hyaluronan synthases 1, 2, 3, matrix metalloproteinases 1, 2, 3, 7, 9 and hyaluronidase is reduced. Besides, in the burn area the level of gene expression of transforming growth factor α , fibroblast growth factors 1, 2, 8 and anti-inflammatory cytokines – interleukin 10 and transforming growth factor- β 1 – is reduced, while the level of gene expression of proinflammatory cytokine (interleukin 1 β) increases. Both types of autotransplantation cause the growth of the expression level of all the structural genes and regulatory proteins of biopolymers and decrease in the expression level of interleukin 1 β , which leads to activation of tissue regeneration and healing of the burn wound. Reasons for the higher efficiency of autotransplantation using the mixture of fibroblasts and keratinocytes compared to autotransplantation by fibroblasts only are both the larger total number of live cells regularly replacing dead cells in the burn area, and mutual stimulation of auto-fibroblasts and auto-keratinocytes to proliferate and to synthesize biologically active substances, i.e. cytokines and growth factors.

Keywords: radiation burn; radiation ulcer; fibroblasts; keratinocytes; volumetric transplantation

Биохимические механизмы ингибирования и заживления лучевого ожога кожи объемной аутотрансплантацией фибробластов и композиции фибробластов с кератиноцитами

Л.В. Алтухова, К.В. Кот, Ю.Г. Кот, К.С. Морозова, Е.Э. Перский

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

Проведено исследование механизмов влияния объемной аутотрансплантации фибробластами и смесью фибробластов с кератиноцитами на развитие локального рентгеновского ожога III степени и лучевой язвы кожи у морских свинок. Использовано глубокое введение в зону облучения по ее периметру 6 доз, содержащих $(150-160) \times 10^3$ фибробластов и $(130-140) \times 10^3$ кератиноцитов в 100 мкл. Показано, что эта аутотрансплантация, производимая через 1 час, а затем каждые 24 часа после облучения, к 35-м суткам уменьшает площадь ожога по сравнению с контролем на 63%. Лучевая язва возникает на 10-е сутки после облучения и полностью заживает к 25-м суткам. При такой же схеме введения одних фибробластов с содержанием $(200-210) \times 10^3$ в 100 мкл эти показатели лечения составляют 31%, 4 и 35 суток соответственно. В результате облучения в зоне ожога снижается уровень экспрессии генов коллагена типов I и III, эластина, фибронектина, винкулина, декорина, гиалуронансинтаз 1, 2 и 3, матриксных металлопротеиназ 1, 2, 3, 7 и 9 и гиалуронидазы. В зоне ожога снижен также уровень экспрессии генов трансформирующего фактора роста α , факторов роста фибробластов 1, 2 и 8 и противовоспалительных цитокинов – интерлейкина 10 и трансформирующего фактора роста β 1, а

V.N. Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, 61022, Ukraine

Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, пр. Свободы, 4, Харьков, 61022, Украина

Tel: +38-093-973-17-73. E-mail: kot_jurij@inbox.ru

уровень экспрессии гена провоспалительного цитокина – интерлейкина 1β – повышен. Оба вида аутотрансплантации вызывают повышение уровня экспрессии всех генов структурных биополимеров, генов фибронектина, винкулина, декорина, гиалуронансинтаз 1, 2 и 3, а также матриксных металлопротеиназ 1, 2, 3, 7 и 9 и гиалуронидазы. Уровень экспрессии гена интерлейкина 1β снижается, что приводит к активации процессов регенерации тканей и заживления ожоговой раны. Абсолютные изменения уровней экспрессии всех этих генов больше при введении в зону ожога смеси аутофибробластов с аутокератиноцитами. Причинами более высокой эффективности аутотрансплантации смесью фибробластов с кератиноцитами по сравнению с аутотрансплантацией одними только фибробластами являются как большее суммарное количество живых клеток, регулярно замещающих в зоне ожога погибшие клетки, так и взаимная стимуляция аутофибробластов и аутокератиноцитов к пролиферации и синтезу биологически активных веществ – цитокинов и факторов роста.

Ключевые слова: лучевой ожог; лучевая язва; фибробласты; кератиноциты; аутотрансплантация

Introduction

Currently, one of the most perspective directions of the treatment of skin radiation burns and, especially, of radiation ulcers, is the cell therapy, in which autologous mesenchymal stromal cells, dermal fibroblasts and keratinocytes are used most commonly. Application of these cells to the affected area significantly reduces the degree of inflammation and stimulates the regeneration process in the ulcer area (Gerasimova and Nazarenko, 2005; Tenenhaus and Rennekampff, 2007; Bushmanov, 2012; Ryan, 2012; Eldashov, 2013). However, there is information that the use of stem cells in therapy is associated with the risk of their transformation into cancer cells (Herberts et al., 2011; Hatzistergos et al., 2011; Haubner et al., 2012; Miao, 2014). At the same time, absolute safety of autogenous dermal fibroblasts and keratinocytes is proved. Standard techniques of using of these cells lay in their usually separate application in the form of suspensions or cell layers on burn wounds with already formed necrotic ulcers (Rennekampff, 1997; Paramonov et al., 2000; Shapovalov et al., 2005; Benderitter, 2010). In works (Altuhova et al., 2013; Kot et al., 2013) it is shown that more effective therapy is not an application on wound surface of autologous fibroblasts, but their administration into the volume of the irradiated area, which captures all the layers of skin and subcutaneous tissues. Regular administration of the cells, which begins immediately after irradiation, inhibits the development of the burn and formation of the radiation ulcer.

There is a system of positive feedbacks between interacting fibroblasts and keratinocytes *in vivo*, which is based on production and secretion of substances that stimulate mutual proliferation of these cells and tissue regeneration (Marionnet and Pierrard, 2006; Varani and Perone, 2007; Werner et al., 2007; Yim et al., 2010; Huang and Burd, 2012; Rowan et al., 2015). Therefore, the administration of the mixture of auto-fibroblasts and auto-keratinocytes into the irradiated area should result in more effective healing of the burn than the administration of fibroblasts only.

In the present study the intensity of the biological mechanisms underlying the inhibition of development and the burn healing when fibroblasts only and the suspension composed of a mixture of fibroblasts and keratinocytes used for autotransplantation was compared.

Materials and methods

Experiments have been carried out on guinea pigs weighing 350–450 g. When carrying out the experiments we followed recommendations of the standard of biomedical ethics of the European convention “For the protection of vertebrate

animals used for experimental and other scientific purposes” (ETS No. 170, 1998) and the Law of Ukraine “On protection of animals against ill treatment, 2006” (Law of Ukraine No. 3447-IV, 2006).

Radiation burns of 3rd degree of the skin of the animals' left thigh were caused by X-ray $CuK\alpha$ -radiation at dose rate of 4.25 Gy/min for 14.1 minutes while irradiating the shaved skin area of 1.5 cm² on the left hind paw thigh (Rennekampff et al., 1997). On 32nd day before the irradiation the skin biopsies from a right thigh of animals under ether anesthesia were taken. Skin wounds after a biopsy were completely healed on the 15th day. Primary cultures of fibroblasts and keratinocytes which were sub-cultured by standard methods for these cells (Rittié, 2005) and (Shaw, 1996; Takagi et al., 2011; Groeber et al., 2012) respectively were obtained from biopsies. Both cell types of the third passage stored in liquid nitrogen were used in the experiment (Keller, 2000).

The animals were divided into 4 groups. The first one included non-irradiated animals. The irradiated animals of the second group were not treated. In 1 hour after the irradiation, and then every 24 hours the third group of animals, which were being treated, was administered by suspension containing $(200-210) \times 10^3$ fibroblasts in 100 μ l, and the fourth group – by a mixture of suspensions containing $(150-160) \times 10^3$ fibroblasts and $(130-140) \times 10^3$ keratinocytes in 100 μ l of sterile saline for injection. 6 subcutaneous injections were made on the perimeter of the irradiation zone at an angle 45° to its center at a depth of 1 mm. The content of living cells in the suspension was 80–85%. On the first day, and then at intervals of 72 hours during 35 days prior to each administration of autologous cells, in irradiated animals of all the three groups the overall area of the burn and a burn ulcer were measured by photomicrography and using the program ImageJ 2x 2.1.4.7 ud2 and Imaris 7.2.3 (Imaris, 2011). On the 20th and 35th day the irradiated animals of all the groups were decapitated under sodium thiopental effect, and histological preparations of skin were prepared with the area of burn (Penn Medicine, 2012). The same preparations were prepared with analogous sites of skin of non-irradiated animals. The number of living cells per 1 mm² of burn wound (Histomix, 2012) and the area (%) occupied in it by total collagen (Histomix, 2010), collagen type I (FITC-conjugated monoclonal antibody Invitrogen) (Histomix, 2008) and glycosaminoglycans (Histopathology, 2013) were microscopically measured in preparations.

The same measurements were carried out in preparations of non-irradiated animals' skin.

In the histological preparations of skin with a burn area of irradiated and analogous areas of skin of intact animals the gene expression of extracellular matrix proteins, enzymes participating in the metabolism of collagen and glycosaminoglycans, pro-inflammatory and anti-inflammatory inter-

leukins, transforming growth factors and fibroblast growth factors were measured. For this purpose the skin, enclosed in paraffin blocks, was deparaffinized after formalin fixation, and RNA was isolated from it with using of kits "Qiagen RNeasy FFPE Kit" according to the original instruction of the manufacturer (Qiagen, 2013).

RNA concentration in the extracts was determined using the scanning UV-spectroscopy. The absorbance was measured at 260 nm in quartz micro-cuvettes Fisher Scientific of 400 µl volume with optical path length of 10 mm. RNA concentration in the eluates was equal to 27 µg/ml. The ratio of the absorbance at 260 and 280 nm was 1.8–1.9, indicating high purity of RNA in the solutions investigated. Reverse transcription was conducted by synthesizing cDNA using the QIAGEN OneStep RT-PCR Kit according to the original instruction of the manufacturer (Qiagen, 2015). In our work we used gene-specific primers and Cy3-labeled nucleotides manufactured by Arrayit Life Technologies (USA), respectively. Amplification was carried out using the thermocycler BIO-RAD iCycler. Hybridization was performed on the DNA microarray manufactured by Arrayit (USA) according to the original instruction of the manufacturer (Arrayit, 2015). The individual chambers for hybridization SecureSeal were used for washing (Invitrogen, 2015). The chips were scanned on the confocal fluorescence scanner Affymetrix

428 using the Jaguar software. Scanning mode was as follows: slide size 25 × 75 × 1 mm, resolution 10 microns, wavelengths of excitation and emission of fluorescence – 532 and 570 nm, respectively. The obtained fluorescence values were expressed in fluorescence units/mg of tissue.

Determination of the content of pro-inflammatory and anti-inflammatory interleukins in blood serum was carried out by immunoenzyme method using reagents of ELISA kits manufactured by DRG Diagnostics (Germany), according to the original instruction of the manufacturer (Laboratornaja Diagnostika, 2015).

Analysis and statistical processing of the results of experiments were carried out with the software package Origin 7.5 pro using Normality Test and Two-Sample T-Test modules (n = 6). Results were expressed as M ± sd, where M – arithmetic mean, SD – standard deviation. Results with P < 0.05 were considered as reliable.

Results and Discussion

Table 1 shows the numerical values of the changes of areas of radiation burns and radiation skin ulcers in treated animals in relation to these areas in untreated irradiated animals in two variants of autotransplantation.

Table 1

Effect of autotransplantation of fibroblasts and the mixture of fibroblasts and keratinocytes on the dynamics of the relative change of areas of radiation skin burns and radiation ulcers in guinea pigs (%)

Studied area	Terms of animals treatment	Twenty-four hours after the irradiation							
		1	4	7	10	15	20	25	35
Burn	fibroblasts	33.3 ± 2.4 [#]	50.0 ± 3.5 ^{##}	56.8 ± 3.1 [#]	63.2 ± 3.5 ^{##}	92.0 ± 4.1 ^{##}	80.3 ± 3.7 ^{##}	69.0 ± 2.7 ^{##}	44.3 ± 1.9 ^{##}
	fibroblasts and keratinocytes	33.3 ± 2.0 [#]	39.6 ± 2.5 ^{##}	50.6 ± 2.3 ^{##}	58.8 ± 1.6 ^{##}	71.5 ± 3.4 ^{##}	78.2 ± 3.3 [#]	37.0 ± 2.1 ^{##}	14.4 ± 2.3 ^{##}
Ulcer	fibroblasts	0	4.1 ± 0.5 ^{##}	52.0 ± 2.0 ^{##}	22.6 ± 1.7 ^{##}	58.8 ± 2.8 ^{##}	10.5 ± 1.4 ^{##}	9.8 ± 1.1 [#]	0
	fibroblasts and keratinocytes	0	0	0	11.3 ± 1.3 ^{##}	14.4 ± 1.5 [#]	3.8 ± 0.6 ^{##}	0 ⁺	0

Note: [#] – reliable (P < 0.05) relatively to irradiated untreated animals; ⁺ – reliable (P < 0.05) relatively to animals which were treated with fibroblasts on the previous day.

As is evident, both types of autotransplantation compared with untreated animals inhibit the development of burn and accelerate the healing of radiation ulcer, but with different efficiency. Thus, on the 35th day the relative area of burn when administered by the mixture of fibroblasts with keratinocytes is three times less than when administered by fibroblasts only. When fibroblasts only are administered, the radiation ulcer appears on the 4th day, reaches maximum size on the 15th and is completely healed on the 35th day, while in case of administration of the mixture of fibroblasts and keratinocytes it occurs on 10th, 15th and 25th day, respectively.

Table 2 shows the histological parameters of collagen and glycosaminoglycans content in supramolecular formations of the extracellular matrix of skin when administering only fibroblasts and the mixture of fibroblasts and keratinocytes in the irradiation zone during the process of formation, development and growth of the burn. As is seen, both the content of total collagen and collagen type I, which is a part of the most generated, "matured" supramolecular formations of matrix, as well as total glycosaminoglycans, decreases dramatically in the extracellular matrix of the irradiated non-treated animals as compared to non-irradiated animals throughout the observation period. Administration of auto-fibroblasts on the 20th and 35th day after irradiation in-

creases the total content of collagen in the burn zone of irradiated treated animals up to 74% and 83%, compared to non-irradiated ones. Administration of the mixture of auto-fibroblasts and auto-keratinocytes completely normalizes the content of collagen in the area of burn already on the 20th day after irradiation, and on 35th day it even slightly exceeds it, amounting 110% of the control. Similarly, both types of autotransplantation normalize glycosaminoglycans content in the burn zone, but to different degrees.

In the animals treated with auto-fibroblasts the content of glycosaminoglycans in the burn on the 20th and 35th day after irradiation is higher than that of non-irradiated ones, and is equal to 130% and 170%, respectively. At the same time, autotransplantation with the mixture of fibroblasts and keratinocytes already on the 20th day after irradiation completely normalizes the content of glycosaminoglycans in the burn, and on 35th day, it is only slightly below normal. The dramatic decrease in the content of structural biopolymers of the extracellular matrix is the result of mass death of connective tissue cells in the area of X-ray burn (Paramonov, 2000; Kligunenko, 2005; Gerasimova, 2005; Tenenhaus and Rennekampff, 2007). Their destruction leads to the dramatic shift of the exchange of structural biopolymers of connective tissue matrix in the direction of degradation. This occurs due to the decrease of

biopolymer synthesis because of reduction of the living cells number, and as a result of activation of the enzymatic cleavage, in particular, by acidic cathepsins which come out to the extracellular environment during cell destruction.

Thus, in irradiated non-treated animals the number of living cells in the wound amounts to only 17% and 10% on the 20th and 35th days, respectively, on their number on the same area of non-irradiated animals' skin.

Table 2

Effect of autotransplantation of fibroblasts and the mixture of fibroblasts and keratinocytes on the number of living cells, collagen and glycosaminoglycans (GAG) content in the area of radiation skin burn of guinea pigs

Days after irradiation	The irradiation and treatment of animals conditions		The number of living cells in the total area, 10 ⁴ /mm ²	The area occupied by the biopolymers in the general burn area, %		
				total collagen	collagen type I	GAG
20	non-irradiated		2.5 ± 0.1	33.1 ± 1.8	32.6 ± 1.4	20.4 ± 1.1
	irradiated non-treated		0.5 ± 0.1 [#]	25.0 ± 1.5 [#]	23.1 ± 0.9 [#]	11.6 ± 0.8 [#]
	autotransplantation	fibroblasts	1.7 ± 0.2 [#]	27.8 ± 1.2 [#]	31.5 ± 1.1	25.8 ± 1.5 [#]
		fibroblasts and keratinocytes	2.3 ± 0.1 ⁺	32.4 ± 1.3 ⁺	32.1 ± 1.3	21.1 ± 1.2 ⁺
35	irradiated non-treated		0.3 ± 0.1 [#]	18.3 ± 1.5 [#]	16.4 ± 1.5 [#]	5.1 ± 0.6 [#]
	autotransplantation	fibroblasts	2.4 ± 0.1	29.2 ± 1.3 [#]	27.0 ± 1.2 [#]	32.9 ± 2.1 [#]
		fibroblasts and keratinocytes	3.2 ± 0.1 ⁺	37.8 ± 2.1 ⁺	36.9 ± 2.3 ⁺	17.7 ± 1.4 ^{##}

Note: [#] – reliable (P < 0.05) relatively to non-irradiated animals; ⁺ – reliable (P < 0.05) relatively to animals which were treated with fibroblasts on the corresponding day.

When fibroblasts are administered after the irradiation of animals, their number in the burn amounts to 67% and 95% at these terms compared to the control. Administration of the mixture of keratinocytes and fibroblasts into the burn zone normalizes the number of living cells in it on the 20th day, and on the 35th day it already exceeds 26% (Table 2). Naturally, these effects are primarily the consequence of increasing content of living cells in the area of radiation damage as a result of autotransplantation. Constant replacement of dying cells by living ones shifts the cellular metabolism in the affected zone toward the normalization. It is based on the increase in expression of the constructional and regulatory proteins genes, genes of the enzymes synthesizing glycosaminoglycans, as well as proteases and hyaluronidases genes, specific for each of these types of biopolymers. In the af-

ected area in irradiated non-treated animals the expression of genes of collagen type I and III and elastin, which constitute the whole basis of collagen and elastin fibers in the skin derma, decreases continuously throughout the experiment and on the 35th day after irradiation almost vanishes.

In the similar manner, expression of genes of fibronectin, decorin and vinculin changes (Table 3). The first glycoprotein binds collagen fibrils which are being formed, and regulates the attaching of connective tissue cells to them (Miyamoto, 1998), the second one is the cytoskeleton protein, which together with the integral cell membrane protein participates in the formation of cell contacts with extracellular matrix, and the third protein regulates the correct assembly of collagen fibers formed (Reed, 2002).

Table 3

Effect of autotransplantation of fibroblasts and the mixture of fibroblasts and keratinocytes on the expression of genes of constructional and minor proteins which form the extracellular matrix in the area of radiation skin burn of guinea pigs (rflu/mg of tissue) × 10⁴

Days after irradiation	The irradiation and treatment of animals conditions		Protein and its gene					
			α1-chain of collagen type I	α1-chain of collagen type III	elastin	fibronectin	vinculin	decorin
			Col1α1	Col3α1	ELN	FN1	VCL	DCN
20	non-irradiated		432.4 ± 38.9	251.1 ± 62.7	246.2 ± 78.8	169.6 ± 1.6	121.6 ± 2.4	90.1 ± 8.4
	irradiated non-treated		2.3 ± 0.20 [#]	1.3 ± 0.30 [#]	1.3 ± 0.40 [#]	0.9 ± 0.01 [#]	0.3 ± 0.01 [#]	0.4 ± 0.04 [#]
	autotransplantation	fibroblasts	20.6 ± 1.8 [#]	19.2 ± 4.8 [#]	1.1 ± 0.30 [#]	0.7 ± 0.01 [#]	0.2 ± 0.01 [#]	0.3 ± 0.03 [#]
		fibroblasts and keratinocytes	355.2 ± 32.3 ^{##}	200.5 ± 51.1 ⁺	11.0 ± 3.5 ^{##}	85.6 ± 0.7 ^{##}	44.7 ± 0.7 ^{##}	52.0 ± 4.8 ^{##}
35	irradiated non-treated		1.8 ± 0.20 [#]	0.6 ± 0.10 [#]	0.4 ± 0.10 [#]	0.3 ± 0.01 [#]	0.1 ± 0.01 [#]	0.2 ± 0.01 [#]
	autotransplantation	fibroblasts	45.8 ± 4.1 [#]	28.2 ± 7.1 [#]	27.7 ± 8.8 [#]	23.4 ± 0.2 [#]	10.2 ± 0.2 [#]	12.5 ± 1.2 [#]
		fibroblasts and keratinocytes	548.3 ± 49.9 ^{##}	260.8 ± 66.5 ⁺	186.2 ± 59.6 ^{##}	136.9 ± 1.2 ^{##}	71.5 ± 1.2 ^{##}	83.2 ± 7.8 ⁺

Note: see table 2.

Similarly, in the burn area in irradiated non-treated animals on the 35th day after irradiation, expression of genes of hyaluronan synthases 1, 2 and 3, synthesizing hyaluronic acid of small, medium, and high weight, respectively, decreases (Table 4).

Thus autotransplantation of only fibroblasts even on the 35th day after irradiation of animals increases the expression

of genes of matrix proteins compared to normal only in the range of 8–13%, and expression of hyaluronan synthases genes, on average, is 16.5%. At the same time, autotransplantation with the mixture of fibroblasts and keratinocytes already on the 20th day after irradiation of animals significantly increases the gene expression of matrix proteins. For both types of collagen, it is 80% and for the minor regulatory

proteins lies in the range of 40–55% of the expression of the corresponding genes in the intact animals. On the 35th day after irradiation of animals the gene expression of collagen type I is greater than the norm 27%, the genes of collagen

type III and decorin correspond to norm, and expression of genes of elastin, fibronectin, and vinculin represent 76%, 80% and 42% of the expression of these genes in non-irradiated animals.

Table 4

Effect of autotransplantation of fibroblasts and the mixture of fibroblasts and keratinocytes on the expression of genes of hyaluronan synthases in the area of radiation skin burn of guinea pigs (rfu/mg of tissue)×10⁴

Days after irradiation	The irradiation and treatment of animals conditions		Enzyme and its gene		
			hyaluronan synthase 1	hyaluronan synthase 2	hyaluronan synthase 3
			HAS1	HAS2	HAS3
	non-irradiated		58.9 ± 3.2	58.6 ± 3.2	51.4 ± 2.7
20	irradiated non-treated		0.3 ± 0.01 [#]	0.3 ± 0.02 [#]	0.3 ± 0.01 [#]
	autotransplantation	fibroblasts	0.2 ± 0.01 [#]	0.19 ± 0.01 [#]	0.16 ± 0.01 [#]
		fibroblasts and keratinocytes	42.5 ± 2.2 ^{##}	42.6 ± 2.3 ^{##}	40.4 ± 2.1 ^{##}
35	irradiated non-treated		0.10 ± 0.006 [#]	0.10 ± 0.006 [#]	0.09 ± 0.005 [#]
	autotransplantation	fibroblasts	9.6 ± 0.5 [#]	9.5 ± 0.5 [#]	8.8 ± 0.4 [#]
		fibroblasts and keratinocytes	68.0 ± 3.6 ^{##}	68.1 ± 3.7 ^{##}	64.8 ± 3.5 ^{##}

Note: see table 2.

The change in gene expression of hyaluronan synthase in the area of burn during autotransplantation with the mixture of fibroblasts and keratinocytes looks similar. Thus, on the 20th day after irradiation of animals expression of these genes makes on average 74% compared to the norm, and on the 35th day exceeds it on average of 18%. Naturally, disorders of metabolism of extracellular matrix biopolymers in the radiation burn area are not only about the change in the expression of genes that determine production of these biopolymers, but also the genes of proteases and hyaluronidases, determining their disintegration.

Matrix metalloproteinases are essential in wound healing. By destroying the extracellular matrix and intercellular communications, they contribute to cell migration in reparation process. By interacting with cytokines, adhesion molecules of immune cells and receptors for signaling molecules, and by cleaving these molecules, they are involved in the regulation of inflammatory processes. Metalloproteinases regulate keratinocyte proliferation and differentiation of other cell types involved in scars resorption (Birkedal-Hansen, 1993; Parks, 2004). Similar role in the matrix restructuring during wound healing is performed by hyaluronidases (Meyer, 1971).

Table 5 shows the results of the measurement of gene expression of matrix metalloproteinases and hyaluronidase in normal skin of control animals and in the area of skin burn of irradiated non-treated animals and those treated with both types of autotransplantation. As is evident, changes of gene expression of all these enzymes in the burn zone, both on the 20th and on the 35th day after irradiation using both types of autotransplantation are parallel to the corresponding changes of the expression of the structural and minor biopolymers. On the 35th day after irradiation during the autotransplantation of the mixture of fibroblasts and keratinocytes, the expression of genes MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP9 and hyaluronidase in the burn exceeds the corresponding expression of these genes in non-irradiated animals 2.5, 1.8, 1.2, 1.8 and 2.8 times.

Under the same conditions the gene expression of collagen type I and hyaluronan synthases exceeds the norm as well (Tables 3 and 4), which may cause the development of scar tissue in the healing wound. All of this indicates the existence of positive feedback, which is coordinating changes in gene expression of the structural biopolymers and their proteases and hyaluronidases genes during the process of tissue therapy with the mixture of fibroblasts and keratinocytes.

Table 5

Effect of autotransplantation of fibroblasts and the mixture of fibroblasts and keratinocytes on the expression of genes of matrix metalloproteinases (MMP) and hyaluronidase (HYLA) in the area of radiation skin burn of guinea pigs (rfu/mg of tissue)×10⁴

Days after irradiation	The irradiation and treatment of animals conditions		Enzyme and its gene					
			MMP1	MMP2	MMP3	MMP7	MMP9	HYLA
			non-irradiated		32.6 ± 1.8	40.3 ± 2.2	58.4 ± 3.1	40.5 ± 2.2
20	irradiated non-treated		0.17 ± 0.01 [#]	0.2 ± 0.01 [#]	0.3 ± 0.01 [#]	0.2 ± 0.01 [#]	0.16 ± 0.01 [#]	0.2 ± 0.01 [#]
	autotransplantation	fibroblasts	0.07 ± 0.003 [#]	0.1 ± 0.006 [#]	0.2 ± 0.01 [#]	0.1 ± 0.006 [#]	0.05 ± 0.003 [#]	0.1 ± 0.005 [#]
		fibroblasts and keratinocytes	44.6 ± 2.5 ^{##}	6.2 ± 2.5 ⁺	42.4 ± 2.2 ^{##}	46.2 ± 2.5 ⁺	44.7 ± 2.55 ^{##}	46.7 ± 2.5 ^{##}
35	irradiated non-treated		0.06 ± 0.003 [#]	0.07 ± 0.003 [#]	0.1 ± 0.006 [#]	0.07 ± 0.004 [#]	0.04 ± 0.002 [#]	0.07 ± 0.004 [#]
	autotransplantation	fibroblasts	6.9 ± 0.3 [#]	7.7 ± 0.4 [#]	9.4 ± 0.5 [#]	7.7 ± 0.4 [#]	6.6 ± 0.3 [#]	7.6 ± 0.4 [#]
		fibroblasts and keratinocytes	81.4 ± 4.6 ^{##}	73.8 ± 4.1 ^{##}	68.9 ± 3.7 ^{##}	73.8 ± 4.06 ^{##}	81.6 ± 4.6 ^{##}	84.8 ± 4.6 ^{##}

Note: see table 2.

Our findings indicate that both types of autotransplantation result in two interacting mechanisms – this is, firstly, the

inhibition of the radiation burn development and radiation ulcer formation, and, secondly, the intensification of the

reparation processes. The efficiency of therapeutic properties of auto-fibroblasts and keratinocytes mixture is higher than the efficiency of fibroblasts only. Of course, one reason for this is that total number of cells is approximately 1.5 times larger in each injection of mixture. Another reason is the production by keratinocytes of factors, which are biologically active to other types of cells. Of no less importance is the reason of higher efficiency of the auto-fibroblasts and keratinocytes mixture explained by their synergetic interaction in the processes of morphogenesis and skin damage reparation. The basis for this synergy is the system of positive feedbacks between these cells. Thus, both fibroblasts and keratinocytes produce growth factors and cytokines, which mutually stimulate each other to proliferate and synthesize the biologically active compounds which are necessary for interaction with other cell types (Boxman, 1993; Blomme, 1999; Marchese, 2001; Werner, 2007; Lee et al., 2013). All of this is well illustrated by the data in Table 6.

Gene expression of transforming growth factor α , which is synthesized by keratinocytes, and when included in the process of proliferation, stimulates the regeneration of tissues and wound healing (Coffey, 1995; Boilly et al., 2000; Vogel-Höpker et al., 2000; Pehlivan, 2001; Dörr et al., 2002; Pral et al., 2002), and on the 20th and 35th day after irradiation in the area of the burn is very low. Administration of auto-fibroblasts does not alter anything. But the administration of

mixture of auto-fibroblasts and auto-keratinocytes already on the 20th day after irradiation increases the expression of this gene as compared with the norm by 15%, and on 35th day – by 210%. The more demonstrative is the situation with fibroblast growth factors 1, 2 and 8. The first two stimulate the growth of blood vessels, proliferation of fibroblasts and the filling of the wound with granulation tissue during the healing process. The last one, except for participation in angiogenesis, stimulates the expression of matrix metalloproteinases and degradation of the extracellular matrix, as a consequence, cell migration in the wound increases (Finklestein and Plomaritoglou, 2001). In the burn area of irradiated non-treated animals the gene expression of fibroblast growth factors is extremely low both on the 20th and on the 35th day of observation. Administration of auto-fibroblasts only on the 35th day just slightly increases their expression on average by 17.5%. At the same time, the administration of the mixture of auto-fibroblasts and auto-keratinocytes enhances gene expression of fibroblast growth factors 1, 2, 8 on the 20th day after irradiation by 61%, 80% and 76%, and on 35th day – on average by 123%.

The essential role of fibroblasts and keratinocytes interaction in raising the therapeutic efficiency of their mixture compared to the action of fibroblasts only is indicated with the investigated biochemical parameters of inflammation (Table 7).

Table 6

Effect of autotransplantation of fibroblasts and the mixture of fibroblasts and keratinocytes on the expression of genes of transforming growth factor α and fibroblast growth factors in the area of radiation skin burn of guinea pigs, (rfu/mg of tissue) $\times 10^4$

Days after irradiation	The irradiation and treatment of animals conditions		Growth factors and their genes			
			TGF α	FGF1	FGF2	FGF8
20	non-irradiated		40.7 \pm 3.8	79.1 \pm 7.3	69.0 \pm 6.4	54.7 \pm 5.2
	irradiated non-treated		0.2 \pm 0.02 [#]	0.4 \pm 0.04 [#]	0.4 \pm 0.03 [#]	0.3 \pm 0.03 [#]
	auto-trans-plantation	fibroblasts	0.10 \pm 0.01 [#]	0.30 \pm 0.02 [#]	0.25 \pm 0.02 [#]	0.18 \pm 0.02 [#]
		fibroblasts and keratinocytes	47.0 \pm 4.4 ⁺	48.6 \pm 4.5 ^{#+}	55.0 \pm 5.1 ^{#+}	41.4 \pm 3.9 ^{#+}
35	irradiated non-treated		0.07 \pm 0.01 [#]	0.13 \pm 0.01 [#]	0.13 \pm 0.01 [#]	0.10 \pm 0.01 [#]
	auto-trans-plantation	fibroblasts	7.7 \pm 0.7 [#]	11.5 \pm 1.07 [#]	13.5 \pm 1.2 [#]	9.1 \pm 0.8 [#]
		fibroblasts and keratinocytes	85.2 \pm 8.1 ^{#+}	88.8 \pm 8.2 ^{#+}	88.0 \pm 8.1 ^{#+}	66.2 \pm 6.2 ^{#+}

Note: see table 2.

Table 7

Effect of autotransplantation of fibroblasts and the mixture of fibroblasts and keratinocytes on the expression of genes of pro- and anti-inflammatory cytokines in the area of radiation skin burn of guinea pigs on the 20th day after irradiation (rfu/mg of tissue) $\times 10^4$

The irradiation and treatment of animals conditions		Cytokines and their genes		
		pro-inflammatory	anti-inflammatory	
		IL-1 β	IL10	TGF β 1
non-irradiated		61.0 \pm 5.7	62.4 \pm 6.9	44.6 \pm 11.6
Irradiated non-treated		81.8 \pm 7.6 [#]	40.3 \pm 4.4 [#]	0.24 \pm 0.06 [#]
Autotransplantation	fibroblasts	81.1 \pm 7.6 [#]	45.2 \pm 5.0 [#]	0.18 \pm 0.04 [#]
	fibroblasts and keratinocytes	60.1 \pm 5.6 ⁺	66.3 \pm 7.3 ⁺	48.4 \pm 12.6 ⁺

Note: see table 2.

Thus, on the 20th day after the irradiation of animals, the gene expression of pro-inflammatory cytokine – interleukin 1 β – in the burn area increases by 34% compared to the norm, what indicates the presence of inflammatory process in this area.

The administration of auto-fibroblasts into the burn within 20 days after irradiation of animals had no effect on this rate, but the administration of the mixture of auto-fibroblasts and

auto-keratinocytes completely normalized it. Thus interleukin 1 β – the classical inflammatory mediator – is synthesized by keratinocytes and fibroblasts (Gabay, 2010).

These two methods of autotransplantation similarly affect gene expression of pro-inflammatory cytokine – interleukin 10 and transforming growth factor- β 1. In both cases, on the 20th day after irradiation of animals the expression of these

genes in the burn area is reduced compared to the norm, what indicates the presence of inflammation. Complete normalization of expression occurs only after 20-day administration of the mixture of auto-fibroblasts and auto-keratinocytes into the burn.

Conclusions

The daily 4.5-week volumetric autotransplantation of both fibroblasts and mixture of fibroblasts and keratinocytes into the area of local X-ray 3rd-degree skin burn in guinea pigs which is launched in 1 hour after irradiation, significantly inhibits the destruction of connective tissue, increases the number of living cells, normalizes biopolymer composition of connective tissue matrix in the burn zone, inhibits the inflammatory process, largely prevents the formation, development and growth of the radiation burn and radiation ulcer, and eventually leads to disappearance of the ulcer and to almost complete healing of burn.

This is based on the impact of autotransplantation leading to increased levels of gene expression of structural biopolymers and regulatory proteins in the radiation injury zone.

Therapeutic efficiency of autotransplantation of the mixture of fibroblasts and keratinocytes is significantly higher compared to the autotransplantation of fibroblasts only.

The reasons for it are both the number of living cells regularly replacing dead cells in the burn zone which is greater than the total and mutual stimulation of auto-fibroblasts and auto-keratinocytes to proliferate and synthesize biologically active substances – cytokines and growth factors, which induce tissue regeneration and healing of burn wound.

References

Altuhova, L.V., Gricenko, M.A., Kot, E.V., Kot, J.G., Persky, E.J., 2013. Normalizacija sodержanija soedinitel'notkannyh kletok i strukturnyh biopolimerov mezhkletechnogo matriksa v zone lokal'nogo lucheвого ozhoga kozhi obemnoj transplantaciej autofibroblastov [Normalization of connective tissue cells and extracellular matrix structural biopolymers in the area of skin local radiation burn by volumetric autofibroblasts transplantation]. *Visnik Harkiv'skogo Nacional'nogo Universitetu Imeni V.N. Karazina, Serija Biologija* 18(1057), 5–8 (in Russian).

Arrayit, 2015. Complete Protocol for Arrayit DNA chip. Retrieved from URL http://arrayit.com/Products/DNA_Microarrays/DNA_Microarrays_DCH/dna_microarrays_dch.html

Benderitter, M., Gourmelon, P., Bey, E., Chapel, A., Clairand, I., Prat, M., 2010. New emerging concepts in the medical management of local radiation injury. *Health Phys.* 98, 851–857.

Birkedal-Hansen, H., 1993. Matrix metalloproteinases: A review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 4(2), 197–250.

Blomme, E.A., 1999. Parathyroid hormone-related protein is a positive regulator of keratinocyte growth factor expression by normal dermal fibroblasts. *Mol. Cell Endocrinol.* 152(12), 189–197.

Boilly, B., Vercoutter-Edouart, A.S., Hondermarck, H., Nurcombe, V., Le Bourhis, X., 2000. FGF signals for cell proliferation and migration through different pathways. *Cytokine Growth Factor Rev.* 11(4), 295–302.

Boxman, I., 1993. Modulation of IL-6 production and IL-1 activity by keratinocyte-fibroblast interaction. *J. Invest. Dermatol.* 101(3), 316–324.

Bushmanov, A.Y., Eremin, I.I., Moroz, B.B., Galstjan, I.A., Nadezhina, N.M., Slobodina, T.S., Grinakovskaja, O.S., 2012. Opyt sovremennogo lechenija luchevyh ozhogov u lic, podvergovavshijsja vozdejstvuju ionizirujushhego izlucheniya [Experience of modern treatment of radiation burns in persons exposed to ionizing radiation]. *Occupational Medicine and Industrial Ecology* 10, 20–27 (in Russian).

Coffey, R., 1995. Basic actions of transforming growth factor- α and related peptides. *Eur. J. Gastroen. Hepat.* 7, 923–931.

Dörr, W., Spek, K., Farre, C.L., 2002. The effect of keratinocyte growth factor on healing of manifest radiation ulcers in mouse tongue epithelium. *Cell Prolif.* 35(Suppl. 1), 86–92.

Eldashov, S.V., 2013. Jeksperimental'noe obosnovanie sovremennyh metodov hirurgicheskogo lechenija sochetannyh luchevyh porazhenij [Experimental study of modern methods of surgical treatment of combined radiation injuries]. St. Petersburg (in Russian).

ETS No. 170, 1998. Protocol of amendment to the European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes, Strasbourg, Retrieved from URL www.echr-base.ru/CED170.jsp

Finklestein, S., Plomaritoglou, A., 2001. Growth factors. Head trauma: Basic, preclinical, and clinical directions. New York, Wiley, 165–187.

Gabay, C., 2010. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* 6, 232–241.

Gerasimova, L.I., Nazarenko, G.I., 2005. Termicheskie i radiatsionnie ozhogy [Thermic and radiation burn]. Medicine, Moscow (in Russian).

Glantz, S.A., 2007. Primer of Biostatistics, 4th Edition. McGraw-Hill, New York.

Groeber, F., Holeiter, M., Hampel, M., Hinderer, S., Schenke-Layland, K., 2012. Skin tissue engineering – *in vivo* and *in vitro* applications. *Clin. Plast. Surg.* 39, 33–58.

Hatzistergos, K.E., Blum, A., Ince, T.A., Grichnik, J.M., Hare, J.M., 2011. What is the oncologic risk of stem cell treatment for heart disease. *Circ. Res.* 108, 1300–1303.

Haubner, F.K., Ohmann, E., Pohl, F., Strutz, J., Gassner, H.G., 2012. Wound healing after radiation therapy. Review of the literature. *Radiat. Oncol.* 7, 162–170.

Herberts, C.A., Kwa, M.S.G., Hermsen, H.P.H., 2011. Risk factors in the development of stem cell therapy. *J. Transl. Med.* 9, 29–42.

Histomix, 2008. Protokol obrabotki soedinitel'noj tkani v parafinovyh srezah dlja okrashivaniya alcianovym sinim [The protocol of processing of connective tissue in paraffin sections for Alcian blue staining]. Retrieved from URL www.histomix.ru/product_4.html.

Histomix, 2010. Protokol obrabotki soedinitel'noj tkani v parafinovyh srezah dlja okrashivaniya po Van-Gizonu [The protocol of processing of connective tissue in paraffin sections for Van Gieson staining]. Retrieved from URL www.histomix.ru/product_5.html.

Histomix, 2012. Protocol of processing of connective tissue in paraffin sections with hematoxylin and eosin. Retrieved from URL www.histomix.ru/product_17.html.

Histopathology, 2013. Gistohimicheskaja identifikacija uglevodov [Histochemical identification of carbohydrates]. Retrieved from URL www.histopathology.narod.ru/documents/gistohimija_uglevodov.html.

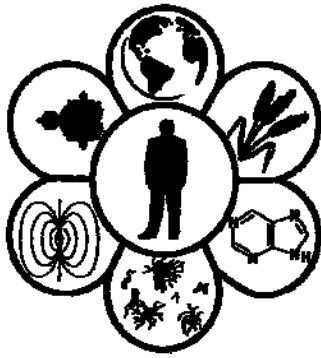
Huang, L., Burd, A., 2012. An update review of stem cell applications in burns and wound. *Care. Indian J. Plast. Surg.* 45(2), 229–236.

Imaris, 2011. Imaris for Cell Biologists. Retrieved from URL www.bitplane.com/Imaris/Imaris-for-cell-biologists.

Invitrogen, 2015. Tools for hybridization experiments in SecureSeal™ Hybridization Chambers. Retrieved from URL www.tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp18200.pdf.

- Keller, G., 2000. Sohrannost' ineciruemyh autologichnyh chelovecheskih fibroblastov [Safety of injectable autologous human fibroblasts]. *Bjul. Jeksp. Biol. Med.* 130(8), 203–206.
- Kligunenko, E.N., Leshhev, D.P., Slesarenko, S.V., Slinchenkov, V.V., Sorokina, E.J., 2005. Intensivnaja terapija ozhogovoj bolezni [Intensive therapy of burn disease]. *MEDpress-inform*, 144.
- Kot, J.G., Kot, E.V., Perskij, E.J., Polikarpova, A.V., Altuhova, L.V., 2013. Tormozhenie razvitija lokal'nogo lucheвого ozhoga objomnoj autotransplantacij fibroblastov [Inhibition of local radiation burn development by volume fibroblast autotransplantation]. *Dopovidi Nacional'noi Akademii Nauk Ukraini. Matematika, Prirodoznavstvo, Tehnichni Nauki* 4, 144–147 (in Russian).
- Laboratornaja Diagnostika, 2015. Immunologija, belki ostrogo fazy vospalenija [Immunology, acute phase proteins of inflammation]. Retrieved from URL www.ld.ru/IFA/ilist-14.html.
- Lee, S.H., Jin, S.Y., Song, J.S., Seo, K.K., Cho, K.H., 2012. Paracrine effects of adipose-derived stem cells on keratinocytes and dermal fibroblasts. *Ann. Dermatol.* 24, 136–143.
- Marchese, C., 2001. Fibroblast growth factor 10 induces proliferation and differentiation of human primary cultured keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 116(4), 623–628.
- Marionnet, C., Pierrard, C., 2006. Interactions between fibroblasts and keratinocytes in morphogenesis of dermal epidermal junction in a model of reconstructed skin. *J. Invest. Dermatol.* 126, 971–979.
- Meyer, K., 1971. Hyaluronidases. In: *The Enzymes*. Academic Press, NY. 5, 307–320.
- Miyamoto, S., 1998. Fibronectin and integrins in cell adhesion, signaling, and morphogenesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 857, 119–129.
- Paramonov, B.A., Poremskij, J.O., Jablonskij, V.G., 2000. Ozhogi: Rukovodstvo dlja vrachej [Burns: Guide for physicians]. *Speclit, St. Petersburg* (in Russian).
- Parks, W.C., 2004. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 4(8), 617–629.
- Pehlivan, T., Mansour, A., Spaczynski, R.Z., Duleba, A.J., 2001. Effects of transforming growth factors-alpha and -beta on proliferation and apoptosis of rat theca-interstitial cells. *J. Endocrinol.* 170(3), 639–645.
- Prault, C.A., Ford, B.C., Leach, R.M., 2002. Effect of fibroblast growth factors 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, and 10 on avian chondrocyte proliferation. *J. Cell Biochem.* 84(2), 359–366.
- Qiagen, 2013. Qiagen® RNeasy FFPE Handbook. Manual for purification of total RNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. Retrieved from URL www.qiagen.com/ru/resources.
- Qiagen, 2015. QIAGEN® OneStepRT-PCR Handbook. Manual for fast and highly sensitive one-step RT-PCR. Retrieved from URL www.qiagen.com/ru/resources.
- Reed, C.C., 2002. The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis. *Glycoconjugate J.* 19(4–5), 249–255.
- Rennekampff, H., Kiessig, V., Griffey, S., 1997. Acellular human dermis promotes cultured keratinocyte engraftment. *J. Burn Care Rehabil.* 6, 535–544.
- Rittié, L., 2005. Isolation and culture of skin fibroblasts. *Methods Mol. Med.* 117, 83–98.
- Rowan, M.P., Cancio, L.C., Elster, E.A., Burmeister, D.M., Rose, L.F., Natesan, S., Chan, R.K., Christy, R.J., Chung, K.K., 2015. Burn wound healing and treatment: Review and advancements. *Critical Care* 19, 243–249.
- Ryan, J.L., 2012. Ionizing radiation: The good, the bad, and the ugly. *J. Invest. Dermatol.* 132, 985–993.
- Shapovalov, S.G., 2005. Sovremennye raneve pokrytija v kombustologii [Modern wound cover in combustiology]. *Farm Mindeks-praktik* 8, 38–46 (in Russian).
- Shaw, A.J., 1996. *Epithelial cell culture – A practical approach*. Oxford University Press, Oxford, 179–200.
- Takagi, R., Yamato, M., Murakami, D., Kondo, M., Yang, J., Ohki, T., 2011. Preparation of keratinocyte culture medium for the clinical applications of regenerative medicine. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 5, 63–73.
- Tenenhaus, M., Rennekampff, H.O., 2007. Burn surgery. *Clin. Plast. Surg.* 34(4), 697–715.
- Teng, M., Huang, Y., Zhang, H., 2014. Application of stems cells in wound healing. *Wound Repair Regen.* 22(2), 151–160.
- Varani, J., Perone, P., 2007. Human skin in organ culture and human skin cells (keratinocytes and fibroblasts) in monolayer culture for assessment of chemically induced skin damage. *Toxicol. Pathol.* 35, 355–372.
- Vogel-Höpker, A., Momose, T., Rohrer, H., Yasuda, K., Ishihara, L., Rapaport, D.H., 2000. Multiple functions of fibroblast growth factor-8 (FGF-8) in chick eye development. *Mech. Dev.* 94(1–2), 25–36.
- Werner, S., Krieg, T., Smola, H., 2007. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J. Invest. Dermatol.* 127(5), 998–1008.
- Yim, H., Cho, Y.S., Seo, C.H., Lee, B.C., Ko, J.H., Kim, D., 2010. The use of AlloDerm on major burn patients: AlloDerm prevents post-burn joint contracture. *Burns* 36, 322–328.

Надійшла до редколегії 18.09.2015



УДК 575.15

Популяції Закарпаття і Буковини на генетическому фоні оточуючих територій

О.М. Утевская¹, М.И. Чухряева², А.Т. Агджоян³,
Л.А. Атраментова¹, Е.В. Балановская², О.П. Балановский³

¹Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, Харьков, Украина

²ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва, Россия

³Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

Изучена генетическая структура Закарпатской и Черновицкой популяций украинцев по SNP маркерам нерекombинирующей части Y хромосомы. В Закарпатье с частотами более 5% встречались следующие гаплогруппы Y хромосомы: R1a1a1*(M198), I2a (P37.2), R1a1a1g (M458), E1b1b1a1 (M78). В Черновицкой области спектр мажорных гаплогрупп был иной: с частотами более 5% встречались гаплогруппы I2a (P37.2), R1a1a1*(M198), R1a1a1g (M458), R1b1b2 (M269), E1b1b1a1 (M78), I1 (M253), суммарно составляя около 90% Y-хромосомного генофонда. Черновицкая популяция отличается от типичных популяций украинцев высокой частотой гаплогруппы I2a (P37.2) и пониженной частотой гаплогруппы R1a (M198). Такие генетические особенности, по-видимому, сформировались за счет включения генетических компонентов соседних молдаван и румын. Несмотря на краевое положение в этническом украинском ареале и на сложную демографическую историю, обе популяции – Черновицкая и Закарпатская – по маркерам Y хромосомы образуют единую область генетического сходства с остальными украинскими популяциями и являются частью цельного украинского генофонда. Карпаты являются географическим барьером для распространения ряда гаплогрупп Y хромосомы на территории Восточной Европы. Они ограничивают поток N1c (M178) и R1a (M198) с северо-востока и распространение E1b (M78), R1b (M269), J (M304) и G (M201) с юго-запада.

Ключевые слова: украинцы; SNP маркеры; Y хромосома; гаплогруппы; генетические расстояния

Populations of Transcarpathia and Bukovina on the genetic landscape of surrounding regions

О.М. Utevska¹, М.И. Chukhraeva², А.Т. Agdzhoyan³, Л.А. Atramentova¹, Е.В. Balanovska², О.П. Balanovsky³

¹V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

²Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia

³Vavilov Institute for General Genetics, Moscow, Russia

The territory of present-day Ukraine is subdivided into some regions with specific demographic and politic history. Nevertheless, the corresponding subdivision in genetic structure is not revealed in previous investigations: populations of Ukrainians under study were genetically homogeneous on SNP markers of Y chromosome. In the current investigation we studied the Y-chromosomal genetic structure of Transcarpathia and Bukovina populations. Several factors exist to expect the genetic specificity of these populations. Both ones are placed in the Carpathian foothills, at the south-western border of the Ukrainian area. During the last millennium these territories were the parts of different states and were open for ethnically diverse migrations. It was revealed that the major Y chromosomal haplogroups in

Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, 61022, Украина
V.N. Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, 61022, Ukraine
Tel.: +38-057-707-54-52. E-mail: outevsk@yandex.ua

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», ул. Москворечье, 1, Москва, 115478, Россия
Research Centre for Medical Genetics, Moskvorechie, 1, Moscow, 119991, Russia

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, ул. Губкина, 3, Москва, 119991, ГСП-1, Россия
Vavilov Institute of General Genetics RAS, Gubkin Str., 3, Moscow, 115478, Russia

Transcarpathia population were R1a1a1*(M198), I2a (P37.2), R1a1a1g (M458), E1b1b1a1 (M78). The major haplogroups in Bukovina population were I2a (P37.2), R1a1a1*(M198), R1a1a1g (M458), R1b1b2 (M269), E1b1b1a1 (M78), I1 (M253). The Bukovina population differs from the typical Ukrainian population by higher frequency of I2a (P37.2) and lower frequency of R1a1a1*(M198). Moreover, this is the only population among ones studied in Ukraine where the most frequent haplogroup is I2a (P37.2) but not R1a1a1*(M198). Such a deviation can be caused by possible mixing with neighbouring southern groups, and Carpathian mountains were not a border for exchange in this case. Interestingly, the haplogroup N1c (M178) is not revealed in Transcarpathia at all, obviously due to the mountain barrier. It was revealed by principal component analysis that Ukrainians from Transcarpathia and Bukovina despite some specific peculiarities are more similar to other Ukrainian populations than to the surrounding ethnic groups such as Poles, Slovaks, Hungarians, Romanians, Moldavians and Gagauzes. Ukrainians of Transcarpathia and Bukovina form the entire genetic continuum with the whole Ukraine on maps of gene distances, confirming the homogeneity of Ukrainian parental gene pool and it's differentiation from other groups. After performing the analysis of Y-haplogroup spatial distribution, it is supposed that the northern ridges of Carpathian mountains are the East-European barrier decreasing the gene flow. It decreases the spreading of haplogroups N1c (M178) and R1a (M198) southward and movement of E1b (M78), R1b (M269), J (M304) and G (M201) northward.

Keywords: Ukrainians; SNP markers; Y chromosome; haplogroups; Nei distances

Введение

Территория Украины включает ряд исторических областей, каждая из которых имеет собственную, иногда крайне сложную, историю. Соответственно, разные области характеризуются различными демографическими, миграционными и прочими процессами, оказывающими влияние на популяционную генетическую структуру. Теоретически можно ожидать, что центральные и приграничные, западные и восточные, лесные и степные регионы будут иметь и разные характеристики генофондов. Однако ранее нами было показано, что по генетическому полиморфизму Y хромосомы популяции коренных этнических украинцев генетически очень гомогенны на всем протяжении Украины. Не существует корреляции между географическим расстоянием и спектром Y-хромосомных гаплогрупп. Среди украинских популяций не выделяются крупные географические подразделения, такие как, например, восточные и западные украинцы (Utevska et al., 2013a). Наоборот, украинский генофонд образует цельную группу, дифференцированную от остальных славянских этносов, хотя и очень близкую к русским, белорусам, полякам и словакам (Har'kov et al., 2004; Utevska et al., 2015; Kushniarevich et al., 2015).

Тем не менее, интерес для отдельного исследования представляют краевые популяции украинцев, локализованные в районе Украинских Карпат – в Закарпатье (Закарпатская область) и на Буковине (Черновицкая область). Территория современной Черновицкой области Украины последнее тысячелетие входила в состав целого ряда политических образований – Древнерусского государства (X–XI вв.), Галицко-Волынского княжества (XII–XIII вв.), княжества Молдовы (XIV–XVI вв.), Османской империи (с XVI в.), Австро-Венгрии (с XVIII в.), Румынии (н. XX в.). Аналогично, территория Закарпатье также являлась частью многих государств – Великой Моравии (IX в.), Галицко-Волынского княжества (XII–XIII вв.), Венгерского королевства (с XIII в.), Трансильвании (XVI–XVIII вв.), Австро-Венгрии (с XVIII в.).

Существует несколько оснований ожидать, что генофонд украинцев в указанных областях будет отличен от основной популяции. Кроме частой смены политико-административных границ, области находятся в зоне контакта с соседними этносами. Несмотря на то, что основной группой в указанных областях являются украинцы, этнический состав в целом подвержен приграничным миграциям и включает также высокий процент ру-

мын и венгров. Кроме того, горные районы обычно отличаются по характеру демографических потоков от равнинных территорий, часто играют роль физических барьеров, нередко способствуют развитию изоляции и эндогамии.

Мы провели детальное исследование генетической структуры Закарпатской и Черновицкой популяций украинцев с использованием маркеров нерекombинирующей части Y хромосомы, позволяющих проследить отцовские линии в эволюции генофонда (Underhill et al., 2001; Jobling and Tyler-Smith, 2003). Этот генетический маркер наследуется сыном от отца без рекомбинаций, и вся изменчивость по нему является только мутационной, что позволяет восстановить филогенетическое дерево Y-хромосомных вариантов – гаплогрупп (Karafet et al., 2008). Маркеры Y хромосомы в четыре раза более чувствительны к снижению эффективного размера популяции, чем аутосомные маркеры, и чаще претерпевают последствия генетического дрейфа (Chiaroni et al., 2009). Последнее во многом определяет хорошую кластеризацию современных популяций, отличающихся по набору Y-родословных настолько, что можно дифференцировать отдельные этносы (Barbujani and Bertorelle, 2001; Novelletto, 2007), устанавливать внутриэтническую подразделенность (Balanovsky et al., 2008), проследить миграционные потоки (Perić et al., 2005; Lappalainen et al., 2008; Yunusbayev et al., 2012). Y-хромосомный полиморфизм славян (Perić et al., 2005; Woźniak et al., 2010; Kushniarevich et al., 2015), народов Кавказа (Balanovsky et al., 2011; Yunusbayev et al., 2012), румын, венгров, молдаван, гагаузов и других европейских народов (Kayser et al., 2008; Völgyi et al., 2009; Rebala et al., 2013; Varzari et al., 2013) уже исследован на высоком уровне, что позволяет делать качественные сравнения.

Материал и методы исследований

Материалом для исследования были образцы ДНК из трех районных популяций Черновицкой и Закарпатской областей (табл. 1). Донорами биологических образцов были неродственные друг другу мужчины, этнические украинцы, коренные жители данного района, предки которых до третьего поколения также были украинцами и проживали в данном районе. Участие в исследовании было добровольным. Каждый донор подписал информированное согласие на проведение исследования.

Локализация исследованных популяций

Область	Объем выборки	Локализация	Широта	Долгота
Закарпатская	50	Ужгородский р-н, пгт Середне	48°32'	22°30'
Черновицкая	50	Кицманский р-н, г. Кицмань	48°26'	25°45'
Черновицкая	50	Вижницкий р-н, г. Вижица	48°15'	25°11'

Выделение ДНК из донорской крови проводили методом фенол-хлороформной экстракции. Генотипирование образцов по SNP-маркерам (Single Nucleotide Polymorphism – однонуклеотидный полиморфизм) Y-хромосомы проводили методом ПЦР в реальном времени (7900HT, Applied Biosystems) с набором TaqMan зондов на 33 SNP маркера Y-хромосомы (Applied Biosystems): M198, P37.2, M458, M269, M78, M253, M178, M217, M33, M2, M35, M201, M285, P15, P16, P18, M406, P303, M69, M170, M223, M267, P58, M172, M67, M92, M12, P43, M242, M207, M173, M297, M70. Каждому маркеру согласно классификации Международного консорциума по Y-хромосоме (Y-Chromosome Consortium, 2002), соответствует определенная гаплогруппа Y хромосомы. Классификация гаплогрупп Y-хромосомы и их соответствие маркерам приведены согласно правилам Международного общества генетической генеалогии ISOGG (www.isogg.org).

По итогам генотипирования для каждой популяции рассчитаны частоты гаплогрупп Y-хромосомы. Частотные распределения гаплогрупп в популяциях отражены с помощью круговых диаграмм. Сходство популяций по набору и частотам гаплогрупп исследовано методом главных компонент и методом кластерного анализа с использованием программного пакета Statistica 8.0. Для сопоставления использованы ранее опубликованные данные по соседним популяциям украинцев, белорусов, поляков, словаков, венгров, румын, молдаван и гагаузов (Kayser et al., 2008; Völgyi et al., 2009; Rebala et al., 2013; Varzari et al., 2013). Шкалирование и кластеризация выполнялись по данным о частотах таких гаплогрупп: R1a (M198), I (M170), R1b (M343), E1b (M35), J (M304) + G (M201), N1 (M231).

По частотам гаплогрупп рассчитаны попарные генетические расстояния d между популяциями (Nei, 1972):

$$d_{ij} = -\ln \frac{\sum_{a=1}^l p_{ai} \cdot p_{aj}}{\sqrt{\sum_{a=1}^l p_i^2 \sum_{a=1}^l p_j^2}},$$

где p_{ai} – частота гаплогруппы a в популяции i , p_{aj} – частота гаплогруппы a в популяции j , l – общее число гаплогрупп Y хромосомы, по которым идет сравнение. Для расчета генетических расстояний использованы частоты следующих гаплогрупп: E1b (M35), G (M201), I1 (M253), I2a (P37.2), J (M304), N1c (M178), R1b (M269), другие суммарно. Расчет генетических расстояний проведен в программе GDist (разработана в лаборатории популяционной генетики человека ФГБУ «МГНЦ» РАМН). Чтобы рассматривать популяции украинских Карпат на общем фоне генетической изменчивости Восточной Европы, все расчеты проведены в более широком масштабе, включающем другие европейские популяции. Для этого использована информация из базы данных Y-base (разработана в ФГБУ «МГНЦ» РАМН).

Генетические расстояния использованы для построения карт генетических расстояний в программе GeneGeo (Koshel, 2012). Карты построены на основании генетических расстояний, рассчитанных от реперных популяций до более чем 100 популяций Европы, Урала, Кавказа, Ближнего Востока.

Результаты и их обсуждение

Спектр и частоты гаплогрупп Y хромосомы

Спектр и частоты гаплогрупп Y хромосомы в изученных популяциях в целом являются характерными для генетического ландшафта юга Восточной Европы.

В популяциях Закарпатья с частотами от 30% до 14% встречались следующие четыре гаплогруппы Y хромосомы (в порядке убывания частот): R1a1a1*(M198), I2a (P37.2), R1a1a1g (M458), E1b1b1a1 (M78). Частоты гаплогрупп I1 (M253) и R1b1b2 (M269) составляли около 4% каждая. Перечисленные шесть Y-хромосомных линий составляют в общей сложности около 96% всего генофонда исследованной закарпатской популяции. Остальные гаплогруппы встречались с частотой менее 1%.

Спектр мажорных гаплогрупп в Черновицкой области был несколько иным. С частотами более 5% встречались гаплогруппы (в порядке убывания частот) I2a (P37.2), R1a1a1*(M198), R1a1a1g (M458), R1b1b2 (M269), E1b1b1a1 (M78), I1 (M253), суммарно составляя около 90% Y-хромосомного генофонда. Различия частотных распределений в обеих изученных популяциях Черновицкой области не были статистически значимы и в дальнейшем анализировались в виде объединенной популяции.

Рассмотрены также географические тенденции распределения Y-хромосомной изменчивости на окружающих территориях. Для этого анализировали ранее опубликованные данные по популяциям соседних этнических групп. В общем спектре изменчивости (рис. 1) заметно, что гаплогруппы в рассматриваемом регионе имеют широтные градиенты. С севера на юг резко падают частоты R1a (M198+M458) – наиболее представительной гаплогруппы в Восточной Европе; к ней относятся до 50% и даже больше генетических линий как в восточнославянских, так и западнославянских популяциях (Kushniarevich et al., 2015), однако южнее Карпат ее частоты уже понижены до 10–35% (Underhill et al., 2010). Украинские популяции здесь представляют промежуточный вариант, причем самые пониженные частоты R1a (около 30%) в Украине наблюдаются именно в Черновицкой области.

Аналогичный географический тренд – снижение частоты с севера на юг – обнаруживается для N1c (M178) – ярко выраженной мажорной гаплогруппы (до 35–80%) в генофондах финно-угорских народов, балтов, северных русских и других популяций северо-востока Европы

(Rootsi et al., 2007; Balanovsky et al., 2008). До Северного Причерноморья эта гаплогруппа доходит уже с пониженными (до 4–9%) частотами, однако в популяциях украинцев она входит в пятерку наиболее частых гаплогрупп (Mielnik-Sikorska et al., 2013; Utevska et al., 2013b, 2015; Kushniarevich et al., 2015). Вместе с тем, в

выборке из Закарпатской области не обнаружено ни одного носителя варианта N1c (M178). Также эта гаплогруппа практически отсутствует среди венгров и румын. Очевидно, Карпаты явились эффективным природным барьером на пути распространения N1c (M178) в юго-западном направлении.

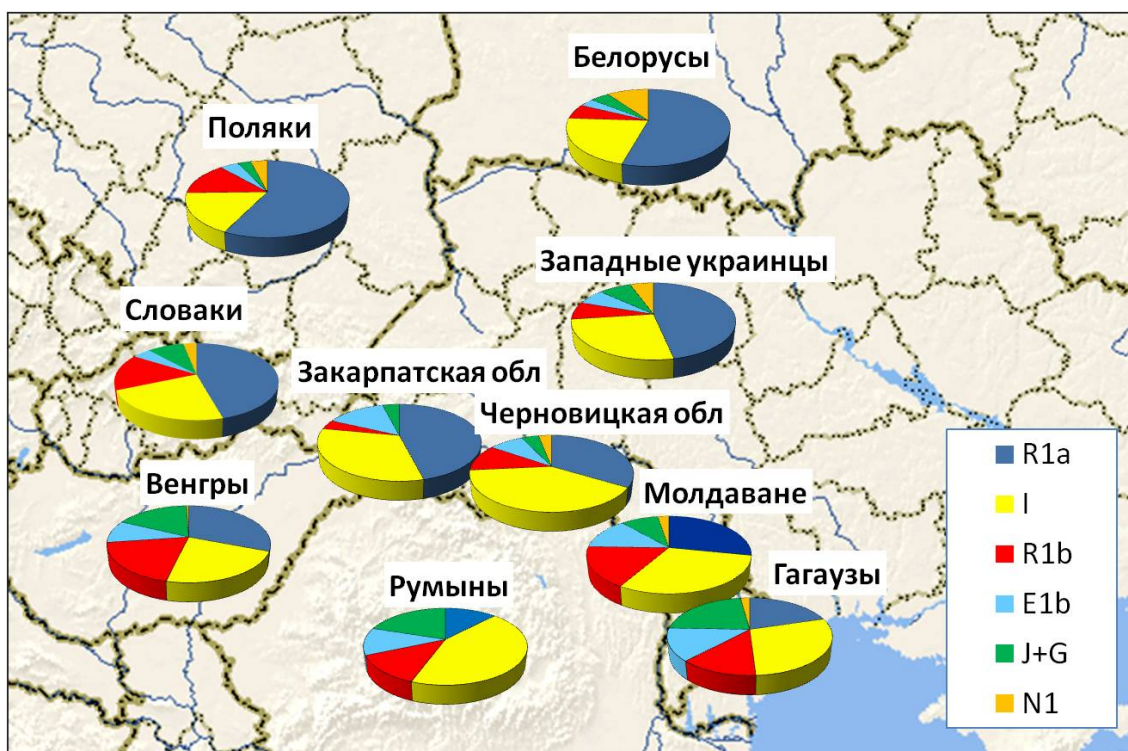


Рис. 1. Частотные распределения гаплогрупп Y хромосомы в популяциях юга Восточной Европы

Противоположную направленность – повышение частоты с севера на юг – имеет распространение гаплогруппы I2a (P37.2) (Underhill et al., 2007). Частоты этой гаплогруппы максимальны (до 60%) в некоторых балканских популяциях. В пределах рассматриваемого нами ареала эта гаплогруппа встречается с частотами порядка 25–35% среди румын, молдаван и украинцев, включая в том числе украинцев Закарпатской и Черновицкой областей. Черновицкая область – единственная из областей Украины, где частота I2a превышает частоту R1a. К юго-западу от Карпат чаще встречаются гаплогруппы E1b (M78), R1b (M269), J (M304) и G (M201), отражая исторические связи северо-западного Причерноморья и Карпатского региона с Балканами и Ближним Востоком (Stuciani et al., 2007; Myles et al., 2012; Rootsi et al., 2012).

Сходство популяций по Y хромосомным маркерам

Для оценки генетического сходства генофондов рассматриваемых популяций украинцев с генофондами соседних этнических групп проведен анализ главных компонент (рис. 2). Положение популяций на графике отражает взаимное генетическое сходство или генетическую отдаленность. Восточные и западные славяне (украинцы, белорусы, поляки, словаки) на графике образуют четкие этнические облака. Неславянские популяции Карпатского региона (венгры, молдаване, гагаузы, румыны) образуют собственную группировку, не дифференцированную на этнические кластеры. В целом славянские облака несколько отдалены от неславянского.

Украинские популяции Черновицкой и Закарпатской областей больше остальных приближены к неславянскому Карпатскому кластеру. Анализируя рисунок 2, можно сказать, что основную роль в дифференциации генофондов играет разделение популяций по лингвистической принадлежности – на славянские и неславянские. Во вторую очередь, на близости генофондов сказывается географическое соседство. Мы наблюдаем соответствие географии и генетики между кластерами восточных и западных славян, а также относительную генетическую однородность популяций Карпат, несмотря на то, что они относятся к совершенно разным языковым группам: венгры – к финно-угорской языковой семье, гагаузы – к тюркской, румыны и молдаване – к романской группе индоевропейских языков.

Кластерный анализ тех же популяций выявил несколько иную картину по сравнению с методом главных компонент (рис. 3). На классификационном дереве сформированы два главных кластера. В первый попали все неславянские популяции Карпат, во второй – только славяне. Однако популяция Черновицкой области оказалась в пределах первого кластера, обнаруживая аффилиацию к румынам и молдаванам. Вероятно, с этими популяциями Черновицкая область сближается за счет повышенных частот гаплогрупп I2a и R1b, а также пониженной частоты R1a (рис. 1). Славянский кластер, в свою очередь, разветвляется на два субкластера – преимущественно польский и украинно-белорусский.

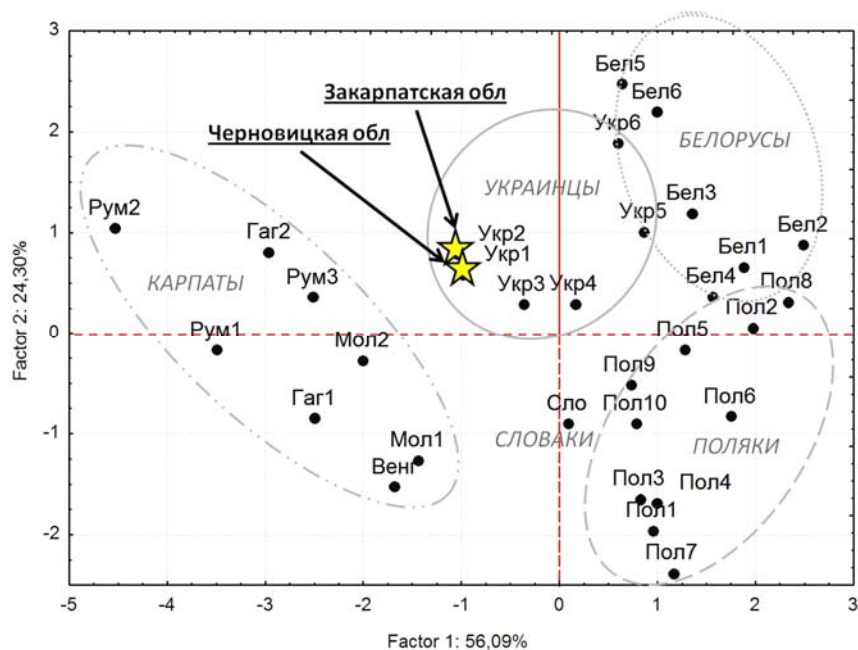


Рис. 2. Генетическое сходство популяций по гаплогруппам Y хромосомы, анализ главных компонент: украинцы: Укр1 – Черновицкая обл., Укр2 – Закарпатская обл., Укр3 – Ивано-Франковская обл., Укр4 – Львовская обл., Укр5 – Хмельницкая обл., Укр6 – Черкасская обл. (Kushniarevich et al., 2015); белорусы: Бел1 – Брестская обл., Бел2 – Витебская обл., Бел3 – центр, Бел4 – восток, Бел5 – вост. Полесье, Бел6 – зап. Полесье (Kushniarevich et al., 2015); поляки: Пол1 – Косевье, Пол2 – Курпье (Rebala et al., 2012), Пол3 – Силезия (Battaglia et al., 2009; Underhill et al., 2010), Пол4 – Быдгощ, Пол5 – Гданьск, Пол6 – Краков, Пол7 – Люблин, Пол8 – Сувалки, Пол9 – Щецин, Пол10 – Вроцлав (Kaysner et al., 2008); словаки: Сло – западная Словакия (Rebala et al., 2012); молдаване: Мол1 – юг, Мол2 – север (Varzari et al., 2013); румыны: Рум1 – Констанца, Рум2 – Плоешти, Рум3 – румыны Молдовы (Varzari et al., 2013); гагаузы: Гар1 – Этулья, Гар2 – Конгаз (Varzari et al., 2013); Венг – венгры (Volgyi et al., 2009)

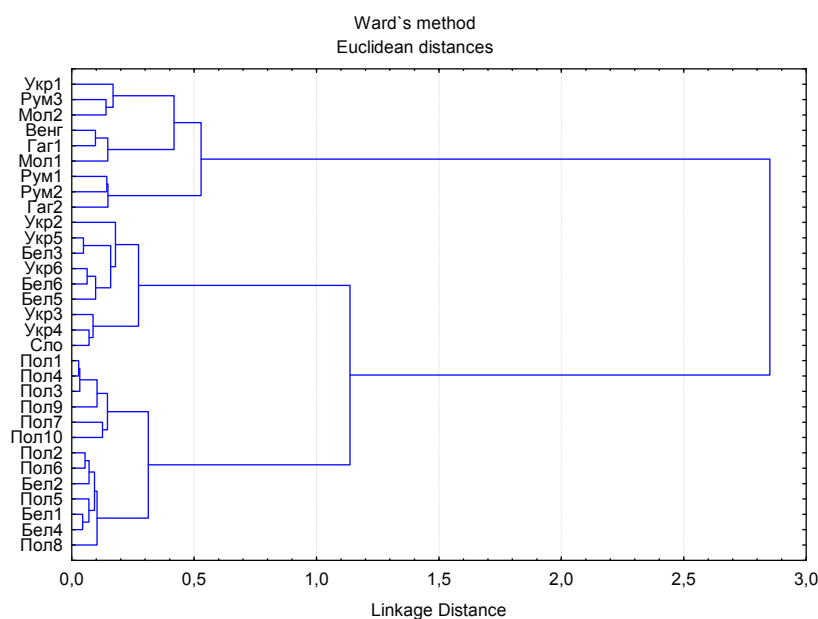


Рис. 3. Генетическое сходство популяций по гаплогруппам Y хромосомы, кластерный анализ: список обозначений см. рис. 2

На основании частот гаплогрупп рассчитаны парные генетические расстояния между популяциями, отражающими степень генетического сходства или генетических различий по данной системе маркеров. Частично полученные данные приведены в таблице 2. На основании парных генетических расстояний между популяциями построены карты, отражающие области генетического сходства для Закарпатской (рис. 4а) и Черновиц-

кой популяций (рис. 4б). Карты построены на большом пространстве, включающем Европу, Урал, Кавказ и Анатолию – соответственно для сравнения использовались опубликованные данные по локальным популяциям из этих регионов. Каждая карта строится для одной популяции (реперной); на ней цветом отражаются генетические расстояния от реперной популяции до всех остальных популяций. В общих чертах такие карты, по-

строенные для Буковины и Закарпаття, совпадают: украинцы обеих изучаемых областей проявляют наибольшее генетическое сходство с остальными украинскими популяциями (генетическое расстояние $d < 0,05$), а так-

же со словаками и словенцами. Закарпатье, по сравнению с Буковиной, больше похоже на южнороссийские популяции, тогда как Буковина показывает несколько большее сходство с Молдовой, Словенией и Румынией.

Таблица 2

Генетические расстояния между популяциями

	Черновицкая обл.	Закарпатская обл.	Украинцы	Поляки	Венгры	Румыны	Молдаване	Гагаузы	Белорусы	Словаки
Черновицкая обл	0,000	0,048	0,067	0,166*	0,101*	0,141*	0,031	0,128*	0,134*	0,086
Закарпатская обл	0,048	0,000	0,022	0,077	0,120*	0,302**	0,078	0,194*	0,057	0,053
Украинцы	0,067	0,022	0,000	0,033	0,092	0,352**	0,088	0,200*	0,015	0,015
Поляки	0,166*	0,077	0,033	0,000	0,143*	0,617***	0,171*	0,356**	0,016	0,021
Венгры	0,101*	0,120*	0,092	0,143*	0,000	0,178*	0,035	0,054	0,160*	0,058
Румыны	0,141*	0,302**	0,352**	0,617***	0,178*	0,000	0,120*	0,055	0,546***	0,366**
Молдаване	0,031	0,078	0,088	0,171*	0,035	0,120*	0,000	0,062	0,168*	0,079
Гагаузы	0,128*	0,194*	0,200*	0,356**	0,054	0,055	0,062	0,000	0,327**	0,196*
Белорусы	0,134*	0,057	0,015	0,016	0,160*	0,546***	0,168*	0,327**	0,000	0,030
Словаки	0,086	0,053	0,015	0,021	0,058	0,366**	0,079	0,196*	0,030	0,000

Примечание: * – генетическое расстояние $0,1 < d < 0,3$; ** – $0,3 < d < 0,5$; *** – $d > 0,5$.

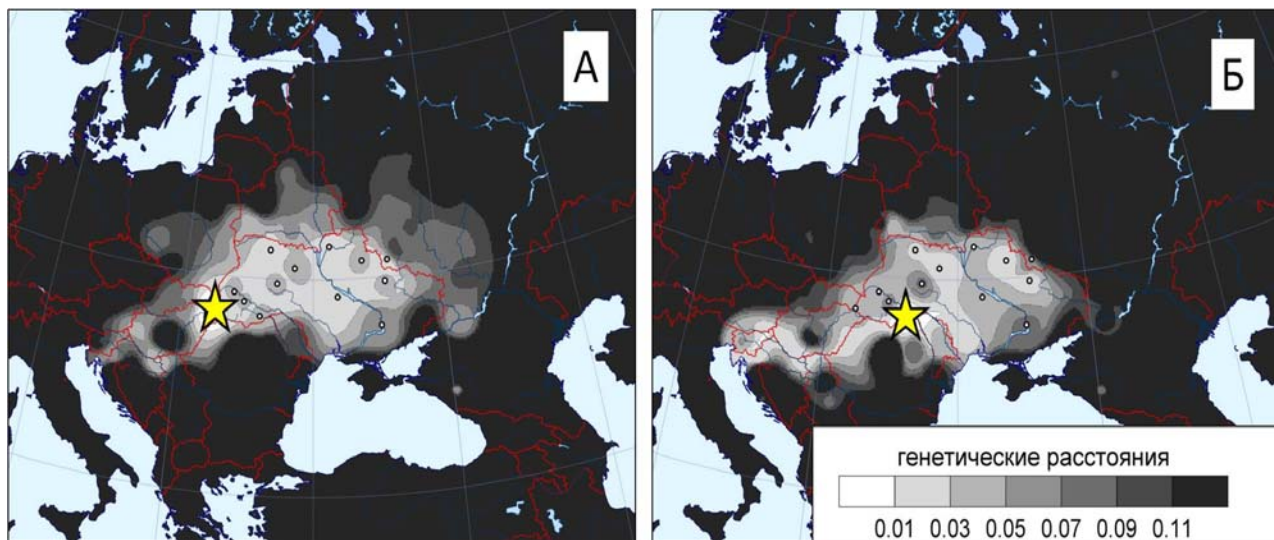


Рис. 4. Карты генетических расстояний от украинцев Закарпатской (А) и Черновицкой (Б) областей по данным о частотах гаплогрупп Y-хромосомы: реперные популяции обозначены звездочками; светлые тона соответствуют генетически близким регионам, темные – отдаленным

Выводы

Черновицкая и Закарпатская популяции украинцев, несмотря на краевое положение в этническом украинском ареале, сложную историю и существование в различных политических образованиях, по маркерам Y-хромосомы образуют единую область генетического сходства с остальными украинскими популяциями и являются частью цельного украинского генофонда.

Черновицкая популяция отличается от типичных популяций украинцев высокой частотой Y-хромосомной гаплогруппы I2a (P37.2) и пониженной частотой гаплогруппы R1a (M198). Такие генетические особенности, по-видимому, сформировались за счет включения генетических компонентов соседних молдаван и румын.

Карпаты являются географическим барьером для распространения ряда гаплогрупп Y-хромосомы на территории Восточной Европы. Они ограничивают поток N1c (M178) и R1a (M198) с северо-востока и распространение E1b (M78), R1b (M269), J (M304) и G (M201) с юго-запада.

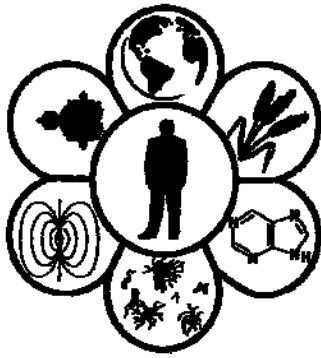
Библиографические ссылки

Balanovsky, O., Dibirova, K., Dybo, A., Mudrak, O., Frolova, S., Pocheshkhova, E., Haber, M., Platt, D., Schurr, T., Haak, W., Kuznetsova, M., Radzhabov, M., Balaganskaya, O., Druzhinina, E., Zakharova, T., Hernanz, D., Zalloua, P., Koshel, S., Ruhlen, M., Renfrew, C., Wells, R.S., Tyler-Smith, C., Balanovska, E., The Genographic Consortium., 2011. Parallel evo-

- lution of genes and languages in the Caucasus region. *Mol. Biol. Evol.* 28(10), 2905–2920.
- Balanovsky, O., Rootsi, S., Pshenichnov, A., Kivisild, T., Churnosov, M., Evseeva, I., Pocheshkhova, E., Boldyreva, M., Yankovsky, N., Balanovska, E., VILLEMS, R., 2008. Two sources of the Russian patrilineal heritage in their Eurasian context. *Am. J. Hum. Genet.* 82(1), 236–250.
- Barbujani, G., Bertorelle, G., 2001. Genetics and the population history of Europe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98(1), 22–25.
- Battaglia, V., Fornarino, S., Al-Zahery, N., Olivieri, A., Pala, M., Myres, N.M., King, R.J., Rootsi, S., Marjanovic, D., Primorac, D., Hadziselimovic, R., Vidovic, S., Drobnic, K., Durmishi, N., Torroni, A., Santachiara-Benerecetti, A.S., Underhill, P.A., Semino, O., 2009. Y-chromosomal evidence of the cultural diffusion of agriculture in Southeast Europe. *Eur. J. Hum. Genet.* 17(6), 820–830.
- Chiaroni, J., Underhill, P., Cavalli-Sforza, L.L., 2009. Y chromosome diversity, human expansion, drift, and cultural evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106(48), 20174–20179.
- Cruciani, F., La Fratta, R., Trombetta, B., Santolamazza, P., Sellitto, D., Colomb, E.B., Dugoujon, J.M., Crivellaro, F., Benincasa, T., Pascone, R., Moral, P., Watson, E., Melegh, B., Barbujani, G., Fuselli, S., Vona, G., Zgradisnik, B., Assum, G., Brdicka, R., Kozlov, A.I., Efremov, G.D., Coppa, A., Novelletto, A., Scozzari, R., 2007. Tracing past human male movements in northern/eastern Africa and western Eurasia: New clues from Y-chromosomal haplogroups E-M78 and J-M12. *Mol. Biol. Evol.* 24(6), 1300–1311.
- Har'kov, V.N., Stepanov, V.A., Borinskaja, S.A., Kozhekbaeva, Z.M., Gusar, V.A., Grechanina, E.J., Puzyrev, V.P., Husnutdinova, J.K., Jankovskij, N.K., 2004. Struktura genofonda vostochnyh ukraincev po gaplogruppam Y-hromosomy [The gene pool structure of Eastern Ukrainians on Y chromosome haplogroups]. *Genetika* 40(3), 415–421 (in Russian).
- Jobling, M., Tyler-Smith, C., 2003. The human Y chromosome: An evolutionary marker comes of age. *Nat. Rev. Genet.* 4, 598–612.
- Karafet, T.M., Mendez, F.L., Meilerman, M.B., Underhill, P.A., Zegura, S.L., Hammer, M.F., 2008. New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree. *Genome Res.* 18, 830–838.
- Kayser, M., Lao, O., Anslinger, K., Augustin, C., Bargel, G., Edlmann, J., Elias, S., Heinrich, M., Henke, J., Henke, L., Hohoff, C., Illing, A., Jonkisz, A., Kuzniar, P., Lebioda, A., Lessig, R., Lewicki, S., Maciejewska, A., Monies, D.M., Pawłowski, R., Poetsch, M., Schmid, D., Schmidt, U., Schneider, P.M., Stradmann-Bellinghausen, B., Szibor, R., Wegener, R., Wozniak, M., Zoledziewska, M., Roewer, L., Dobosz, T., Ploski, R., 2005. Significant genetic differentiation between Poland and Germany follows present-day political borders, as revealed by Y-chromosome analysis. *Hum. Genet.* 117, 428–443.
- Koshel, S., 2012. Geoinformation technologies in genegeography. In: *Mod. Geogr. Cartogr. Artic. Collect. Ed. Lure, I.K., Kravtsova, V.I.*, 158–166.
- Kushniarevich, A., Utevska, O., Chuhryaeva, M., Agdzhoyan, A., Dibirova, K., Uktveryte, I., Möls, M., Mulahasanovic, L., Pshenichnov, A., Frolova, S., Shanko, A., Metspalu, E., Reidla, M., Tambets, K., Tamm, E., Koshel, S., Zaporozhchenko, V., Atramentova, L., Kučinskas, V., Davydenko, O., Goncharova, O., Evseeva, I., Churnosov, M., Pocheshchova, E., Yunusbayev, B., Khusnutdinova, E., Marjanović, D., Rudan, P., Rootsi, S., Yankovsky, N., Endicott, P., Kastian, A., Dybo, A., Genographic Consortium, Tyler-Smith, C., Balanovska, E., Metspalu, M., Kivisild, T., VILLEMS, R., Balanovsky, O., 2015. Genetic heritage of the Balto-Slavic speaking populations: A synthesis of autosomal, mitochondrial and Y-chromosomal data. *PLoS One* 10(9), e0135820.
- Lappalainen, T., Laitinen, V., Salmela, E., Andersen, P., Huoponen, K., Savontaus, M.L., Lahermo, P., 2008. Migration waves to the Baltic sea region. *Ann. Hum. Genet.* 72(3), 337–348.
- Mielnik-Sikorska, M., Daca, P., Woźniak, M., Malyarchuk, B.A., Bednarek, J., Dobosz, T., Grzybowski, T., 2013. Genetic data from Y chromosome STR and SNP loci in Ukrainian population. *Forensic Sci. Int. Genet.* 7(1), 200–203.
- Myres, N.M., Rootsi, S., Lin, A.A., Järve, M., King, R.J., Kutuev, I., Cabrera, V.M., Khusnutdinova, E.K., Pshenichnov, A., Yunusbayev, B., Balanovsky, O., Balanovska, E., Rudan, P., Baldovic, M., Herrera, R.J., Chiaroni, J., Di Cristofaro, J., VILLEMS, R., Kivisild, T., Underhill, P.A., 2011. A major Y-chromosome haplogroup R1b Holocene era founder effect in Central and Western Europe. *Eur. J. Hum. Genet.* 19(1), 95–101.
- Nei, M., 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106, 283–292.
- Novelletto, A., 2007. Y chromosome variation in Europe: Continental and local processes in the formation of the extant gene pool. *Ann. Hum. Biol.* 34(2), 139–172.
- Perić, M., Lauc, L.B., Klarić, I.M., Rootsi, S., Janićević, B., Rudan, I., Terzić, R., Colak, I., Kvesić, A., Popović, D., Sijacki, A., Behluli, I., Dordevic, D., Efremovska, L., Bajec, D.D., Stefanović, B.D., VILLEMS, R., Rudan, P., 2005. High-resolution phylogenetic analysis of southeastern Europe traces major episodes of paternal gene flow among Slavic populations. *Mol. Biol. Evol.* 22, 1964–1975.
- Rębała, K., Martínez-Cruz, B., Tönjes, A., Kovacs, P., Stumvoll, M., Lindner, I., Büttner, A., Wichmann, H.E., Siváková, D., Soták, M., Quintana-Murci, L., Szczerkowska, Z., Comas, D., Genographic Consortium, 2013. Contemporary paternal genetic landscape of Polish and German populations: From early medieval Slavic expansion to post-World War II resettlements. *Eur. J. Hum. Genet.* 21, 415–422.
- Rootsi, S., Myres, N.M., Lin, A.A., Järve, M., King, R.J., Kutuev, I., Cabrera, V.M., Khusnutdinova, E.K., Varendi, K., Sahakyan, H., Behar, D.M., Khusainova, R., Balanovsky, O., Balanovska, E., Rudan, P., Yepiskoposyan, L., Bahmanimehr, A., Farjadian, S., Kushniarevich, A., Herrera, R.J., Grugni, V., Battaglia, V., Nici, C., Crobu, F., Karachanak, S., Kashani, B.H., Houshmand, M., Sanati, M.H., Toncheva, D., Lisa, A., Semino, O., Chiaroni, J., Cristofaro, J.D., VILLEMS, R., Kivisild, T., Underhill, P.A., 2012. Distinguishing the co-ancestries of haplogroup G Y-chromosomes in the populations of Europe and the Caucasus. *Eur. J. Hum. Genet.* 20(12), 1275–1282.
- Rootsi, S., Zhivotovsky, L.A., Baldovic, M., Kayser, M., Kutuev, I.A., Khusainova, R., Bermisheva, M.A., Gubina, M., Fedorova, S.A., Ilumäe, A.M., Khusnutdinova, E.K., Voevoda, M.I., Osipova, L.P., Stoneking, M., Lin, A.A., Ferak, V., Parik, J., Kivisild, T., Underhill, P.A., VILLEMS, R., 2007. A counter-clockwise northern route of the Y-chromosome haplogroup N from Southeast Asia towards Europe. *Eur. J. Hum. Genet.* 15(2), 204–211.
- Underhill, P.A., Myres, N.M., Rootsi, S., Chow, C.T., Lin, A.A., Otiillar, R.P., King, R., Zhivotovsky, L.A., Balanovsky, O., Pshenichnov, A., Ritchie, K.H., Cavalli-Sforza, L.L., Kivisild, T., VILLEMS, R., Woodward, S.R., 2007. New phylogenetic relationships for Y-chromosome haplogroup I: Reappraising its phylogeography and prehistory. In: Mellars, P., Boyle, K., Bar-Yosef, O., Stringer, C. (Eds). *Rethinking the human revolution*. McDonald Institute for Archaeological Research, Cambridge, UK. 33–42.
- Underhill, P.A., Myres, N.M., Rootsi, S., Metspalu, M., Zhivotovsky, L.A., King, R.J., Lin, A.A., Chow, C.E., Semino, O., Battaglia, V., Kutuev, I., Järve, M., Chaubey, G., Ayub, Q., Mohyuddin, A., Mehdi, S.Q., Sengupta, S., Rogae, E.I., Khusnutdinova, E.K., Pshenichnov, A., Balanovsky, O.,

- Balanovska, E., Jeran, N., Augustin, D.H., Baldovic, M., Herrera, R.J., Thangaraj, K., Singh, V., Singh, L., Majumder, P., Rudan, P., Primorac, D., Villems, R., Kivisild, T., 2010. Separating the post-Glacial coancestry of European and Asian Y chromosomes within haplogroup R1a. *Eur. J. Hum. Genet.* 18(4), 479–484.
- Underhill, P.A., Passarino, G., Lin, A.A., Shen, P., Mirazon, L.M., Foley, R.A., Oefner, P.J., Cavalli-Sforza, L.L., 2001. The phylogeography of Y chromosome binary haplotypes and the origins of modern human populations. *Ann. Hum. Genet.* 65, 43–62.
- Utevska, O.M., Agdzhojan, A.T., Balanovska, E.V., Atramentova, L.A., Balanovsky, O.P., 2013. Istoki formirovaniia ukrainskogo genofonda po dannym ob Y-hromosome [The origin of Ukrainian gene pool on Y-chromosomal data]. *Visnik Harkivs'kogo universitetu* 18(1079), 87–98 (in Russian).
- Utevska, O.M., Agdzhojan, A.T., Pshenichnov, A.S., Dibirova, H.D., Chuhraeva, M.I., Atramentova, L.A., Balanovska, E.V., Balanovsky, O.P., 2013. Shodstvo ukrainskikh populjacij iz razlichnyh territorial'nyh podrazdelenij po markeram Y-hromosomy. [Similarity of Ukrainian populations from different regions revealed by Y-chromosomal markers]. *Faktoiry Jeksperimental'noj Jevoljucii Organizmov. Logos, Kiev.* 338–341 (in Russian).
- Utevska, O.M., Pshenichnov, A.S., Dibirova, H.D., Rootsi, S., Agdzhojan, A.T., Churnosov, M.I., Balanovska, E.V., Atramentova, L.A., Balanovsky, O.P., 2015. Shodstvo i razlichija genofondov ukrainskikh i russkikh populjacij Slobozhanshiny po markeram Y-hromosomy [Gene pool similarities and differences between Ukrainians and Russians of Slobozhanshina on Y-chromosome data]. *Citologija i Genetika* 49(4), 40–50 (in Russian).
- Varzari, A., Kharkov, V., Simonova, K., Stepanov, V., Stephan, W., Weiss, E.H., Nikitin, A.G., Raicu, F., 2013. Paleo-Balkan and Slavic contributions to the genetic pool of Moldavians: Insights from the Y chromosome. *PLoS One* 8(1), e53731.
- Völgyi, A., Zalán, A., Szvetnik, E., Pamjav, H., 2009. Hungarian population data for 11 Y-STR and 49 Y-SNP markers. *Forensic Sci. Int. Genet.* 3(2), e27-8.
- Woźniak, M., Malyarchuk, B., Derenko, M., Vanecek, T., Lazur, J., Gomolcak, P., Grzybowski, T., 2010. Similarities and distinctions in Y chromosome gene pool of Western Slavs. *Am. J. Phys. Anthropol.* 142(4), 540–548.
- Y-Chromosome Consortium, 2002. A nomenclature system for the tree of human Y-chromosomal binary haplogroups. *Genome Res.* 12, 339–348.
- Yunusbayev, B., Metspalu, M., Järve, M., Kutuev, I., Rootsi, S., Metspalu, E., Behar, D.M., Varendi, K., Sahakyan, H., Khusainova, R., Yepiskoposyan, L., Khusnutdinova, E.K., Underhill, P.A., Kivisild, T., Villems, R., 2012. The Caucasus as an asymmetric semipermeable barrier to ancient human migrations. *Mol. Biol. Evol.* 29(1), 359–365.

Надійшла до редколегії 21.09.2015



УДК 577.112.85:616.155.392-036.1

Розподіл лейкоцитів периферичної крові за ConA-позитивними глікотопами у хворих на хронічні лейкози

Г.С. Маслак

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

Проаналізовано розподіл гранулоцитів та моноцитів периферичної крові людини, які взаємодіють із лектином канавалії мечо-видної (ConA) у групі гематологічно здорових донорів і хворих на хронічний лімфолейкоз і еритремію. У периферичній крові здорової людини рівень ConA-позитивних моноцитів і гранулоцитів становить $9,86 \pm 1,01\%$ та $32,72 \pm 3,21\%$, відповідно. Визначено зниження на $31,0 \pm 2,3\%$ рівня ConA-позитивних моноцитів та підвищення кількості ConA-зв'язувальних гранулоцитів на $66,7 \pm 3,8\%$ у хворих на хронічний лімфолейкоз. Аналогічний перерозподіл щодо норми визначено у хворих на еритремію: кількість ConA-позитивних моноцитів знизена в 3,3 рази ($P < 0,05$), а рівень гранулоцитів, які взаємодіють із вибраним для досліджень кон'югатом лектину, незначно зростає. Порівняльний аналіз ConA-зв'язувальних епітопів плазматичної мембрани моноцитів не виявив значної різниці між даними, отриманими в групі контролю та групах хворих на хронічний лімфолейкоз і еритремію. За допомогою проточної цитометрії визначено зростання інтенсивності експонування ConA-зв'язувальних глікотопів на поверхні гранулоцитів периферичної крові хворих на еритремію в 100 разів, а у хворих на хронічний лімфолейкоз – в 3,3 рази, що може слугувати додатковим критерієм для диференціювання цих захворювань.

Ключові слова: ConA; моноцити; гранулоцити; еритремія; хронічний лімфолейкоз

White blood cells of peripheral blood with ConA-positive glycotopes in patients with chronic leukemia

G.S. Maslak

State Institution "Dnipropetrovsk Medical Academy", Dnipropetrovsk, Ukraine

Tumor growth progression of blood cells occurs due to changes in their genetic apparatus, which affects not only the cells morphological characteristics, but also their functional activity which to a greater extent depends on the membrane surface structures, a significant part of which is of glycoprotein nature. Complex type N-glycans are components of surface glycoproteins in the most of leukocytes. Thus, the study of changes in carbohydrate determinants of glycoproteins on the surface of leukocytes in tumorigenesis can help to reveal the mechanisms of this process. The aim of our study was to investigate the monocytes and granulocytes cytoplasmic membrane N-glycosylation in patients with chronic leukemia. The object of the study were blood cells of patients with chronic lymphocytic leukemia ($n = 12$) and polycythemia vera ($n = 15$) aged 58–66 years. Healthy hematologic volunteers ($n = 15$) aged 55 to 65 years were in the control group. N-glycan exposure on monocytes and granulocytes was investigated by flow cytometer Beckman Coulter EPICS with Canavalia ensiformis lectin – Con A conjugated with fluorescent labels. The number of dead cells was monitored by means of binding them with propidium iodide. The result has been analyzed with FC Express. According to our data, levels of ConA-positive monocytes and granulocytes were $9,9 \pm 1,0\%$ and $32,7 \pm 3,2\%$, respectively, in peripheral blood of healthy persons. The level of ConA-positive monocytes decreased to $31,0 \pm 2,3\%$ and the number of ConA-binding granulocytes increased to $66,7 \pm 3,8\%$ in patients with chronic lymphocytic leukemia compared with the norm. The number of ConA-positive monocytes decreased 3.3 times, and the level of granulocytes interacting with Canavalia ensiformis lectin slightly increased relative to control in polycythemia vera patients. There is significant increase in Con A-positive epitopes on granulocytes in patients with chronic lymphocytic leukemia and polycythemia vera compared with the control group, and absence of any difference in

*ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», вул. Весела, 30, Дніпропетровськ, 49024, Україна
State Institution "Dnipropetrovsk Medical Academy", Vesela Str., 30, Dnipropetrovsk, 49024, Ukraine
Tel.: +38-099-903-37-22. E-mail: maslak_anna@mail.ru*

Con A-positive epitopes on monocytes. 100 times increase of the number of ConA-binding glycotopes is observed on the surface of granulocytes in peripheral blood of patients with polycythemia vera, and 3,3 times increase in patients with chronic lymphocytic leukemia, which may serve as an additional marker for the diagnosing these diseases.

Keywords: ConA; monocytes; granulocytes; polycythemia vera; chronic lymphocytic leukemia

Вступ

Хронічні онкопроліферативні захворювання за морфологією злякисних клітин можна розподілити на мієло- та лімфолейкози, загальною особливістю яких є затримання дозрівання клітин відповідного гемопоетичного ростка, що зумовлює підвищення рівнів незрілих та функціонально неактивних клітин (Lapovets et al., 2013). При хронічному лімфолейкозі (ХЛЛ) зростає вміст лейкоцитів, в основному за рахунок пухлинних В-лімфоцитів, а за еритремії, яку класифікують як хронічне мієлопроліферативне захворювання, об'ємна частка еритроцитів зміненої структури значно підвищується (Sanchez et al., 2013). Як відомо, прогресія пухлинного росту клітин крові виникає внаслідок змін їх генетичного апарату, що впливає не тільки на морфологічні характеристики, а і на їх функціональну активність, яка більшою мірою залежить від мембранних поверхневих структур, вагома частина яких має глікопротеїнову природу (Häuselmann and Borsig, 2014). Згідно з працями українських учених, при ХЛЛ найважливішими для клітин крові є взаємодії за участю В-клітинного рецептора, інтегринів, фібрoneктину, антигенів CD38 та CD31 та інших глікопротеїнів (Abramenko and Kyachok, 2012).

Зміни вуглеводної складової мембранних глікопротеїнів порушують нормальні фізіологічні функції клітин та спричиняють метастатичну та інвазивну поведінку (Christiansen et al., 2014), оскільки за участю саме поверхневих адгезивних молекул лейкоцитів унаслідок міжклітинних взаємодій між раковими клітинами та ендотелем, лейкоцитами та тромбоцитами, спричиняється адгезія, трансудація та створення метастатичних уражень (Chambers et al., 2002). Однією з причин змін поверхневих глікотопів під час злякисної трансформації (Stowell et al., 2015; Glavey et al., 2015) може бути стрес ендоплазматичного ретикулуму клітини, який викликає порушення процесів N- та O-глікозилювання (Xu et al., 2010).

N-глікани комплексного типу – складові більшості поверхневих глікопротеїнів лейкоцитів. Наприклад, екстраклітинні домени L-селектину, який експресується усіма типами білих клітин крові, мають 7 потенційних сайтів N-глікозилювання (Wedepohl et al., 2010). А за допомогою *in vivo* експериментів доказано, що зв'язування L-селектину із трансмембранним глікопротеїном I типу (CD44) відбувається лише за наявності у нього N-гліканів комплексного типу певної структури (Merzaban et al., 2011). Отже, дослідження змін вуглеводних детермінант поверхневих глікопротеїнів при туморогенезі допоможе розкрити механізми, які забезпечують здійснення цього процесу. У попередніх працях ми в основному концентрували увагу на дослідженні глікостатусу лімфоцитів, впливу різних типів лікувальної терапії на цей показник при лімфо- та мієлопроліферативних захворюваннях (Kostyuk, 2015). Нез'ясованим залишилось питання щодо стану вуглеводних детермінант у складі глікокон'югатів на поверхні інших клітин крові. Хоча за даними, отриманими в нашій

лабораторії, при еритремії, наприклад, відбувається перерозподіл лейкоцитів за експонуванням α 1-кислого глікопротеїну та фібрoneктину (Maslak, 2010), які, як відомо, мають глікопротеїнову природу та виявляються на поверхні не тільки лімфоцитів, а і гранулоцитів, і моноцитів (Gunnarsson et al., 2007; Astrof, 2009). Враховуючи вищевикладене, мета наших досліджень – визначити N-глікозилюваність цитоплазматичної мембрани моноцитів та гранулоцитів у хворих із хронічними лейкозами.

Матеріал і методи досліджень

Об'єкт дослідження – гранулоцити та моноцити крові хворих на еритремію ($n = 15$) та хронічний лімфолейкоз ($n = 12$) віком 58–66 років. Контрольну групу становили гематологічно здорові волонтери ($n = 15$) віком 55–65 років. Клінічне обстеження пацієнтів проводили відповідно до стандартів медичної допомоги в умовах спеціалізованого стаціонару – гематологічного відділення комунального закладу «Міська багатопрофільна клінічна лікарня № 4» м. Дніпропетровськ. Діагноз онкологічних захворювань крові хворих досліджуваної групи верифіковано за загальноприйнятими клінічними та морфологічними критеріями, закріпленими Наказом МОЗ України від 17.09.2007 р. № 554 «Про затвердження протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю «онкологія» із доповненнями згідно з Наказом МОЗ України від 30.07.2010 р. № 645. Усі обстежені письмово дали згоду на участь у дослідженні.

Клітини виділяли шляхом попереднього лізису еритроцитів за допомогою лікувального розчину Optilyse C протягом 30 хвилин, подальшим промиванням забуференим фізіологічним розчином (ЗФР) (центрифугування 2 хвилини при 2 400 об./хв) та фіксацією 8% параформальдегідом протягом 7 хвилин.

Після відмивання клітини ресуспендували у ЗФР, підраховували їх кількість у камері Горяєва. Життєздатність клітин (понад 90%) визначали за допомогою триптанового синього та готували робочу концентрацію (300 тис./мл у кожному зразку). Експонування біантенних N-гліканів визначали методом проточної цитофлуориметрії з використанням лектину канавалієв мечовидної – Con A (Лектинотест, Україна), кон'югованого із флуоресцеїнізотіоціанатом (ФІТЦ). Кількість мертвих клітин контролювали за їх зв'язуванням із пропідій йодидом. Дані реєстрували на проточному цитометрі Beckman Coulter EPICS. Обробку результатів робили за допомогою програми FC Express.

Результати аналізували за допомогою пакета програм Statistica 6.0. Достовірність відмінностей у групах порівняння встановлювали з використанням t-критерію Стьюдента із попереднім оцінюванням розподілу вибірки (відповідність нормальному розподілу даних).

Дослідження виконані у рамках науково-дослідницької роботи кафедри біологічної, медичної та фарма-

цвітничної хімії Державного закладу «Дніпропетровська державна медична академія» «Експресія глікокон'югатів та їх посттрансляційна модифікація за умов онкотрансформації» (номер державної реєстрації – 0111U002788, 2011–2013 рр.).

Результати та їх обговорення

Під час проведення першого етапу досліджень з'ясовано, що з обраним для досліджень кон'югатом лектину в групі контролю взаємодіяли як гранулоцити, так і моноцити. Причому у периферичній крові здорової людини рівень ConA-позитивних моноцитів становив $9,86 \pm 1,01\%$ кількості клітин цього типу, а концентрація гранулоцитів, які взаємодіяли з лектином канавалії мечовидної у цій групі, була $32,7 \pm 3,2\%$ (рис. 1). Оскільки ConA специфічно взаємодіє (Dipak, 1994) із коровими структурами усіх типів N-гліканів (високоманозним, складним та гібридним, рис. 2), ми проаналізували літературу щодо наявності на поверхні моноцитів глікопротеїнів, які в основному представлені кластерами диференціювання CD11c, CD14 та CD68 (Leong et al., 2003). CD11c – трансмембранний глікопротеїн, який має у своєму складі 10 потенційних сайтів N-глікозилування (Hogg et al., 1996). CD14 – GPI-зв'язана форма поверхневого білка, який має понад 20% вуглеводної складової, представлені N-гліканами, розташованими у положенні Asn18, Asn32, Asn263 та Asn304 (Stelter et al., 1996). CD68, за даними німецьких учених (Lewandrowski, 2006), значно O-глікозилюваний та має 9 потенційних сайтів N-глікозилування. Отже, можливо, саме експонування цих глікопротеїнів на поверхні моноцитів пояснює з'язування кон'югату лектину з їх поверхнею.

Що стосується поверхні гранулоцитів, то найважливішим для їх функції є високоглікозилюваний CD66, який опосередковує зв'язування клітини з ендотеліальною тканиною через E-селектини та є рецептором до галектину 3. CD66a ізомерна форма цього глікопротеїну має 21 потенційний сайт N-глікозилування, CD66b – 11, CD66c – 12, а CD66d – 3 N-глікану, причому вуглеводні гілки можуть бути бі-, три- та тетра-антенними (Stocks et al., 1996). Отже, можливо, наявність на поверхні досліджуваних клітин перерахованих вище кластерів диференціювання визначає їх здатність взаємодіяти з ФІПЦ міченим кон'югатом ConA (рис. 2).

Дослідження розподілу моноцитів та гранулоцитів за зв'язуванням із лектином канавалії мечовидної показали, що у хворих на хронічний лімфолейкоз кількість ConA-позитивних моноцитів достовірно ($P < 0,05$) знижувалась на $31,0 \pm 2,3\%$, а кількість лектин-позитивних гранулоцитів підвищувалась порівняно з контрольною групою на $66,7 \pm 3,8\%$. Аналогічний розподіл отримано у хворих на еритремію: кількість ConA-позитивних моноцитів достовірно ($P < 0,05$) знижувалась у 3,3 раза, а рівень гранулоцитів, які взаємодіють з обраним для досліджень кон'югатом лектину, незначно зростає відносно контрольних значень (рис. 1). Отже, незважаючи на те, що результати, отримані у групах різних за походженням захворювань: мієлоїдного та лімфоїдного ростків, різниці між ними не виявлено, тому наступним етапом роботи було дослідження щільності експонуван-

ня ConA-зв'язувальних глікопепідів на поверхні гранулоцитів та моноцитів і порівняння отриманих даних із контрольною групою.

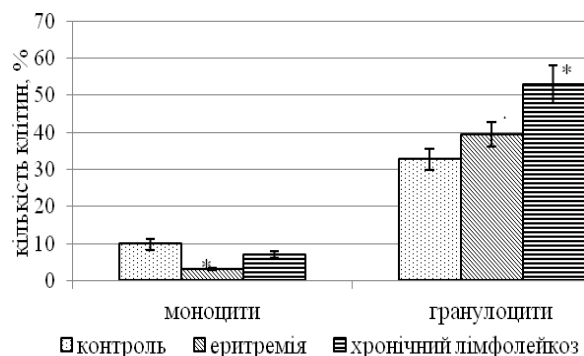


Рис. 1. Кількість моноцитів і гранулоцитів крові гематологічно здорових донорів і хворих на еритремію та хронічний лімфолейкоз із поверхневою локалізацією ConA-позитивних глікопепідів:
* – вірогідна різниця порівняно з контрольною групою норми за $P < 0,05$

Порівняльний аналіз моноцитів не виявив значної різниці між даними, отриманими в групі контролю і в групах хворих на ХЛЛ та еритремію (дані не наводяться). Відтак, показники щільності експонування ConA-зв'язувальних глікопепідів на поверхні гранулоцитів відрізнялись у дослідних групах. Так, відмічали підвищення утричі інтенсивності експонування ConA-позитивних епітопів на поверхні гранулоцитів у хворого на хронічний лімфолейкоз порівняно з контролем (рис. 3).

Показник інтенсивності флуоресценції кон'югатів лектинів на поверхні гранулоцитів значно відрізнявся між патологічною та групою контролю. На поверхні гранулоцитів периферичної крові хворих на еритремію виявлено зростання інтенсивності експонування ConA-зв'язувальних глікопепідів майже у 100 разів (рис. 4).

Отже, при хронічних лейкозах на цитоплазматичній мембрані гранулоцитів визначається підвищення N-глікозилюваності протеїнів, причому ми виявили різницю між групою хворих на хронічний лімфолейкоз та на еритремію. Слід зазначити, що обрані для досліджень онкопроліферативні захворювання асоціюються із структурними патологічними змінами інших клітин. Стосовно гранулоцитів, відомо, що вони надмірно утворюються при еритермії, а у хворих на ХЛЛ їх кількість може не відрізнятися від норми (знижуватись або незначно підвищуватись). У літературі ще в минулому столітті висловлено думку, що для детального розуміння процесів, які супроводжують туморогенез необхідні комплексні дослідження усіх популяцій клітин (Zeya et al., 1979), однак досліджень із того часу проведено не багато.

Аналіз літературних даних показує, що підвищення щільності експонованих N-гліканів на поверхні гранулоцитів при хронічних лейкозах може бути наслідком або підвищення ступеня глікозилюваності асоційованих з мембраною глікопротеїнів, або появи на поверхні нових, не характерних для здорової людини глікопротеїнів (Häuselmann, 2014). За останніми даними, на поверхні гранулоцитів різних типів пухлин значно зростає

експресія CD47, який є глікопротеїном та має 6 сайтів N-глікозилювання, отже, можливо, отримане в роботі підвищення щільності експонування ConA-позитивних глікотопів є наслідком зростання кількості цього кластера диференціювання на поверхні цих клітин (Oldenberg, 2013). З іншого боку, основним глікопротеїном, який

виявляється на поверхні гранулоцитів, є CD66 та його ізомерні форми, які мають різний ступінь глікозилювання, а їх кількість та співвідношення на поверхні гранулоцитів – показник не тільки ступеня диференціювання гранулоцитів, а може також бути маркером ступеня метастазування пухлин (Stocks et al., 1996).

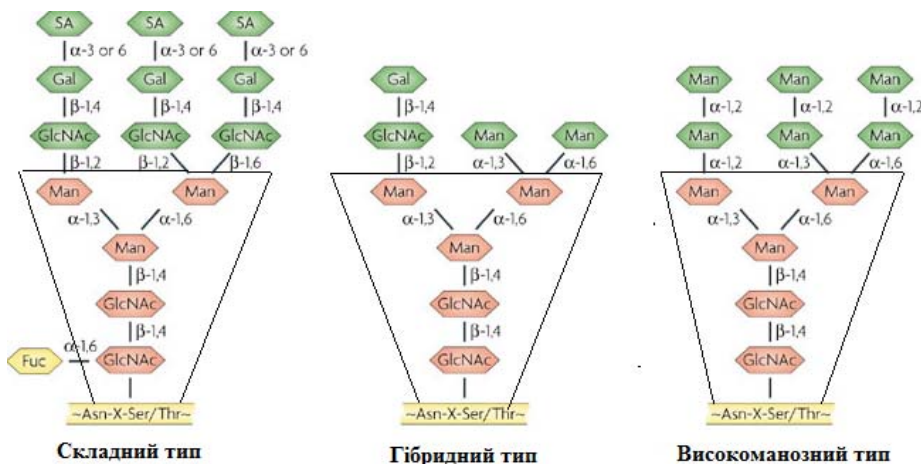


Рис. 2. Вуглеводна специфічність лектину каналії мечовидної – ConA (за Di Virgilio, 1997)

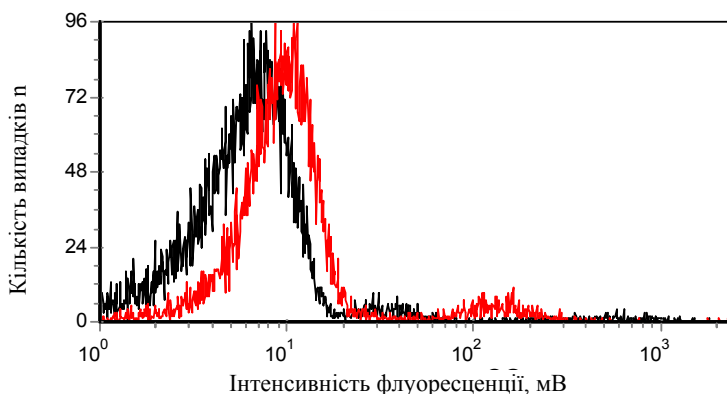


Рис. 3. Інтенсивність флуоресценції ФІТЦ-ConA на поверхні гранулоцитів гематологічно здорового донора (чорна лінія) та хворого на хронічний лімфолейкоз (за даними проточної цитометрії на Beckman Coulter EPICS)

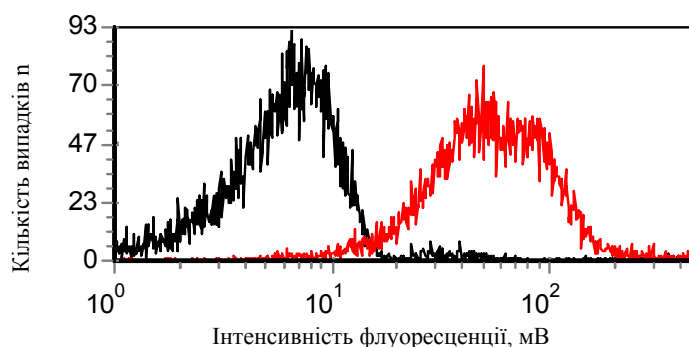


Рис. 4. Інтенсивність флуоресценції ФІТЦ-ConA на поверхні гранулоцитів гематологічно здорового донора (чорна лінія) та хворого на еритремію (за даними проточної цитометрії на Beckman Coulter EPICS)

Отримані результати можуть бути запропоновані як додатковий критерій для діагностування лімфо- та мієло-проліферативних захворювань, а подальші дослідження з розширенням груп хворих за стадією захворювання та спектра лектинів, специфічних до різних глікотопів на поверхні гранулоцитів, допоможуть детальніше описати стан глікопротеїнів на плазматичній мембрані гранулоцитів хронічних лейкозах.

Висновки

У периферичній крові здорової людини рівень ConA-позитивних моноцитів та гранулоцитів становить $9,86 \pm 1,01\%$ та $32,72 \pm 3,21\%$ кількості клітин цього типу, відповідно. У хворих на хронічний лімфолейкоз кількість

СopA-позитивних моноцитів достовірно знижується на $31,0 \pm 2,3\%$ ($P < 0,05$), а кількість лектин-позитивних гранулоцитів підвищується порівняно з контрольною групою на $66,7 \pm 3,8\%$ ($P < 0,05$).

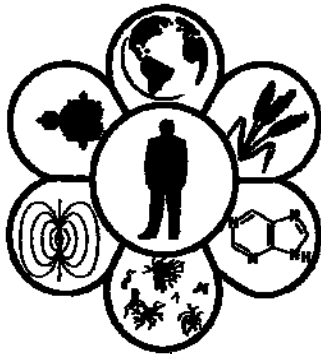
У хворих на еритремію кількість СopA-позитивних моноцитів знижується у 3,3 рази ($P < 0,05$), а рівень гранулоцитів, які взаємодіють з обраним для досліджень кон'югатом лектину, незначно зростає відносно контролю.

На поверхні гранулоцитів периферичної крові хворих на еритремію інтенсивність експонування СopA-з'язувальних глікотопів зростає у 100 разів, а у хворих на хронічний лімфолейкоз – у 3,3 рази.

Бібліографічні посилання

- Abramenko, I.V., Kryachok, Y.A., 2012. Vzaimodejstvie lejke-micheskikh kletok s mikrookruzeniem pri hronicheskom limf-olejkoze: Novye aspekty patogeneza i targetnoj terapii [Interaction of leukemic cells with the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia: New aspects of pathogenesis and targeted therapies]. *Oncohematol.* 5(1), 219 (in Ukrainian).
- Astrof, S., Sophie, A., Hynes, R.O., 2009. Fibronectins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis* (2), 165–175.
- Chambers, A.F., Groom, A.C., MacDonald, I.C., 2002. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer* 2(8), 563–572.
- Christiansen, M.N., Chik, J., Lee, L., Anugraham M., 2014. Cell surface protein glycosylation in cancer. *Proteomics* 14(4–5), 525–546.
- Di Virgilio, S., 1997. High performance lectin affinity chromatography for fractionation and sequence determination of oligosaccharides. *Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry* 12, 1–17.
- Dipak, K.M., Bhattacharyya, L., Koenig, S.H., 1994. Studies of the binding specificity of concanavalin A. Nature of the extended binding site for asparagine-linked carbohydrates. *Biochemistry* 33(5), 1157–1162.
- Glavey, S.V., Huynh, D., Reagan, M.R., 2015. The cancer glycome: Carbohydrates as mediators of metastasis. *Blood Rev.* 29(4), 269–279.
- Gunnarsson, P., Levander, L., Pahlsson, P., Grenegard, M., 2007. The acute-phase protein alpha 1-acid glycoprotein (AGP) induces rises in cytosolic Ca^{2+} in neutrophil granulocytes via sialic acid binding immunoglobulin-like lectins (siglecs). *FASEB J.* 21, 4059–4069.
- Häuselmann, I., Borsig, L., 2014. Altered tumor-cell glycosylation promotes metastasis. *Front. Oncol.* 13(4), 28.
- Hogg, N., Takacs, L., Palmer, D.G., Selvendran, Y., Allen, C., 1986. The p150, 95 molecule is a marker of human mononuclear phagocytes: Comparison with expression of class II molecules. *Eur. J. Immunol.* 16, 240–248.
- Kostyuk, O.V., Maslak, H.S., Brazaluk, A.Z., 2015. Vliyanie alkiliryushchej terapii na sialirovannost' membran limfocitov pri hronicheskom limfolejkoze [Effect of alkylating therapy on lymphocytes sialylation membranes in chronic lymphocytic leukemia]. *Laboratory diagnosis. Eastern Europe* 1(13), 120–128 (in Russian).
- Lapovets, L.E., Swan, G.B., Yastremskaya, O.O., 2013. Vibrani lekciï z laboratornoj medicini. Chastina I. Gematologichni doslidzhennya [Selected lectures of Laboratory Medicine. Part 1. Hematological study]. 192–193 (in Ukrainian).
- Leong, C.F., Raudhawati, O., Cheong, S.K., Sivagengei, K., Hamidah, H.N., 2003. Epithelial membrane antigen (EMA) or MUC1 expression in monocytes and monoblasts. *Pathology* 35(5), 422–427.
- Lewandrowski, U., Moebius, J., Walter, U., Sickmann, A., 2006. Elucidation of N-glycosylation sites on human platelet proteins: A glycoproteomic approach. *Mol. Cell. Proteomics* 5(2), 226–233.
- Maslak, G.S., Pasha, N.S., Kulinich, A.O., Nikolaenko-Kamishova, T.P., Brazaluk, O.Z., Shevtsova, A.I., 2010. Pererospodil populyacij lejkocytiv za ekspresijeyu fibronektinu ta alfa-1-kislogo glikoproteinu pri eritremiji [Rearrangement of leukocyte population on α 1-acid glycoprotein and fibronectin expression in erythremia]. *The Odessa Medical Journal* 21(6), 4–5 (in Ukrainian).
- Merzaban, J.S., Burdick, M.M., Gadhoum, S.Z., 2011. Analysis of glycoprotein E-selectin ligands on human and mouse marrow cells enriched for hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood* 118(7), 1774–1783.
- Oldenborg, P., 2013. CD47: A cell surface glycoprotein which regulates multiple functions of hematopoietic cells in health and disease. *ISRN Hematology* 5, ID 614619.
- Sanchez, C., Le Treut, T., Baier, C., Sébahoun, G., Costello, R.T., 2015. Distribution of lymphocyte subpopulations in patients with polycythemia vera. *Hum. Immunol.* 76(6), 414–416.
- Stelter, F., Pfister, M., Bernheiden, M., Jack, R.S., Bufler, P., Engelmann, H., Schütt, C., 1996. The myeloid differentiation antigen CD14 is N- and O-glycosylated. Contribution of N-linked glycosylation to different soluble CD14 isoforms. *Eur. J. Biochem.* 236(2), 457–464.
- Stocks, S.C., Ruchaud-Sparagano, M.H., Kerr, M.A., Grunert, F., Haslett, C., Dransfield, I., 1996. CD66: Role in the regulation of neutrophil effector function. *Eur. J. Immunol.* 26(12), 2924–2932.
- Stowell, S.R., Ju, T.Z., Cummings, R.D., 2015. Protein glycosylation in cancer. *Annu. Rev. Pathol.* 10(1), 473–510.
- Wedepohl, S., Kaup, M., Riese, S.B., Berger, M., Dervedde, J., Tauber, R., Blanchard, V., 2010. N-glycan analysis of recombinant L-Selectin reveals sulfated GalNAc and GalNAc-GalNAc motifs. *J. Proteome Res.* 9(7), 3403–3411.
- Xu, Y.X., Liu, L., Caffaro, C.E., Hirschberg, C.B., 2010. Inhibition of Golgi apparatus glycosylation causes endoplasmic reticulum stress and decreased protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 285(32), 24600–24608.
- Zeya, H.I., Keku, E., Richards, F., Spurr, C.L., 1979. Monocyte and granulocyte defect in chronic lymphocytic leukemia. *Am. J. Pathol.* 95(1), 43–54.

Надійшла до редколегії 22.09.2015



УДК 532.61.042:616-022.7

Динаміка біоплівкового оброщення катетерів *Enterococcus faecalis*

Е.О. Синетар, О.І. Брич

ДУ "Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л.В. Громашевського НАМН України", Київ, Україна

Охарактеризовано динаміку біоплівкового росту *Enterococcus faecalis* на фрагментах силіконового катетера. Дослідження проводили із застосуванням бактеріологічних та електронномікроскопічних методів. Наведено результати дослідження динаміки біоплівкового росту *E. faecalis* на поверхні силіконового катетера протягом трьох діб. Запропонована нами вертикальна орієнтація фрагментів катетера у суспензії бульйонної культури ентерококів, дає змогу уникнути домішок седиментованих бактерій і зумовлює справжню адгезію з подальшим утворенням мікроколоній протягом 24 годин інкубації. Формування агломератів спостерігали на 48-му годину інкубації. На третю добу інкубації виявлено сформовану виражену біоплівку *E. faecalis* на поверхні силіконового катетера. Отримані дані свідчать, що біоплівка – спосіб щільного оброщення бактеріями поверхні досліджуваного катетера. Біоплівковий ріст бактерій *E. faecalis* відбувається з розширенням площі оброщення катетерів з 51,5 мкм² до 1 922,8 мкм² протягом 24–72 годин інкубації.

Ключові слова: катетер-асоційовані інфекції; силіконовий катетер; бактерії; адгезія

The dynamics of biofilm overgrowth of *Enterococcus faecalis*

E.A. Synetar, O.I. Brych

State Institution "L.V. Gromashevsky Institute of Epidemiology and Infectious Diseases of NAMS of Ukraine", Kyiv, Ukraine

The nature of microorganisms can exist in two physiological forms that allow microbes to preserve livelihoods and continue their life cycle. The first is the population of planktonic forms of microorganisms which live freely in the environment with the developed systems of active and passive mobility, contributing to the rapid spread of a liquid medium. The second forms are those expressing specific mechanisms of adhesion, and able to aggregate on biogenic and abiogenic surfaces. Even in the deep sea vast number of species of bacteria live in their inherent horizons. Thus, the study of biofilms tube life support systems, diagnostic, laparoscopic devices during prolonged catheterization of the urinary system is of great practical, theoretical and biological significance in medicine and biology. For almost 20% of catheter-associated infections antibiotic therapy is ineffective, particularly through the formation of microbial biofilms on the surface of urinary catheters. We characterized the dynamics of biofilm growth of *Enterococcus faecalis* on fragments of silicone catheter. The study was conducted using bacteriological and electron microscopic techniques. Study of the dynamics of biofilm formation was performed using *E. faecalis* strain 49, which is isolated from the urine of persons who are not the patients of the urological department of resuscitation and intensive therapy. Using scanning electron microscopy we have established dynamics and phase attachment of *E. faecalis* bacteria and subsequent overgrowth of silicone catheter surface. After calculations, index of adhesion on the turbulent wall amounted to 0,49 microbial cells. That is, every other cell of the monolayer adhered on the catheter. Area of biofilm growth of *E. faecalis* after 24 hour incubation was equal to 51.5 μm², in 48 hours it increased to 231.5 μm². After 72 hours of incubation we recorded the increase in biofilm growth of *E. faecalis* to 1922,8 μm². The results were obtained on fragments of catheters, immersed in broth in vertical position. This orientation has excluded the deposition of germs by sedimentation, i.e. by gravity. It is known that after the logarithmic phase and achieving M-concentration for a few hours microbes start to die and their possible deposition may occur. Therefore, our results confirm the formation of biofilm, instead of sedimentation of dead microbes. Our study shows that biofilm is "the way of overgrowth on artificial and natural surfaces by microorganisms that are kept on them by exopolymer membranes".

Keywords: catheter-associated infections; silicone catheter; bacteria; adhesion

ДУ "Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л.В. Громашевського НАМН України", вул. М. Амосова, 5, Київ, 03680, Україна

State Institution "L.V. Gromashevsky Institute of Epidemiology and Infectious Diseases of NAMS of Ukraine", N. Amosov Str., 5, Kyiv, 03680, Ukraine

Tel.: +38-096-197-37-47. E-mail: editsinetar@rambler.ru

Вступ

Різні види мікроорганізмів колонізують абіогенні та біогенні поверхні. Навіть у морських глибинах бактерії живуть у притаманних їм горизонтах. Кількість бактерій обчислюють на одиницю площі. У мікробіології це вперше врахував д. мед. н. Валентин Жалко-Титаренко, обчислюючи адгезію мікробів до слизової оболонки людського кишківника (Zhalko-Tytarenko, 1981).

У цій статті уведено поняття про поверхневу концентрацію – кількість мікробів на 1 см^2 і висоту пристінного шару збудників. Ріст мікробів на поверхнях, або оброщення мікробами поверхонь відоме під назвою біоплівки. Вивчення біоплівок має певне практичне, теоретичне, біологічне значення, оскільки стосується проблем оброщення занурених поверхонь суден, різних систем трубопроводів, каналізації (Dobrohotskyu et al., 2009), у медицині – оброщення мікробами трубчастих систем життєзабезпечення, діагностичних і лапароскопічних апаратів і, особливо, у разі тривалих катетеризацій сечовивідної системи (Donlan, 2011; Jacobsen et al., 2008).

Перераховані проблеми мають три напрями. Один – суто медичний, що стосується тактики лікування при застосування катетерів. Другий напрям – біотехнологічний, оскільки дозволяє значно збільшити вихід корисних продуктів мікробного синтезу (Galkin, 2013). Їх ми не торкатимемося. Третій напрям – суто біологічний, або мікробіологічний, тому що біоплівковий ріст, або оброщення катетерів в організмі людини, має біологічні закономірності поверхневого росту та починається з такого поверхневого процесу як адгезія (Coenye and Nelis, 2010; Jacobsen et al., 2011), далі переростає в утворення масиву мікробного оброщення, який, на наш погляд, є формуванням типової біоплівки. Останніми роками спостерігається збільшення частки бактерій *Enterococcus sp.* – представників нормальної резидентної мікрофлори людини, грибів роду *Candida*, які в разі зниження імунних сил організму потенційно здатні ставати збудниками катетер-асоційованих інфекцій сечовивідних шляхів (Pascual, 2002; Semyak et al., 2005; Janovs'ka, 2009). Протягом багатьох років ентерококи не розглядалися як клінічно вагомі збудники, але все частіше їх стали виділяти із клінічного матеріалу при різних патологічних станах (Lysen'ki et al., 2005; Makushenko, 2002).

Більшість ентерококів, які викликають майже 5% усіх бактеріальних інфекцій сечовивідних шляхів (ІСВШ), не мають особливо виражених пристосувальних ознак для існування у середовищі сечовивідної системи. У разі внутрішньолікарняного зараження пацієнтів, особливо за наявності постійного уретрального катетера (Seno et al., 2005; Mohamed et al., 2007), частка ентерококів у розвитку ІСВШ сягає 15–20% (Polishhuk, 2009). Ці мікроорганізми характеризуються низьким рівнем патогенності та проявляють свою активність тільки за певних умов: зниженні природної резистентності макроорганізму, особливо при травмах кишечника або сечостатевого тракту у результаті інструментальних досліджень (Baldassari et al., 2005), вони можуть проникати у стерильні за нормальних умов порожнини, органи та тканини з наступним запаленням. Саме здатність до початкової адгезії, а потім і до утворення біоплівок дозволяє ентерококам добре утримуватись

на слизових оболонках органів людини, викликаючи у цих місцях запалення, наприклад цистити, уретрити, пієлонефрити тощо (Donlon, 2002; Mironenko, 2009). Тому біоплівкоутворення бактерій *E. faecalis* досліджували на моделі, найбільш наближеній до реальності – безпосередньо на урологічних катетерах.

Мета статті – описати динаміку біоплівкового росту *Enterococcus faecalis* на силіконових катетерах.

Матеріал і методи досліджень

Для виконання поставленої мети проведено забір біологічного матеріалу від пацієнтів, які не були урологічно хворими, але через катетеризацію могли ними стати в перспективі. Тому вивчення динаміки утворення біоплівки проводили з використанням штаму *E. faecalis* 49, який виділено із сечі хворого з не урологічного відділення реанімації та інтенсивної терапії. Ідентифікацію штаму за біохімічними властивостями здійснювали з використанням мікробіологічного аналізатора VITEK 2 System TM – compact 15 (виробництва BioMerieux, Франція), використовуючи для грампозитивних бактерій карт GP-21342. Для дослідження біоплівкового росту *E. faecalis* фрагменти силіконових катетерів у вертикальному положенні занурювали у завись *E. faecalis*, приготовану в триптиказосоевому бульйоні. Густиною зависі $1,5 \cdot 10^8$ кл./мл встановлювали за допомогою денситометра Densimat (BioMerieux, Франція) і набору стандартів оптичної густини бактеріальних зависей McFarland. Після інкубації зазначених вище фрагментів у термостаті за $+37^\circ\text{C}$ через 24, 48 та 72 години клітини мікроорганізмів, адгезовані на поверхні досліджуваних катетерів, фіксували за методикою Galkin (2013) у нашій модифікації (Sinetar et al., 2014): фарбували розчином генціан-віолету, тричі промивали дистильованою водою та фіксували протягом 30 хвилин 96% етиловим спиртом. Усі маніпуляції виконували за кімнатної температури.

Дослідження біоплівкового росту *E. faecalis* на поверхні досліджуваного катетера проводили за допомогою сканувального електронного мікроскопа Tescan Mira 3 LMU, виробництва Чехії. Традиційно, досліджуючи такі зразки методами сканувальної електронної мікроскопії (СЕМ), для запобігання локального накопичення заряду в області, що досліджується, поверхню зразка покривають тонким шаром (15–20 нм) струмопровідного матеріалу (Au, Pt, C). Проте в даному експерименті застосовано режими з низькою прискорювальною напругою. Відмова від додаткових етапів пробопідготовки (напилення струмопровідної плівки) дозволила запобігти появі суттєвих спотворень поверхні, яку досліджено. Концентрацію бактеріальних клітин на поверхні фрагменту катетера обчислювали за формулою $p = 3\kappa^{1,5}$, де κ – об'єм концентрації (Zhalko-Tytarenko, 1981).

Результати та їх обговорення

Виділений штаму *E. faecalis* 49 – типовий за біохімічними властивостями, характеризувався середнім ступенем адгезивності за значенням показника індексу адгезивності мікроорганізмів ($3,5 \pm 4,0$). За результатами

дослідження чутливості до антибіотиків із використанням автоматичного аналізатора VITEK 2-compact 15 та карт AST-YSO1 (виробництва BioMerieux, Франція) встановлено, що штам стійкий до ампіциліну, левофлоксацину та гатіфлоксацину. За допомогою сканувальної електронної мікроскопії встановили динаміку та фази прикріплення *E. faecalis* і подальшого оброщення бактеріями поверхні силіконового катетера. Ступінь адгезії *E. faecalis* на поверхні катетера через 24 години інкубації становив 295 мкм². При обчисленні за вищенаведеною формулою показник адгезії у пристінному моношарі складав 0,49 мікробних клітин. Тобто, кожна друга клітина з моношару адгезувалась на катетері. Як видно з таблиці 1, площа біоплівкового росту *E. faecalis* на 24-ту годину інкубації складала 51,5 мкм².

На рисунку 1 видно окремі адгезовані клітини *E. faecalis* та їх наступний ланцюжковий ріст, а також утворення мікроколоній. Адгезованими ми вважали поодинокі розташовані клітини *E. faecalis*, відокремлені одна

від одної. Мікроколонії – невеличкі угруповання мікробів, розсіяні на поверхні катетера в точках адгезії, які їм передували (рис. 1).

Таблиця 1

Динаміка зростання площі біоплівкового росту *E. faecalis* на поверхні силіконового катетера

Години інкубації силіконового катетера	Рисунок	Площа біоплівкового росту <i>E. faecalis</i> , мкм ²
24	1	51,5
48	2	231,5
72	3	1922,8

Через 48 годин площа біоплівкового росту *E. faecalis* збільшилась до 231,5 мкм². Інкубація фрагментів силіконового катетера на 48-му годину викликала до об'єднання мікроколоній клітин *E. faecalis* у скупчення, «агломерати» (рис. 2).

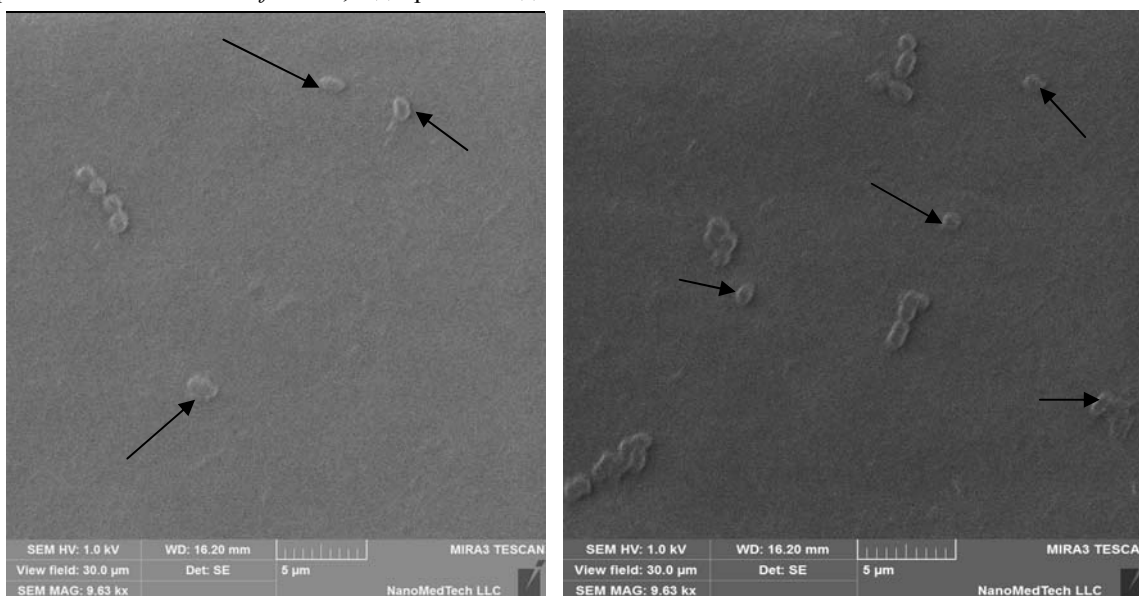


Рис. 1. Адгезія клітин *E. faecalis* усередині силіконового катетера *in vitro* через 24 години: стрілками відмічено адгезію клітин *E. faecalis*

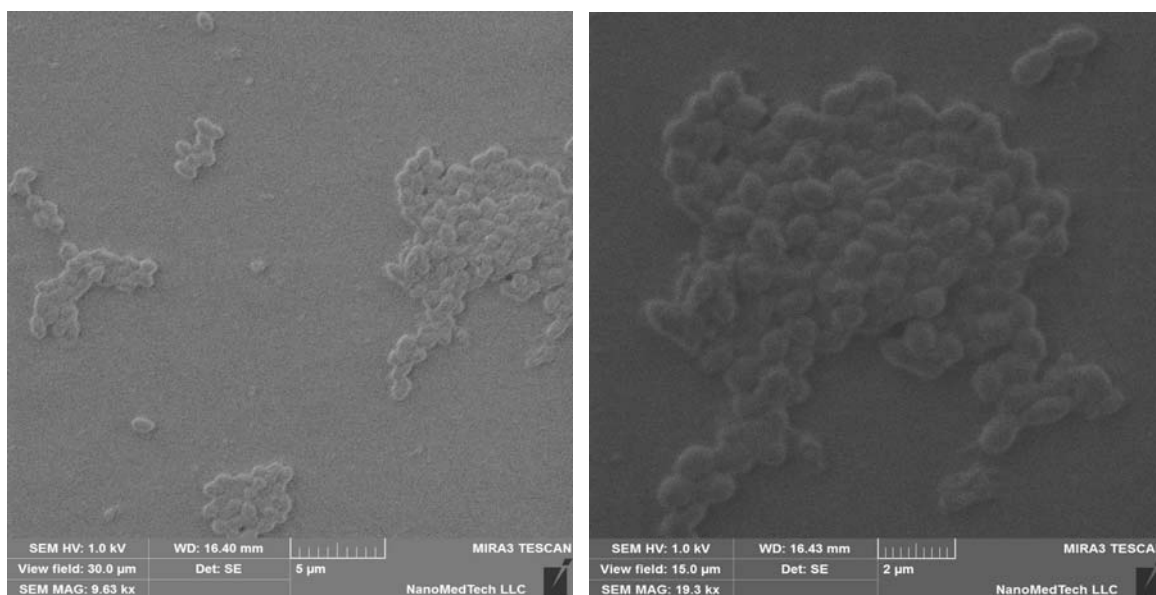


Рис. 2. Утворення агломератів *E. faecalis* усередині силіконового катетера *in vitro* через 48 годин

У деяких ділянках між агрегатами залишалися окремі мікроколонії клітин *E. faecalis* (рис. 2). Згідно з нашими спостереженнями, агрегати характеризуються поділом клітин *E. faecalis* із мікроколоній, що передують їм.

Електронномікроскопічна картина оброщування чітко відрізняється від адгезії. Коли відбувається адгезивна контамінація поверхні, мікроорганізми дифузно

розкидані по поверхні та не стикаються один з одним (рис. 1). Кардинальною ознакою біоплівкоутворення є щільне розташування мікробних клітин, оскільки виникає через клітинний поділ упродовж 48 годин (рис. 2). Через 72 години інкубації площа біоплівкового росту *E. faecalis* збільшилась до 1 922,8 мкм². На рисунку 3 зафіксоване щільне оброщення поверхні досліджуваного катетера з нашаруванням бактерій.

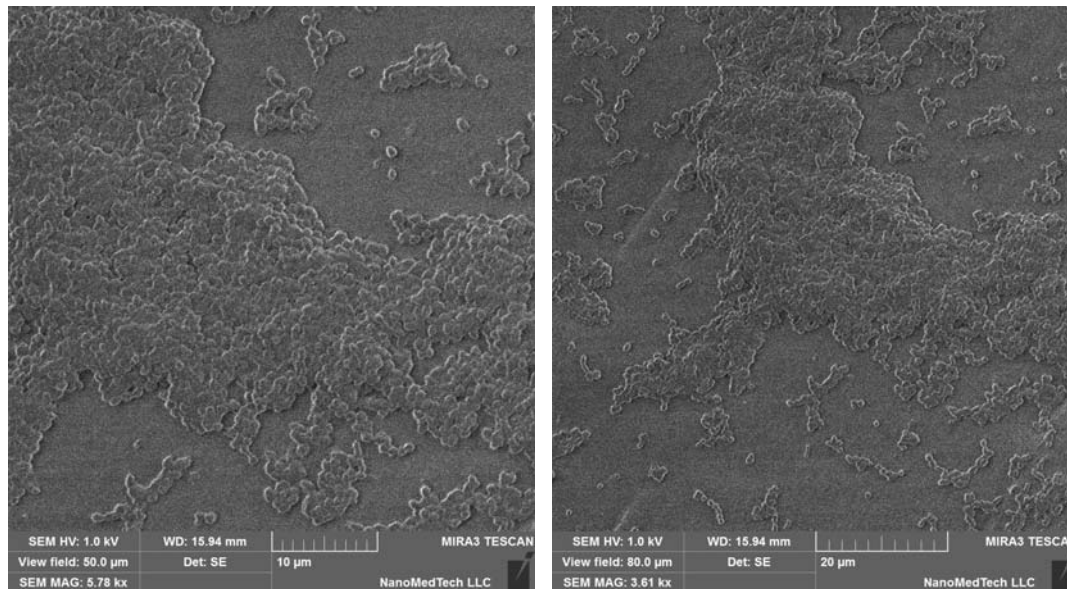


Рис. 3. Біоплівковий ріст *E. faecalis* на поверхні силіконового катетера *in vitro* через 72 години

Наведені результати отримано на фрагментах катетерів, занурених у бульйон у вертикальному положенні. Така орієнтація виключила осадження мікробів за рахунок седиментації, тобто за дії сили тяжіння. Адже відомо, що після логарифмічної фази та досягнення М-концентрації вже за лічені години починається відмирання мікробів і можливе їх осадження. Тому отримані результати свідчать про утворення біоплівки, а не осад змертвілих мікробів.

Звертаємо увагу на те, як розташовані клітини в мікроколоніях, агрегатах і розвинених біоплівках, наведених на рисунках 1, 2 та 3: мікробні клітини щільно прилягають одна до одної, що є наслідком їх поділу під час розмноження. Ця ознака, на наш погляд, характерна, оскільки дає змогу передбачити біоплівкоутворення на початкових стадіях, наприклад, коли тільки починають утворюватись мікроколонії. Та сама ознака дає можливість відрізнити біоплівку від мікробного осаду іншого походження.

В означенні CDC записано (Salmanov et al., 2012), що «біоплівки є формою групованого існування мікроорганізмів, вкритих екзополімерною оболонкою, які утворюються як на природних, так і штучних (неживих) поверхнях». Із цим означенням важко погодитись, тому що тоді, наприклад, центрифугат рідкої культури, або мікробний осад на поверхні мембранного фільтра теж треба вважати «біоплівкою».

Із наших досліджень випливає, що біоплівка є «способом оброщення штучних і природних поверхонь мікроорганізмами, які утримуються на них за рахунок екзополімерних оболонок». Ознака оброщення – щільне розташування мікробних клітин. Крім переваги чисто

біологічної ознаки («оброщення»), запропоноване визначення не вимагає ніяких додаткових ознак на зразок товщини, протяжності, розмірів плівки, потреба в яких неодмінно виникає у разі застосування такого загальновідомого поняття як «плівка».

Висновки

Характерна ознака біоплівкового росту *E. faecalis* на поверхні силіконового катетера – це щільне розташування мікробних клітин.

Біоплівкоутворення на катетерах започатковується адгезією *E. faecalis* наприкінці першої доби росту у бульйонній культурі, з початком утворення мікроколоній із кількох клітин.

Агрегати мікробних клітин, як один з етапів формування біоплівки, виникають на другу добу; виражена багатошарова форма формується на третю добу.

Вертикальна орієнтація фрагментів катетера у суспензії бульйонної культури дає змогу уникнути домішок седиментованих бактерій і зумовлює справжню адгезію та наступний біоплівковий ріст.

Біоплівковий ріст бактерій виду *E. faecalis* відбувається з розширенням площі оброщування катетерів з 51,5 до 1922,8 мкм² протягом 24–72 годин інкубації.

Бібліографічні посилання

Baldassarri, L., Creti, R., Montanaro, L., Orefici, G., Arciola, C.R., 2005. Pathogenesis of implant infections by enterococci. *Int. J. Artif. Organs*. 28(11), 1101–1109.

- Coenye, T., Nelis, H.J., 2010. *In vitro* and *in vivo* model systems to study microbial biofilm formation. *J. Microbiol. Meth.* 83, 89–105.
- Dobrohot'skyi, A.N., Khomyakov, J.N., Khomyakov, T.I., 2009. Epidemiyolohycheskoe znachenye formyrovaniya bioplenok v tehnycheskyh systemah [Epidemiological importance of biofilm formation in technical system]. *Life Without Dangers. Health. Prevention. Longevity* 1, 78–81 (in Russian).
- Donlan, R.M., 2011. Biofilm elimination on intravascular catheters: Important considerations for the infectious disease practitioner. *J. Clin. Infect. Dis.* 52(8), 1038–1045.
- Donlon, R.M., Costerton, J.W., 2002. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 167–193.
- Dunne, W.M., 2002. Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? *Clin. Microbiol. Rev.* 15(2), 155–166.
- Galkin, M.B., 2013. Formuvannya bioplivky *Pseudomonas aeruginosa* za prysutnosti vismutovykh kompleksy porfyrinyv [*Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in the presence of bismuth complexes of porphyrins]. *Instytut Mikrobiologii' i Virusologii' im. D.K. Zabolotnogo, Kyiv* (in Ukrainian).
- Garsin, D.A., Willems, R.J., 2010. Insights into the biofilm lifestyle of enterococci. *Virulence* 1(4), 219–221.
- Hall-Stoodley, L., Stoodley, L.P., 2009. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol.* 11(7), 1034–1043.
- Hooton, T.M., Bradley, F.S., Cardenas, D.D., 2010. Diagnosis, prevention, and treatment of catheter-associated urinary tract infection in adults: 2009 International clinical practice guidelines from the infectious diseases society of America. *Clin. Infect. Dis.* 50, 625–663.
- Hooton, T.M., Stamm, W.E., 1997. Diagnosis and treatment of uncomplicated urinary tract infection. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 11(3), 551–581.
- Jacobsen, S.M., Stickler, D.J., Mobley, H.L.T., Shirtliff, M.E., 2008. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 21(1), 26–59.
- Jacobsen, T.H., 2011. Qualitative and quantitative determination of quorum-sensing inhibition *in vitro*. *Quorum-sensing: Methods and protocols. J. Meth. Mol. Biol.* 692, 253–263.
- Janov'ska, V.V., 2009. Biologichni vlastyvoli enterokokiv yak zbudnykiv zapal'nyh procesiv sechovyvidnyh shljahiv [Biological properties of enterococci pathogens as inflammation of the urinary tract]. *Instytut Epidemiologii ta Infekciynyh Hvorob im. L.V. Gromashevs'kogo NAMN Ukrainy, Kyiv* (in Ukrainian).
- Kostrikova, J.A., 2011. *Enterococcus faecalis* jak potencijnyj infekciynyj patogen v klinici vnutrishn'oi' medycyny [*Enterococcus faecalis* infection as a potential pathogen in clinical internal medicine]. *Actual Problems of Modern Medicine* 36(4), 139–141 (in Ukrainian).
- Lysen'ki, P., Mykuc'ki, J., Sulik, A., 2005. Enterokoky: Stari bakterii', novi problemy [Enterococci: Old bacteria new problems]. *Laboratory Diagnosis* 3, 23–35 (in Ukrainian).
- Makushenko, O.S., 2002. Enterokoky: Ekologichne ta klinichne znachenja v suchasnyh umovah [Enterococci, environmental and clinical significance in modern conditions]. *Laboratory Diagnosis* 3, 43–45 (in Ukrainian).
- Mel'nikov, V.G., 2010. Poverhnostnye struktury grampozitivnyh bakterij v mezhkletochnom vzaimodejstvii i pljonkoobrazovanii [Surface structure of gram-positive bacteria in cell-cell interactions and biofilm]. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology* 2, 119–123 (in Russian).
- Mironenko, L.G., 2009. Stabil'nost' biologicheskikh svojstv *Enterococcus faecium* v processe kriokonservirovaniya [The stability of the biological properties of *Enterococcus faecium* in the process of cryopreservation]. *Metody Odezhanja Chystyh Kul'tur Mikroorganizmiv ta Ih Dovgostrokovogo Zberigannja v Kolekcijah. Znannja Ukrainy, Kyiv* (in Ukrainian).
- Mohamed, J.A., Huang, D.B., 2007. Biofilm formation by enterococci. *J. Med. Microbiol.* 56(12), 1581–1588.
- Mohamed, J.A., Huang, W., Nallapareddy, S.R., Teng, F., Murray, B.E., 2004. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect. Immun.* 72(6), 3658–3663.
- Mohamed, J.A., Murray, B.E., 2005. Lack of correlation of gelatinase production and biofilm formation in a large collection of *Enterococcus faecalis* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 43(10), 5405–5407.
- Pace, J.L., Rupp, M.E., Finch, R.G., 2006. Biofilms, infection, and antimicrobial therapy. *Taylor Francis Group*.
- Pascual, A., 2002. Pathogenesis of catheter-related infections: Lessons for new designs. *Clin. Microbiol. Infect.* 8(5), 256–264.
- Polishchuk, O.I., Mironenko, L.G., Glushkevych, T.G., Janov'ska, V.V., Pokas, O.V., Peretjatko, O.G., 2009. Metody vydilennja ta identyfikacii' enterokokiv [The methods of isolation and identification of enterococci]. *Znannja Ukrainy, Kyiv* (in Ukrainian).
- Saint, S., Chenoweth, C.E., 2003. Biofilms and catheter-associated urinary tract infections. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 17, 411–432.
- Salmanov, A.G., Marijevs'kyj, V.F., Bojko, V.V., Ioffe, I.V., Taraban, I.A., 2012. Antybiotykozeystentnist' v hirurgii [Antibiotic resistance in surgery]. *HTMT, Kharkov* (in Ukrainian).
- Seno, Y., Kariyama, R., Mitsuhashi, R., Monden, K., Kumon, H., 2005. Clinical implications of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in the urinary tract. *Acta. Med. Okayama* 59(3), 79–87.
- Sernjak, J.P., Fukszon, A.S., Roshyn, J.V., Kryshchyn, M.V., 2005. Problema kateter-associovanyh infekciy mochevogo trakta y bakteryal'nyh byologicheskych plenok v sovremennoj urologii [The problem of catheter-associated urinary tract infections and bacterial biological biofilm in modern urology]. *Zdorov'e Muzhchyny* 2, 40–44 (in Russian).
- Synetar, E.O., Avdijejeva, L.V., Skoryk, M.A., Brych, O.I., 2014. Formuvannya bioplivky *Candida albicans* na poverhni medychnyh kateteriv: Doslidzhennja *in vitro* [*Candida albicans* biofilm formation on the surface of medical catheters: An *in vitro* study]. *Dovkillja ta Zdorov'ja* 68(1), 28–32 (in Ukrainian).
- Zhal'ko-Tytarenko, V.P., 1981. Mehanyzm prykreplenyja shygell k slyzystoj obolochke kyshechnyka [*Shigella* attachment mechanism to the intestinal mucosa]. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology* 8, 73–88 (in Russian).

Надійшла до редколегії 06.08.2015



УДК 616.613/.617-007.271-073.48

Ефективність різних методів корекції стриктури пієлоуретерального сегмента за даними діуретичної ультрасонографії

Д.З. Воробець

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Львів, Україна

Запропоновано методику оцінювання ефективності відкритої та лапароскопічної пієлопластики, а також ендouroлогічних паліативних методів – лазерної резекції, балонної дилатації та ендопієлотомії, яка полягає у визначенні анатомо-функціональних властивостей миски нирки та пієлоуретерального сегмента за допомогою ультразвукової діагностики при форсованому діурезі. Вивчали зміни площі миски нирки, швидкість постфуросемідового приросту площі миски нирки, швидкість її дренивання, зміни діаметра пієлоуретерального сегменту. Такий методичний підхід неінвазивний, інформативний і простий у виконанні. Методика діуретичної ультрасонографії полягає у внутрішньовенному введенні фуросеміду (0,5 мг/кг) через 30–40 хв після водного навантаження (10 мг/кг) і у динамічній реєстрації змін співвідношення поперечної площі миски на етапах проведення фармакотесту через певний часовий інтервал (0, 15 та 40 хв). «Фуросемідний тест» вважають позитивним за T_n до 20 хв – часовий інтервал, необхідний для повернення розмірів миски до вихідних значень. Якщо T_n перевищує 30 хв, тест вважають негативним, що свідчить про «обструкцію виходу». Використання відсоткового співвідношення максимальної поперечної площі після введення фуросеміду до вихідної площі до ін'єкції діуретика інформативніше, ніж оцінювання обструкції за одиничними величинами сонографічних показників. Діуретична ультрасонографія в амбулаторних умовах дає змогу діагностувати органічний характер обструкції. Застосування цього неінвазивного методу особливо актуальне в різні терміни після оперативної корекції гідронефрозу, оскільки забезпечує контроль за відновленням евакуаторної функції оперованої та контрлатеральної нирок.

Ключові слова: пієлопластика; ендouroлогічні паліативні методи; пієлоуретеральний сегмент; ультрасонографія

Effectiveness of different correction methods of pyeloureteral segment according to the data of diuretic ultrasonography

D.Z. Vorobets

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

Methods of estimation of effectiveness of the open and laparoscopic pyeloplasty, as well as endo-urological palliative methods – laser resection, balloon dilatation and endopyelotomy, which determine the anatomical and functional peculiarities of renal pelvis and pyeloureteral junction with the help of ultrasound diagnostics during the forced diuresis, have been proposed. Changes of the area of renal pelvis, the velocity of post-furosemide increase of the scope of renal pelvis, rate of its drainage, changes in the diameter of pyeloureteral junction have been studied. This methodical approach is non-invasive, informative and simple in application. It is shown that dispersions of samples of patients after the open surgery do not differ from the dispersions of samples of the same patients before the operation on such parameters as areas of renal pelvis before the induction of furosemide, areas of renal pelvis after 15 minutes administration of furosemide, the rate of drainage after furosemide, the original diameter of pyeloureteral junction. This may indicate the stability of surgery results. For example, the larger renal pelvis by kidney size before the operation corresponded to the larger designed pelvis after the operation; renal pelvis drained faster before the operation, features faster drainage after the operation as well. Variation in the areas of renal pelvis which decreased in 40 minutes after furosemide, percent rate of longitudinal pelvis area, rate of after-furosemide increase in pelvis area, diameter of pyeloureteral junction in 15 minutes administration of furosemide after the open pyeloplasty was significantly different compared to the variation in the same parameter for the same patients before the operations. More substantial difference was observed in the same patients

before and after Anderson-Hynes surgery by parameters of relative rate of after-furosemide drainage of pelvis and increase in diameter of pyeloureteral junction after 15 min administration of furosemide. That is, the same principle of operation provides similar results by anatomical parameters, such as size and diameter of pyeloureteral junction, but quite different results by functional parameters which reflect the possibility of draining of kidney in forced diuresis. Successful open pyeloplasty leads to a significant decrease in the pelvis area at different time intervals after furosemide administration, the relative increase in the pelvis area on the background of the induction of diuresis, rate of pelvis drainage, increase (normalization) in diameter of pyeloureteral junction, including the larger (better) gap of pyeloureteral junction after administration of diuretic. Concerning laparoscopic pyeloplasty, the dispersion of mean values of S, SPR, Vpr, V, VOT, D, DD after the operation was significantly different from those before the operation. This means that as in the case with open surgery, satisfactory clinical results such as reduction in renal pelvis and restoring the passage of urine through sufficient diameter pyeloureteral junction after laparoscopic pyeloplasty lead nevertheless to significant differences in the digital parameters during the objectification of operation effect by means of diuretic ultrasonography using furosemide-induced diuresis. Endoscopic surgery such as laser resection, endopyelotomy and balloon dilatation stably provides similar results (equal variances) by such parameters as pelvis area, which decreases in 40 min after furosemide administration, formation of the wide enough diameter of pyeloureteral junction and its minor fluctuations with the diuretic load. The decrease to normal parameters of all planes of renal pelvis (both before and after loading) and significant improvement of pelvis drainage (parameters responsible for the functional state of kidneys and pyeloureteral junction) indicate the success of palliative surgery in elimination of the narrowing of pyeloureteral junction.

Keywords: pyeloplasty; endo-urological palliative methods; pyeloureteral junction; ultrasonography

Вступ

Об'єктивним критерієм ефективного усунення обструкції сечовода після ендохірургічного втручання може бути нормалізація ультразвукових показників діагностики порушення уродинаміки, які свідчать про зниження внутрішньомискового тиску та відновлення потоку сечі через пієлоуретеральний сегмент (ПУС). Оперативне відновлення прохідності сечовода різними методами уретеропієлопластики у частини пацієнтів не дає усунення гідронефрозу, зберігаються такі ж порушення уродинаміки, як і до операції (Autorino et al., 2014; Laudner et al., 2014; Zargar et al., 2015). Більшість поширених методик (екскреторна урографія, радіоізотопна реографія, ультрасонографія, перфузійний тест Вайтейкера) непрямі, і за ними неможливо точно визначити першопричину порушення уродинаміки, а, отже, і виявити найкращий метод корекції (Dattani, 1996). Діуретична ультрасонографія – неінвазивний функціональний метод, що дає змогу вивчати уродинаміку в зоні мисково-сечовідного сегмента, визначити її кількісні показники з високою чутливістю та специфічністю в діагностиці причин гідронефрозу (Bondarenko, 2007).

Мета дослідження – оцінити функціональні результати інвазивної та малоінвазивних методик лікування гідронефрозу, спричиненого вадою ПУС, за вихідними та віддаленими результатами діуретичної ультрасонографії.

Матеріал і методи досліджень

Хворих зі стриктурою ПУС поділено залежно від проведеного виду лікування: 55 виконано відкриту пієлопластику за Хайнсом – Андерсеном (ВПП), 46 – лапароскопічну пієлопластику (ЛПП); результати обстеження та лікування 26 пацієнтів після ендопієлотомії (ЕПТ), 17 після балонної дилатації (БД) та 13 після лазерного розсічення (ЛР) об'єднано в одну групу ендуроологічних методик (ЕО) із 56 осіб для більшої достовірності у процесі проведення статистичного аналізу.

Виконуючи діуретичну ультрасонографію, користувались методиками Rostovskaia et al. (2003) та Grimsby et al. (2015). Розраховано такі параметри: SPR (%) – відсоткове збільшення площі перерізу миски; V_{pr} (мм²/хв) – швидкість постфуросемідового приросту площі миски

обчислювали як $(S_{max}-S)/15$ хв, де S_{max} – площа миски через 15 хв після введення фуросеміду, S – вихідна площа миски; V (мм²/хв) – швидкість постфуросемідового дренивання миски, обчислювали як $(S_{max}-S_{40})/40$ хв, де S_{40} – площа миски через 40 хв після введення фуросеміду; D (мм) – вихідний діаметр ПУС; DD (мм) – діаметр ПУС через 15 хв після введення фуросеміду; DPR (мм) – приріст діаметра ПУС через 15 хв після введення фуросеміду; DPR% – відсоткове збільшення діаметра ПУС. Діуретична ультрасонографія – неінвазивний неекспериментальний метод дослідження.

Усі обстежені дали згоду на обробку отриманих результатів відповідно до редакції наказу МОЗ України від 08.08.2014 р. № 549 та установчих документів із біоетики.

По кожному параметру проведено детальний аналіз, виконано розрахунки статистичних характеристик (дисперсії, середнього значення, стандартного відхилення). Для візуальної подачі відхилень застосовували лінійні графіки. Для встановлення відмінностей між даними до та після оперативного втручання застосовували t-тест Стьюдента (після виконання тесту Фішера – Снедекера на гомоскедастичність вибірок). Для усіх висновків рівень значущості складав 5%. Для статистичного аналізу вихідних даних усіх досліджень, математичних розрахунків, графічного подання вихідних даних і результатів аналізу використано програмне забезпечення SPSS17.

Результати та їх обговорення

Дисперсії вибірок хворих після відкритих операцій практично не відрізнялись від дисперсії вибірок цих же хворих до операцій за параметрами: площі миски до індукції фуросемідом, площі миски через 15 хв після введення фуросеміду, швидкістю постфуросемідового дренивання миски, вихідним діаметром ПУС ($P > 0,10$) (табл. 1). Це може свідчити про стабільність результатів оперативного втручання (наприклад, більша миска за розмірами нирки до операції відповідала більшій сконструйованій мисці після операції, менша – меншій; що швидше дренивалась миска до операції – то швидше вона дренивалась і після). Отримані дані підтверджують необхідність функціональних резервів роботи дренажної системи нирки, а не лише її анатомічний стан. Варіація значень площі миски нирки, яка зменшилась через 40 хв після

фуросеміду, процентного приросту поздовжньої площі миски, швидкості постфуросемідового приросту площі миски, діаметра ПУС через 15 хв після уведення фуросеміду після відкритої пієлопластики суттєво відрізнялися від варіації цих же значень у цих же хворих до операції (F-тест, $P = 0,035$). Ще істотніше відрізнялись ті ж хворі до та після операції Хайнса – Андерсена за параметрами відносної швидкості постфуросемідового дренивання миски та збільшенням діаметра ПУС через 15 хв після уведення фуросеміду ($P < 0,0001$).

Таблиця 1

Показники діуретичної ультрасонографії у групі хворих, котрим виконано відкриту пієлопластику, порівняно з показниками цієї ж групи до операції (n = 55)

Показники діуретичної ультрасонографії	F-критерій	F-тест	Різниця середніх значень
S , мм	0,657	0,126	-2,545
S_{\max} , мм	0,707	0,207	-4,564
S_{40} , мм	0,580	0,047	-3,745
SPR, %	2,042	0,010	-6,851
$V_{\text{др}}$, мм ² /хв	1,787	0,035	-0,135
V , мм ² /хв	1,071	0,801	-0,021
VOT, %	3,181	<0,0001	2,182
D, мм	0,757	0,310	0,527
DD, мм	0,545	0,028	0,615
DPR, мм	0,193	<0,0001	0,051
DPR, %	0,422	0,002	-1,279

Примітка: S – вихідна площа миски; S_{\max} – площа миски через 15 хв після уведення фуросеміду; S_{40} – площа миски через 40 хв після уведення фуросеміду; SPR% – відсоткове збільшення площі перерізу миски; VOT (%) = $V \cdot 100 / V_{\text{др}}$, відносна швидкість постфуросемідового дренивання миски; DPR% – відсоткове збільшення діаметра ПУС; $V_{\text{др}}$ (мм²/хв) – швидкість постфуросемідового приросту площі миски; V (мм²/хв) – швидкість постфуросемідового дренивання миски; D (мм) – вихідний діаметр ПУС; DD (мм) – діаметр ПУС через 15 хв після уведення фуросеміду; DPR (мм) – приріст діаметра ПУС через 15 хв після уведення фуросеміду.

Однаковий принцип операції забезпечує подібні результати за анатомічними параметрами, такими як розмір миски та діаметр пієлоуретерального сегмента,

але зовсім різні результати за функціональними параметрами, які відображають можливість дренивання нирки при форсованому діурезі. Успішно проведена відкрита пієлопластика зумовлює достовірне (рис. 1) зменшення площі миски, площі миски через різні проміжки часу після уведення фуросеміду, відносно збільшення площі миски на тлі індукції діурезу, швидкості її дренивання, збільшення (нормалізації) діаметра пієлоуретерального сегмента, зокрема, більший (кращий) просвіт ПУС після уведення діуретика ($P < 0,0001$). Все ж, у наших хворих операція істотно не вплинула на відносну швидкість постфуросемідового дренивання миски ($P = 0,167$). Хорошою ознакою можна вважати незначне відсоткове збільшення діаметра ПУС після ін'єкції фуросеміду, тобто новостворені сегменти добре справлялись із відведенням сечі при навантаженні.

Щодо лапароскопічної пієлопластики, після операції дисперсії середніх значень S , SPR, $V_{\text{др}}$, V , VOT, D, DD суттєво відрізнялися від таких до операції, із надійністю F-тесту $p = 0,041$ (табл. 2). Також дисперсії помірно відрізнялися за параметрами S_{\max} та S_{40} , (F-тест, $p = 0,075$ та $0,096$ відповідно). Це означає, що подібно як і при відкритому оперативному втручанні, задовільні клінічні результати зі зменшення миски нирки та відновлення пасажу сечі через достатній діаметр ПУС після ЛПП все ж викликають значну розбіжність цифрових параметрів під час об'єктивізації ефекту від операції за допомогою діуретичної ультрасонографії при фуросемід-індукованому діурезі. Тобто однакові операції забезпечують різні анатомо-функціональні особливості нирок у різних хворих. Подібними були лише дисперсії абсолютного та відносного приросту діаметра ПУС через 15 хв після введення фуросеміду. Такий результат вірогідно стабільніший після ЛПП, ніж після ВПП.

Лапароскопічна пієлопластика у вибірці хворих зумовлювала вірогідно значуще зменшення розмірів миски як до, так і після уведення фуросеміду, процентного приросту площі миски, швидкості постфуросемідового приросту площі, швидкості її дренивання, а також збільшення діаметра пієлоуретерального сегмента за $P < 0,0001$, T-значенні $> 7,643$ (рис. 2).

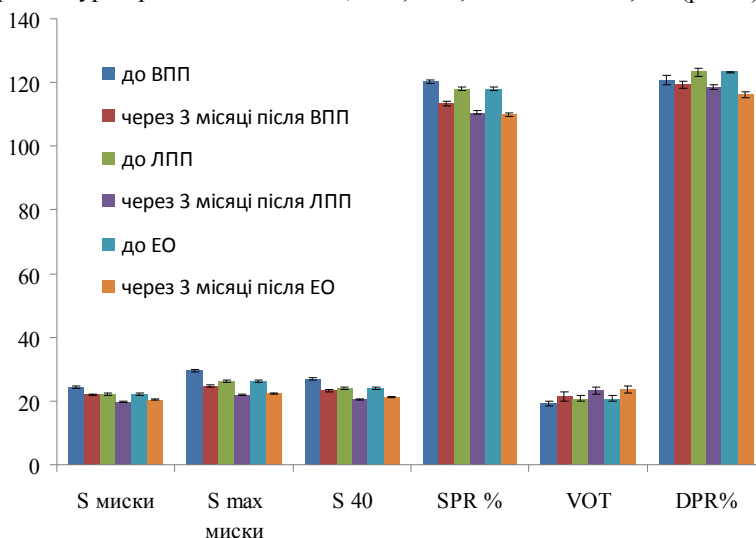


Рис. 1. Показники діуретичної ультрасонографії у групі хворих ($M \pm m$, $n = 55$), яким виконано відкриту пієлопластику, порівняно з показниками цієї ж групи до операції: назви характеристик див. табл. 1

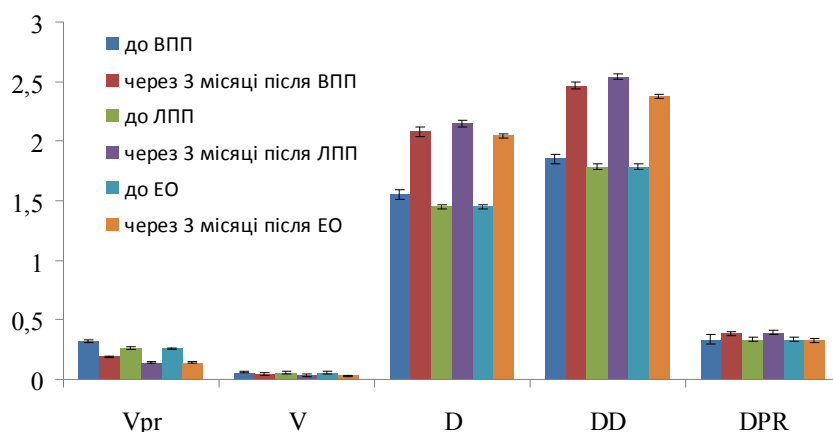


Рис. 2. Показники діуретичної ультрасонографії у групі хворих ($M \pm m$, $n = 46$), яким виконано лапароскопічну пієлопластику, порівняно з показниками цієї ж групи до операції: назви характеристик див. табл. 1

Таблиця 2

Показники діуретичної ультрасонографії у групі хворих, яким виконано лапароскопічну пієлопластику, порівняно з показниками цієї ж групи до операції ($n = 46$)

Таблиця 3

Показники діуретичної ультрасонографії у групі хворих, котрим виконано ЛР, ЕП, БД, порівняно з показниками цієї ж групи до операції ($n = 56$)

Показники діуретичної ультрасонографії	F-критерій	F-тест	Різниця середніх значень
S , мм	0,352	0,041	-2,479
S_{max} , мм	0,307	0,075	-4,356
S_{40} , мм	0,354	0,096	-3,439
SPR, %	0,297	<0,0001	-7,355
V_{pr} , мм ² /хв	0,230	<0,0001	-0,125
V , мм ² /хв	0,315	0,001	-0,023
VOT, %	1,406	0,034	2,327
D , мм	1,656	0,026	0,696
DD, мм	1,029	0,003	0,756
DPR, мм	0,590	0,263	0,060
DPR, %	0,275	0,594	-4,756

Примітка: назви характеристик див. табл. 1.

Ендоскопічні операції, такі як лазерна резекція, ендопієлотомія та балонна дилатація, стабільно забезпечували подібні результати (однакові дисперсії) за показниками: площі миски, що зменшилась через 40 хв після уведення фуросеміду, створення достатньо широкого вихідного діаметра ПУС та його незначних коливань при діуретичному навантаженні (табл. 3).

Відносно подібні (стійкі) результати після ендоскопічного розсічення стриктури спостерігали за розвантаженням (зменшенням площі) миски, зокрема і через 15, а особливо 40 хв після фуросемідного навантаження (F-тест, $P = 0,091, 0,058, 0,133$ відповідно). Істотно різнились можливість компенсаторного розширення миски, швидкість цього розширення, а особливо поліпшення можливості дренажування нирки (F-тест, $P = 0,009, 0,002, <0,0001$ відповідно).

Про успішно проведені паліативне оперативне втручання з ліквідації звуження пієлоуретерального сегмента свідчить зменшення до нормальних параметрів усіх площин миски нирки (як до, так і після навантаження), а також вірогідне поліпшення дренажування миски (параметрів, які відповідають за функціональний стан нирки та ПУС) за $P < 0,017$ (рис. 1, 2).

Показники діуретичної ультрасонографії	F-критерій	F-тест	Різниця середніх значень
S , мм	0,631	0,091	-1,821
S_{max} , мм	0,597	0,058	-3,768
S_{40} , мм	0,665	0,133	-2,786
SPR, %	0,491	0,009	-8,030
V_{pr} , мм ² /хв	0,436	0,002	-0,130
V , мм ² /хв	0,257	<0,0001	-0,025
VOT, %	1,704	0,051	2,710
D , мм	1,040	0,885	0,596
DD, мм	0,860	0,577	0,591
DPR, мм	0,939	0,817	-0,005
DPR, %	0,439	0,003	-7,075

Примітка: назви характеристик див. табл. 1.

Застосовуючи математичну модель основних закономірностей руху рідин, розробили новий спосіб оцінки даних діуретичної ультрасонографії, визначили ультразвукові параметри стану уродинаміки в ділянці ПУС у нормі та при патології, їх відповідність даним прямої пієломанометрії та морфологічним дослідженням операційного матеріалу при гідронефрозі (Bondarenko, 2007). Автор виявив чутливість 85,4%, специфічність 79,3% та інформативність 85,2% розробленого методу кількісної оцінки результатів ультрасонографії з фуросемід-інтенсифікованим діурезом для з'ясування причини обструкції приміскового відділу сечовода при гідронефрозі. Опрацьовані дані наших пацієнтів підтверджують діагностичну значущість УЗД у визначенні функціональної недостатності сечовода на доопераційному етапі (за дезадаптацією дренажної функції миски на тлі форсованого діурезу), що дає змогу обґрунтувати диференційний підхід до вибору методу хірургічної корекції. Вищенаведені факти підводять до необхідності ширшого впровадження цього неінвазивного методу для отримання ще достовірніших результатів на великій вибірці та призначення відповідного лікування з урахуванням синдромальних та етіопатогенетичних особливостей.

Висновки

Визначено ефективність малоінвазивних ендохірургічних технологій (балонної дилатації, ендопієлотомії, лазерної резекції), а також лапароскопічної та відкритої пієлопластики в корекції обструкції пієлоуретерального сегмента, із застосуванням порівняльного аналізу показників діуретичної ультрасонографії. Доведено, що усі оперативні методики, проведені за показаннями, забезпечують задовільну анатомію та функціональні властивості дренажної системи нирок, на що вказують нормалізація процентного приросту площі миски нирки, а також швидкості постфуроросемідового дренивання миски після збільшення діаметра пієлоуретерального сегмента.

Бібліографічні посилання

Autorino, R., Eden, C., El-Ghoneimi, R., 2014. Robot-assisted and laparoscopic repair of ureteropelvic junction obstruction: A systematic review and meta-analysis. *Eur. Urol.* 65, 430–452.

Bondarenko, S.G., 2007. *Differentsirovannyi podhod k vyboru sposoba maloinvazivnoj hirurgicheskoy korrektsii gidronefroza* [Differential approach to miniinvasive surgical hydronephrosis correction]. Volgograd Gos. Med. Univ., Volgograd (in Russian).

Dattani, P., 1996. Intravesical uretero-ureterostomy for vesico-ureteric reflux (VUR) in duplex ureters: A method for the correction of VUR. *Br. J. Urol.* 78(6), 942–944.

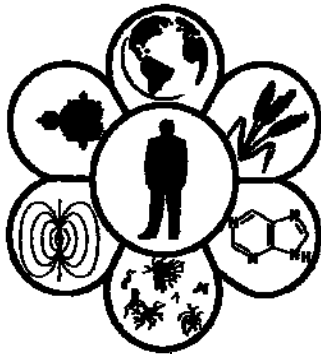
Grimsby, G.M., Jacobs, M.A., Gargollo, P.C., 2015. Success of laparoscopic robotic assisted approaches to UPJ obstruction based on pre-operative renal function. *J. Endourol.* 1, 112–115.

Laydner, H., Akca, O., Autorino, R., Eyraud, R., Zargar, H., Brandao, L., 2014. Perineal robot-assisted laparoscopic radical prostatectomy: Feasibility study in the cadaver model. *J. Endourol.* 8, 35–42.

Rostovskaia, V.V., Kazanskaia, I.V., Babanin, I.L., 2003. Clinical significance of profilometry of the pyeloureteral segment in congenital hydronephrosis in children. *Urologia* 2, 46–50.

Zargar, H., Isac, W., Autorino, R., Khalifeh, A., Nemer, O., Akca, O., 2015. Robot-assisted laparoscopic partial nephrectomy in patients with previous abdominal surgery: Single center experience. *Int. Med. Robot.* 19, 163–168.

Надійшла до редколегії 02.08.2015



УДК 579.695+579.222.2

Закономірності використання сульфат- і нітрат-іонів бактеріями *Desulfomicrobium sp. CrR3* та *Desulfovibrio desulfuricans Ya-11*

Л.С. Дорош, Т.Б. Перетятко, С.П. Гудзь

Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів, Україна

Охарактеризовано закономірності відновлення сульфатів та нітратів сульфатвідновлювальними бактеріями *Desulfomicrobium sp. CrR3* та *Desulfovibrio desulfuricans Ya-11*. У результаті відновлення сульфат-іонів у концентрації 10 мМ бактеріями *Desulfomicrobium sp. CrR3* та *D. desulfuricans Ya-11* у середовищі накопичується 5,0–6,8 мМ гідроген сульфід. За росту бактерій у середовищі з нітрат-іонами накопичувалися іони нітриту як проміжні та амонію як кінцеві продукти дисиміляційної нітра-редукції. Максимальну біомасу бактерії *Desulfomicrobium sp. CrR3* (3,8 г/л) та *D. desulfuricans Ya-11* (3,2 г/л) накопичували за наявності нітрат-іонів, порівняно із сульфат-іонами. *Desulfomicrobium sp. CrR3* ефективніше використовували нітрат-іони як акцептори електронів, ніж *D. desulfuricans Ya-11*, про що свідчить інтенсивність нітра-редукції та максимальна біомаса бактерій. За умов інкубування бактерії *Desulfomicrobium sp. CrR3* та *D. desulfuricans Ya-11* відновлювали і сульфати, і нітрати. Ефективність використання сульфат- і нітрат-іонів як акцепторів електронів бактеріями *Desulfomicrobium sp. CrR3* за концентрації 10 мМ становила 62% та 93%, відповідно. Бактерії *D. desulfuricans Ya-11* відновили лише 86% сульфатів та 73% нітратів.

Ключові слова: сульфатвідновлювальні бактерії; сульфатредукція; нітра-редукція

The patterns of utilization of sulfate and nitrate ions by bacteria *Desulfomicrobium sp. CrR3* and *Desulfovibrio desulfuricans Ya-11*

L.S. Dorosh, T.B. Peretyatko, S.P. Gudz

Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, Ukraine

The aim of this work was to study the patterns of utilization of sulfate and nitrate ions by bacteria *Desulfomicrobium sp. CrR3* and *Desulfovibrio desulfuricans Ya-11* under different cultivation conditions. Chromium-resistant sulfate-reducing bacteria *Desulfomicrobium sp. CrR3* and *D. desulfuricans Ya-11* were used. Bacteria were grown in Posgate C medium at 30°C in 25 ml test tubes under anaerobic conditions. To test the ability of bacteria *Desulfomicrobium sp. CrR3* and *D. desulfuricans Ya-11* to use various substances and ions as electron acceptors, they were incubated in potassium phosphate buffer (10 mM, pH 7) with sulfate, nitrate and nitrite ions in concentrations of 1, 5 and 10 mM. At various concentrations of sulfate ions (1, 5 and 10 mM), biomass of bacteria *Desulfomicrobium sp. CrR3* and *D. desulfuricans Ya-11* increased with the increase of concentration of electron acceptor, the maximum biomass was equal to 3.65 and 3.05 g/l at 10 mM of sulfate ions, respectively. With the increase of concentration of nitrate ions to 5 mM the biomass increased by 70% compared to the biomass of bacteria grown in the medium with nitrate ions at the concentration 1 mM. The maximal biomass was determined in the presence of nitrate ions at a concentration of 10 mM – 3.78 and 3.15 g/l for bacteria *Desulfomicrobium sp. CrR3* and *D. desulfuricans Ya-11*, respectively. It is found, as a result of incubation of bacteria *Desulfomicrobium sp. CrR3* and *D. desulfuricans Ya-11*, that by introducing sulfate ions at a concentration of 5 mM bacteria *Desulfomicrobium sp. CrR3* used 98%, while *D. desulfuricans Ya-11* used only 86%, and under these conditions hydrogen sulfide has been detected in the incubation mixture at the concentration of 0.8–1.0 mM. In the presence of 10 mM of sulfate ions efficiency of electron acceptors utilization was equal to 85–95% for both strains. Bacteria *Desulfomicrobium sp. CrR3* intensively used nitrate ions, the efficiency of electron acceptor utilization at 10 mM was equal to 92.8%, while for *D. desulfuricans Ya-11* the usage percent amounted to 73% only, and nitrite ions were not observed after three days of incubation. It is established that bacteria *Desulfomicrobium sp. CrR3* and *D. desulfuricans Ya-11* are capable to use sulfate and nitrate ions as electron acceptors in the process of the dissimilatory sulfate and nitrate reduction. As a result of the study of patterns of nitrate utilization by

Desulfomicrobium sp. CrR3 and *D. desulfuricans* Ya-11 it is found that bacteria use nitrate as a nitrogen source for biosynthetic processes, and as electron acceptors. Under these conditions nitrates are reduced to nitrites, and then they are turned to ammonium.

Keywords: sulfate-reducing bacteria; sulfate reduction; nitrate reduction

Вступ

Забруднення водного та ґрунтового середовища оксоаніонами сульфуру та нітрогену змушує шукати способи очищення довкілля від цих поллютантів. Нітрати, нітрити та сульфати належать до небезпечних забруднювачів, оскільки висока їх концентрація у ґрунтах та водоймах спричинює зниження вмісту кисню у ґрунті, посилення проявів парникового ефекту та утворення гідроген сульфід (Dzhigireji, 2004). Для очищення стічних вод застосовують переважно методи біологічного очищення, що пояснюється не тільки особливостями складу стічних вод, а й економічною доцільністю застосування біотехнології. Через високі експлуатаційні витрати та проблемність утилізації відходів, що утворюються у процесі очищення, фізико-хімічні методи недоцільні. Їх застосовують переважно для попереднього очищення та у складних кліматичних умовах (Dzhigireji, 2004).

Анаеробне очищення стічних вод від поллютантів різної природи за участю мікроорганізмів використовується уже понад 100 років. Переваги анаеробних процесів – це мала потреба у поживних речовинах завдяки нагромадженню анаеробами невеликої біомаси; зниження витрат електроенергії та, на відміну від аеробних систем, анаеробні не дуже вибагливі до обмеження акцептора електронів, тому завантаження систем може бути вищим, ніж для аеробних систем. Сульфатвідновлювальні бактерії розглядаються як одна з найперспективніших груп мікроорганізмів у процесах анаеробного очищення вод від сполук сульфуру та нітрогену (Okabe et al., 2003; Peretyatko et al., 2009).

Сульфатвідновлювальні бактерії здатні використовувати різні оксоаніони (сульфати, нітрати, нітрити) як акцептори електронів у процесі окиснення H_2 та органічних сполук (Kosinska and Miskiewicz, 1999; Polanco et al., 2001; Plugge et al., 2011). Здатність сульфатвідновлювальних бактерій використовувати нітрат як акцептор електронів описана у деяких штамів, які належать до родів *Desulfovibrio* (Marietou et al., 2005), *Desulfobacterium* (Szewzyk and Pfennig, 1987), *Desulfolobus* (Mohanakrishnan et al., 2011). Умови культивування бактерій можуть впливати на здатність клітин до нітратредукції (Bratcova et al., 2002). Роль процесу нітратредукції у життєдіяльності сульфатвідновлювальних бактерій вивчено недостатньо. У літературі описано різні шляхи регуляції нітратредукції у сульфатвідновлювальних бактерій (Tarasova et al., 2009).

Мета даної статті – з'ясувати закономірності використання сульфат- і нітрат-іонів бактеріями *Desulfomicrobium sp. CrR3* та *D. desulfuricans* Ya-11 за різних умов культивування.

Матеріал і методи досліджень

У роботі використовували сульфатвідновлювальні бактерії *Desulfomicrobium sp. CrR3* (Sholyak et al., 2013) та *D. desulfuricans* Ya-11 (Peretyatko et al., 2006). Бактерії культивували у середовищі Постгейта С за температури

30 °C у пробірках, об'ємом 25 мл, за анаеробних умов. Анаеробні умови забезпечували кип'ятінням і швидким охолодженням середовища культивування, що зумовлює зменшення в ньому розчинного кисню, а також додаванням аскорбінової кислоти чи Na_2S . Пробірки повністю заповнювали середовищем і закривали гумовими корками (Postgate, 1984).

Для дослідження здатності використовувати сульфати та нітрати бактерії культивували упродовж 6 діб у модифікованому середовищі Постгейта С такого складу (г/л): калій дигідрофосфат – 0,5, кальцій хлорид гексагідрат – 0,06, магній хлорид гексагідрат – 0,055, натрій лактат – 6, дріжджовий екстракт – 1, натрій цитрат дигідрат – 0,3, рН середовища – 7,6. Нітрат і сульфат вносили після стерилізації у формі водних розчинів, KNO_3 , $NaNO_2$ та $Na_2SO_4 \cdot 10H_2O$, відповідно. Початкова концентрація клітин становила 0,2 г/л.

Для перевірки здатності бактерій *Desulfomicrobium sp. CrR3* та *Desulfovibrio desulfuricans* Ya-11 використовувати різні іони як акцептори електронів їх інкубували у калій фосфатному буфері (10 мМ, рН 7) із сульфатами, нітратами та нітритами у концентраціях 1, 5 та 10 мМ.

Біомасу визначали фотометрично на фотоелектроколориметрі КФК-3 (340 нм, кювета з оптичним шляхом 3 мм). Вміст сульфатів визначали турбідиметрично після їх осадження барій хлоридом. Для стабілізації суспензії використовували гліцерин (520 нм, кювета з оптичним шляхом 10 мм) (Pochvy. Metod opredelenie ionov sulfata v vodnoji vytiyazhke). Кількість гідроген сульфід визначали у культуральній рідині фотометрично з використанням п-амінодиметиланіліндигідрохлориду (665 нм, кювета з оптичним шляхом 30 мм) (Sugiyama, 2002). Вміст нітратів та нітритів визначали спектрофотометрично з використанням п-нафтилетилендіаміндихлориду (540 нм, кювета з оптичним шляхом 10 мм) (Granger et al., 1996). Концентрацію амонію визначали спектрофотометрично з використанням фенольного реактиву, натрій нітропрусиду та гіпохлориту натрію (640 нм, кювета з оптичним шляхом 10 мм) (Ivančić and Degobbi, 1984).

Досліди проводили в триразовій повторності. Результати наведені як середнє значення та стандартна похибка (Bailey, 1995; Isakova, 2009).

Результати та їх обговорення

У результаті дослідження здатності бактерій *Desulfomicrobium sp. CrR3* та *D. desulfuricans* Ya-11 відновлювати сульфати та нітрати встановлено, що кінцевими продуктами відновлення цих оксоаніонів є гідроген сульфід та амоній, відповідно. У таблиці 1 наведено результати досліджень, які свідчать про здатність бактерій *D. desulfuricans* Ya-11 та *Desulfomicrobium sp. CrR3* рости у середовищі з різними акцепторами електронів. Із цією метою бактерії *D. desulfuricans* Ya-11 та *Desulfomicrobium sp. CrR3* вирощували у середовищі Постгейта С, у якому сульфат-іони були замінені на нітрат-, нітрит-, хромат-іони та елементну сірку як потенційні акцептори електронів.

Таблиця 1

**Ріст бактерій у середовищі
з різними акцепторами електронів (n = 3)**

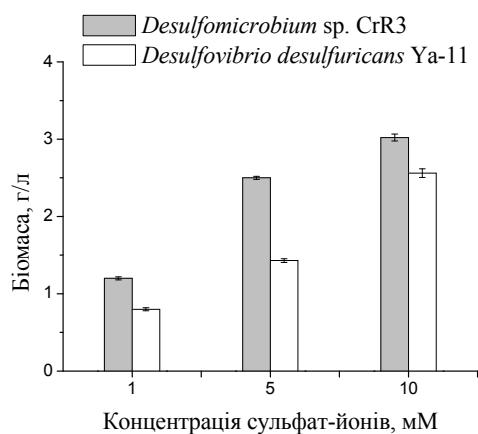
Акцептор електронів	Біомаса, г/л	
	<i>Desulfomicrobium sp. CrR3</i>	<i>D. desulfuricans sp. Ya-11</i>
SO ₄ ²⁻	3,14 ± 0,12	3,05 ± 0,03
S ⁰	1,37 ± 0,03	ріст відсутній
CrO ₄ ²⁻	3,60 ± 0,27	2,65 ± 0,23
NO ₃ ⁻	3,40 ± 0,07	3,15 ± 0,21
NO ₂ ⁻	1,08 ± 0,05	1,05 ± 0,03

За концентрації сульфатів 1 мМ біомаса клітин *Desulfomicrobium sp. CrR3* та *D. desulfuricans Ya-11* становила 1,2 та 0,8 г/л, відповідно, тоді як за концентрації 5 мМ сульфатів – 2,7 та 1,5 г/л (рис. 1а). Ефективність використання сульфатів бактеріями *Desulfomicrobium sp. CrR3* та *D. desulfuricans Ya-11* за вихідної концентрації 1 мМ становить 96% та 90% (рис. 1б). За умов підвищення концентрації сульфату до 10 мМ біомаса бактерій *Desulfomicrobium sp. CrR3* та *D. desulfuricans*

Ya-11 зростала до 3,2 та 3,0 г/л, відповідно (рис. 1а). Максимальний приріст біомаси спостерігали на третю – четверту добу культивування. Ефективність використання сульфатів бактеріями *Desulfomicrobium sp. CrR3* та *D. desulfuricans Ya-11* за вихідної концентрації 10 мМ становила 98–100% (рис. 1б).

Як уже зазначалось, деякі види сульфатвідновлювальних бактерій можуть використовувати іони нітрату як акцептори електронів (Marietou and Griffiths, 2008). За наявності у середовищі 1 мМ NO₃⁻ бактерії *Desulfomicrobium sp. CrR3* та *D. desulfuricans Ya-11* нагромаджували біомасу 1,3 та 1,0 г/л, відповідно. Збільшення концентрацій нітрат-іонів до 5 мМ зумовлює зростання біомаси для обох видів мікроорганізмів приблизно на 70% порівняно з біомасою бактерій, культивованих у середовищі з іонами нітратів у концентрації 1 мМ (рис. 2а).

Ефективність використання нітрат-іонів як акцепторів електронів для обох мікроорганізмів була практично однаковою та становила майже 100%. У середовищі нагромаджувались іони амонію (рис. 2б).



а

б

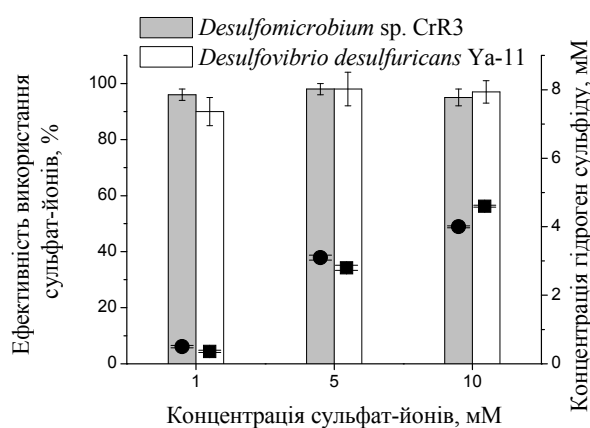
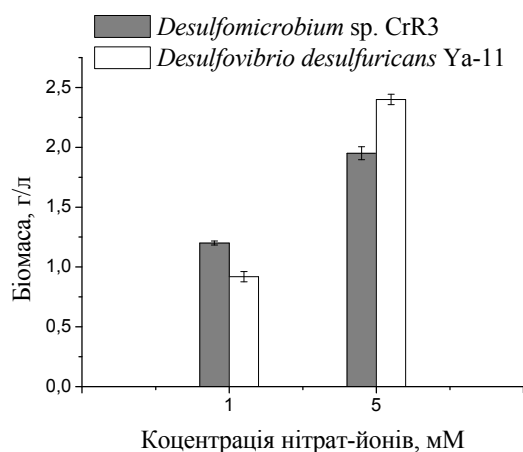


Рис. 1. Ріст (а), ефективність використання сульфат-іонів та утворення гідроген сульфід (б) бактеріями *Desulfomicrobium sp. CrR3* (-●-) та *D. desulfuricans Ya-11* (-■-) за різної вихідної концентрації SO₄²⁻



а

б

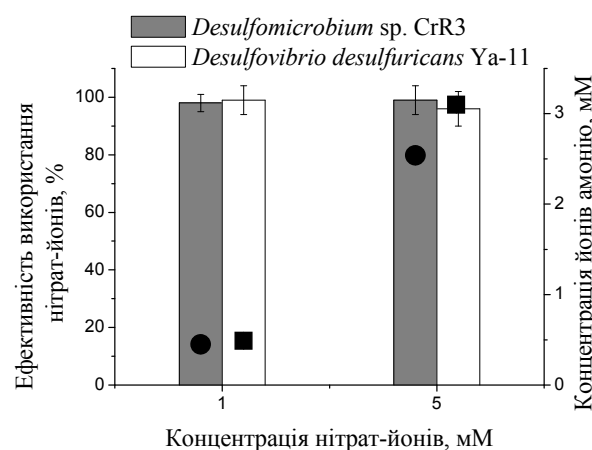


Рис. 2. Ріст (а), ефективність використання нітрат-іона та утворення амонію (б) бактеріями *Desulfomicrobium sp. CrR3* (-●-) та *D. desulfuricans Ya-11* (-■-)

У результаті дослідження закономірностей використання нітратів *Desulfomicrobium sp. CrR3* та *D. desul-*

furicans Ya-11 встановили, що бактерії використовують нітрати як джерело нітрогену для біосинтетичних

процесів і як акцептори електронів. Протягом перших двох – чотирьох діб культивування бактерії повністю використовують нітрати за їх вихідної концентрації 1, 5 та 10 мМ (рис. 2, 3). За цих умов у середовищі нагромаджуються нітрит-іони (1,5–2,0 мМ), концентрація яких після однієї – двох діб культивування знижується, у середовищі зростає вміст іонів амонію (рис. 3а, б). Із використанням нітрат-іонів бактеріями після 7 діб культивування

спостерігається уповільнення росту культури. Утворений нітрит, очевидно, не використовується бактеріями як акцептор електронів, про що свідчить крива росту бактерій. Максимальну біомасу бактерій *Desulfomicrobium sp.* CrR3, вирощених у середовищі з нітратами, спостерігали на першу – другу добу культивування (3,0–3,5 г/л), тоді як у середовищі із сульфатами – на третю – четверту добу культивування (2,5–3,0 г/л) (рис. 3а, б).

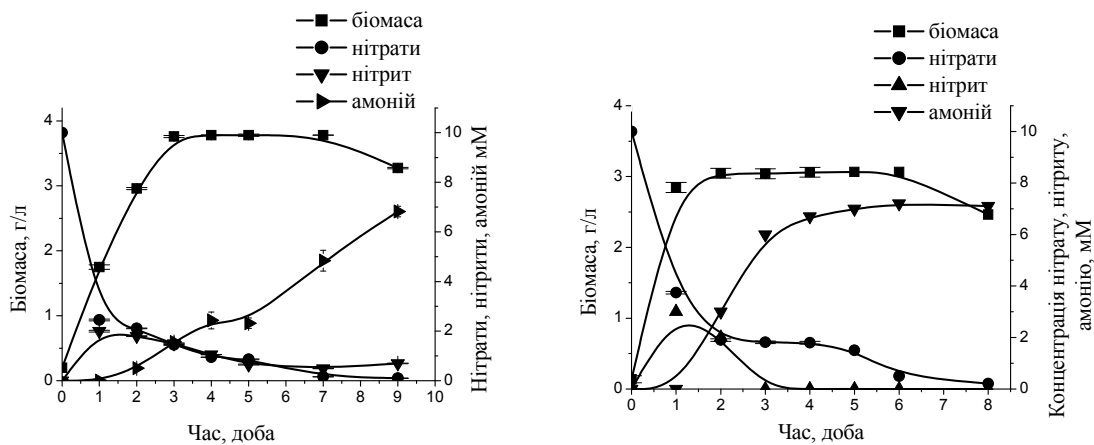


Рис. 3. Використання нітратів бактеріями *Desulfomicrobium sp.* CrR3 (а) та *D. desulfuricans* Ya-11 (б)

У результаті інкубування бактерій *Desulfomicrobium sp.* CrR3 та *D. desulfuricans* Ya-11 встановлено, що вони відновлюють сульфати та нітрати. Сульфат-іони у концентрації 1 мМ практично повністю були використані бактеріями *Desulfomicrobium sp.* CrR3 та *D. desulfuricans* Ya-11 після трьох діб інкубування. За внесення сульфат-іонів у концентрації 5 мМ бактерії *Desulfomicrobium sp.* CrR3 використали 98%, тоді як *D. desulfuricans* Ya-11 лише 86%, за цих умов у середовищі нагромаджувався гідроген сульфід у

концентрації 0,8–1,0 мМ. За наявності 10 мМ сульфат-іонів ефективність використання акцепторів електронів становила 85–95%.

Бактерії *Desulfomicrobium sp.* CrR3 інтенсивно використовували нітрат-іони, ефективність використання акцепторів електронів за концентрації 10 мМ становила 93%, тоді як для *D. desulfuricans* Ya-11 – лише 73%. За цих умов нітрит-іони після трьох діб інкубування не виявлені, як кінцеві акцептори електронів вони не використовувались (табл. 2).

Таблиця 2

Ефективність використання різних акцепторів електронів сульфатвідновлювальними бактеріями *Desulfomicrobium sp.* CrR3 та *D. desulfuricans* Ya-11 після трьох діб інкубування

Концентрація акцепторів електронів, мМ	Сульфати як акцептори електронів			Нітрати як акцептори електронів				Нітрити як акцептори електронів			
	SO ₄ ²⁻ , мМ	H ₂ S, мМ	E, %	NO ₃ ⁻ , мМ	NO ₂ ⁻ , мМ	NH ₄ ⁺ , мМ	E, %	NO ₂ ⁻ , мМ	NH ₄ ⁺ , мМ	E, %	
<i>Desulfomicrobium sp.</i> CrR3	1	0,6 ± 0,05	0,6 ± 0,02	94,7	0,02 ± 0,02	0	0,8 ± 0,05	93,3	1,1 ± 0,04	0	0
	5	0,1 ± 0,02	0,8 ± 0,03	98,2	0,4 ± 0,08	0	2,2 ± 0,32	93,3	5,1 ± 0,07	0	0
	10	3,9 ± 0,05	2,2 ± 0,05	62,5	0,7 ± 0,08	0	5,3 ± 0,08	92,8	9,9 ± 0,09	0	0
<i>D. desulfuricans</i> Ya-11	1	0,5 ± 0,01	0,2 ± 0,04	95,8	0,1 ± 0,02	0	0,5 ± 0,06	87,2	1,1 ± 0,07	0	0
	5	1,2 ± 0,21	0,1 ± 0,02	86,5	1,1 ± 0,04	0	3,5 ± 0,02	81,1	4,9 ± 0,04	0	0
	10	1,5 ± 0,02	1,1 ± 0,21	85,3	2,7 ± 0,32	0	4,5 ± 0,12	73,9	9,5 ± 0,28	0	0

Примітка: E – ефективність використання акцепторів електронів.

Зниження концентрації сульфатів та нітратів, утворення гідроген сульфиду та амонію, відповідно, в інкубаційній суміші свідчить, що анаеробні сульфатвідновлювальні бактерії *Desulfomicrobium sp.* CrR3 та *D. desulfuricans* Ya-11 здатні використовувати сульфати та нітрати як акцептори електронів у процесі безкисневого окиснення органічних сполук.

Висновки

Бактерії *D. desulfuricans* Ya-11 та *Desulfomicrobium sp.* CrR3 здатні відновлювати як сульфати, так і нітрати. Проте відновлення нітратів інтенсивніше, ніж сульфатів. У результаті сульфат- і нітратредукції утворюється гідроген сульфід та амоній, відповідно, як кінцеві сполуки.

Із підвищенням концентрації нітрат та сульфат-іонів із 1 до 10 мМ біомаса бактерій зростала.

Бактерії *Desulfomicrobium sp.* CrR3 ефективніше використовують нітрат-іони, ніж *D. desulfuricans* Ya-11. Проте сульфатредукція інтенсивніша у бактерій *D. desulfuricans* Ya-11, про що свідчить ефективність використання акцепторів електронів за різних концентрацій.

Відсутність у середовищі культивування амонію (як класичного джерела нітрогену для сульфатвідновлювальних бактерій) і їх ріст у середовищі з нітратом свідчить про те, що NO_3^- повністю забезпечує потреби мікроорганізмів у нітрогені.

Здатність сульфатвідновлювальних бактерій відновлювати сульфати та нітрати робить їх перспективними об'єктами у біоремедіації ґрунтів і вод, забруднених промисловими відходами.

Бібліографічні посилання

- Bailey, N.T.J., 1995. Statistical methods in biology. 3rd edition. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Bratcova, S., Groudev, S., Georgiev, P., 2002. The effect of some essential environmental factors on the microbial dissimilatory sulphate reduction. Mining and Mineral Processing 44(2), 123–127.
- Dzhigireji, V.S., 2004. Ekologija ta ohorona navkolyshn'ogo seredovyshha [Ecology and environment]. Znannya, Kyiv (in Russian).
- Granger, D.L., Taintor, R.R., Boockvar, K.S., 1996. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. Method. Enzymol. 268, 142–151.
- Isakova, O.P., Tarasevych, Y., Yuzjuk, Y., 2009. Processing and visualization of data with the physical experiments by usage Origin package. Libkom, Moscow.
- Ivančić, I., Degobbi, D., 1984. An optimal manual procedure for ammonia analysis in natural waters by the indophenol blue method. Wat. Res. 18, 1143–1147.
- Kosinska, K., Miskiewicz, T., 1999. Upgrading the efficiency of dissimilatory sulphate reduction by *Desulfovibrio desulfuricans* via adjustment of the C₀D/S₀4 ratio. Biotechnol. Lett. 21, 299–302.
- Marietou, A., Richardson, D.J., Cole, J.S., 2005. Nitrate reduction by *Desulfovibrio desulfuricans*: A periplasmic nitrate reductase system that lacks NapB, but includes a unique tetraheme c-type cytochrome, NapM. FEMS Microbiol. Lett. 248, 217–225.
- Marietou, A., Griffiths, L., 2008. Preferential reduction of the thermodynamically less favorable electron acceptor, sulfate, by nitrate-reducing strain of the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio desulfuricans* 27774. J. Biol. 191(3), 882–889.
- Mohanakrishnan, J., Kofoed, M.V., Barr, J., Yuan, Z., Schramm, A., Meyer, R.L., 2011. Dynamic microbial response of sulfidogenic wastewater biofilm to nitrate. Appl. Microbiol. Biotechnol. 91(6), 164–175.
- Okabe, S., Ito, T., Satoh, H., 2003. Sulphate-reducing bacterial community structure and their contribution to carbon mineralization in a wastewater biofilm growing under microaerophilic conditions. Appl. Microbiol. Biotechnol. 63, 322–334.
- Peretjatko, T.B., Galushka, A.A., Gud'z', S.P., 2009. Vykorystannja metaliv jak kincevyh akceptoriv elektroniv sul'fatvidnovljuval'nymy bakterijamy [The use of metals as final acceptor of electrons sulphate-reducing bacteria]. Biologichni Studii 3(3), 141–158 (in Ukrainian).
- Peretyatko, T.B., Galushka, A.A., Hnatush, S.O., 2006. Vykorystannya orhanichnyh spoluk sul'fatvidnovlyuval'nymy bakterijamy rodu *Desulfovibrio* [Using organic compounds sulfate-reducing bacteria of the genus *Desulfovibrio*]. Naukovyj visnyk Uzhhorods'koho Universytetu 18, 157–160 (in Ukrainian).
- Plugge, C.M., Weiwien, Z., Johannes, C.M., Alfons, J.M., 2011. Metabolic flexibility of sulfate-reducing bacteria. Front. Microbiol. 81(2), 1–8.
- Pochvy. Metod opredelenie ionov sulfata v vodnoji vyitiazhke [Soil. Method for determination of sulfate ions in water extract]. GOST 26426-85. Izdatelstvo Standartov, Moscow (in Russian).
- Polanco, F.F., Polanco, M.F., Uruena, M.A., Garcia, P.A., Villaverde, S., 2001. Combining the biological nitrogen and sulphur cycles in anerobic conditions. Wat. Sci. Tech. 44(8), 77–84.
- Postgate, J.R., 1984. The sulfate-reducing bacteria. 2nd ed. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Sholyak, K.V., Peretyatko, T.B., Gud'z', S.P., 2013. Sul'fatvidnovlyuval'ni bakteriyi, stijki do pidvyshhenyx koncentracij shestivalentnoho xromu [Sulfate-reducing bacteria resistant to high concentration of hexavalent chromium]. Mikrobiolohiya i Biotechnolohiya 2, 66–76 (in Ukrainian).
- Sugiyama, M., 2002. Reagent composition for measuring hydrogen sulfide and method for measuring hydrogen sulfide. United States Patent. № 6340596.
- Szewzyk, R., Pfennig, N., 1987. Complete oxidation of catechol by the strictly anaerobic sulfate-reducing *Desulfovibrio catecholicum* sp. nov. Arch. Microbiol. 147, 163–168.
- Tarasova, N.B., Gorshkov, O.V., Petrova, O.E., 2009. Nitratreduktaznaya aktivnost' *Desulfovibrio desulfuricans* BKM 1388 [Nitrate reductase activity of *Desulfovibrio desulfuricans* BKM 1388]. Mikrobiologiya 78(2), 192–196 (in Russian).

Надійшла до редколегії 23.06.2015



UDC 577+576.3+576.5

Comparison of gene expression of metallothioneins, ubiquitin and p53 in fibroblasts from lung and skin of rats of different age

Y.G. Kot, E.V. Kot, E.S. Morosova, E.E. Persky, M.A. Gritsenko, N.I. Bulankina

V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

We studied gene expression of five metallothioneins (MT 1-5), ubiquitin and protein p53 and their products in fibroblasts culture of the skin and lungs of white rats of different ages (2 weeks, 1, 3, and 24 months) and determined its (metallothionein 1-5 types, ubiquitin, p53) product quantity. All these proteins are protective ones, but perform their functions by using different mechanisms. Metallothionein bind, transport and excrete ions of bivalent metals, ubiquitin controls the cleavage of the defective and short-lived proteins in the proteasome, protein p53 controls apoptosis, thus ensuring the genome stability. The similarity of age dynamics of gene expression of ubiquitin and MT of cells of both sources has been shown – maximum at 3 months. Expression of p53 gene has a difference: both in the skin and lungs expression increases up to 24 months. Product quantity of p53 has a minimum in the skin at 3 months and remains constant; in the lungs, this value has a maximum at 1 month.

Keywords: culture of fibroblasts; ontogeny; metallothioneins; ubiquitin; p53

Сравнение экспрессии генов металлотионеинов, убиквитина и p53 в фибробластах легких и кожи крыс разного возраста

Ю.Г. Кот, Е.В. Кот, Е.С. Морозова, Е.Э. Перский, М.А. Гриценко, Н.И. Буланкина

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

Проведено исследование экспрессии генов пяти металлотионеинов (MT 1-5), убиквитина и белка p53 в культуре фибробластов кожи и легких белых крыс разного возраста (2 недели, 1, 3 и 24 месяца), а также определено количество их продуктов (металлотионеинов 1–5 типов, убиквитина, белка p53). Все эти белки являются защитными, но выполняют свои функции с использованием разных механизмов. Металлотионеины связывают, транспортируют и выводят из организма ионы двухвалентных металлов, убиквитин контролирует расщепление в протеасомах дефектных и короткоживущих белков, белок p53 контролирует механизм апоптоза, обеспечивая таким образом стабильность генома. В связи с этим задачей настоящей работы было сравнение экспрессии указанных генов и количества их белковых продуктов в фибробластах соединительной ткани кожи и легких для выявления роли генетических факторов в ходе их онтогенеза. Показано сходство возрастной динамики экспрессии генов MT и убиквитина из клеток обоих источников – наличие максимума в 3 месяца. Возрастные изменения экспрессии генов всех пяти MT характеризуются как в коже, так и в легких подъемом в первой половине онтогенеза. Для кожи характерен четкий максимум экспрессии генов MT в 3 месяца, для легких этот максимум менее четок. К 24-му месяцу экспрессия всех генов MT в фибробластах как кожи, так и легких, резко падает в 2–3 раза по сравнению с максимумом. Экспрессия гена убиквитина, контролирующего расщепление короткоживущих или поврежденных белков, увеличивается в фибробластах легких к 3 месяцам в 1,5 раза, а далее снижается ниже уровня у двухнедельных животных. В коже максимум экспрессии данного гена также приходится на 3 месяца, но снижение не такое существенное. Количество продукта убиквитинового гена в легких возрастает до трехмесячного возраста и далее практически не меняется. В коже наблюдается падение в период от двух недель до одного месяца, подъем к трем месяцам и резкий спад к старости (примерно в 3 раза по сравнению с трехмесячным возрастом). Экспрессия гена p53 имеет иной характер: и в коже, и в легких повышение экспрессии происходит вплоть до 24 месяцев. Количество продукта p53 минимально в коже в 3 месяца и далее не изменяется; в легких эта величина максимальна в один месяц.

Ключевые слова: культура фибробластов; онтогенез; металлотионеины; убиквитин; p53

Introduction

Fibroblasts in cell culture from lungs and skin of white rats of different age (2 weeks, 1, 3, and 24 months) have been studied. Numerous works in the field of developmental biochemistry are still held mainly at the organ and tissue level without the use of experiments with cell cultures (Muller, 2007). Meanwhile, using for such purposes the culture of cells in a complex picture of the ontogenetic changes helps to isolate the effect of genetic factors. Objects of research are fibroblasts from various sources, having the same origin, but functioning in different organs (Chang, 2002; Al Bahar, 2004; Ring, 2006), they have varying degrees of expression of certain determined genes. Gene expression of several proteins with different mechanism of action and the quantity of their products has been investigated (metallothioneins 1–5 types, ubiquitin, p53). All these proteins are protective ones, but perform their function using different mechanisms.

Metallothionein bind, transport and excrete ions of bivalent metals (Davis, 2000; Pyhteeva, 2009; Thirumoorthy, 2011). Metallothionein expression is driven by a number of physiological factors through several response elements in metallothionein gene promoter. Cellular accumulation of these proteins depends on both gene expression and protein degradation. Both depend largely on the availability of cellular zinc derived from the dietary zinc supply. Metallothioneins could act in a number of biochemical processes. For example, they can take part in trafficking and donation of zinc to appropriate apoproteins, including zinc finger proteins. As a result, metallothioneins may affect a number of cellular processes (gene expression, apoptosis, and proliferation). Metallothioneins have the ability to exchange other metals with zinc in different metalloproteins, and it can explain its role in metal toxicity. Mobilization of zinc and copper from metallothioneins by oxidative stress may explain its antioxidant function (Liuzzi, 2001).

Ubiquitin controls the cleavage of the defective and short-lived proteins in the proteasome (Li, 2008). Selective degradation of many short-lived proteins is carried out by the ubiquitin system. Ubiquitin-mediated degradation of regulatory proteins plays important role in the control of numerous processes, including cell cycle, signal transduction transcription regulation, endocytosis. The ubiquitin system is implicated in degradation of abnormal proteins that have defects as a result of gene mutation or some post-translation damage (Barder, 2006; Hoyt, 2006).

The protein p53 controls apoptosis, thus ensuring genome stability (Chumakov, 2007). Signals for metabolic processes diverge from the optimum or for proteins structure damage converge on p53 through its numerous connections with various proteins (Vousden, 2007). Depending on the damage level, the result of p53 activity is either acceleration of DNA repair or stoppage of cell division and apoptosis (Degterev, 2008).

In this regard, the purpose of this study was the comparison of the expression of these genes and their protein products in the connective tissue of skin and lungs to determine the role of genetic factors in the course of their ontogenesis.

Materials and methods

The experiments were conducted in accordance with the international instruments on bioethics (European Convention “About protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes”, the Law of Ukraine “On protection of animals from cruelty”). Donors of skin and lung fibroblasts were purebred white rats of 4 age groups (2 weeks, 1 month, 3 month and 24 month).

Cell isolation. Lungs and skin milled in DMEM medium, containing 1% Trypsin. After 30-minute incubation at 37 °C cells were harvested and seeded in vented culture flasks in DMEM medium, containing 10% FBS, and culturing was carried out.

Cell cultivation. Cells were cultured at 37°C and 95% humidity in the presence of 5% CO₂ (Nuair 4500, USA). Cell attachment and density of the cell culture was monitored in transmitted light of the inverted microscope Carl Zeiss Telaval. We used fibroblasts of the 3rd passage.

Analysis of gene expression was performed on Arrayit DNA-microarray of production Arrayit (Arrayit, USA).

Total RNA was isolated from the cells with spin-column set of RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the original manufacturer's manual. cDNA synthesis by reverse transcription was carried using QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, USA). We used gene-specific primers and Cy3-labeled nucleotides manufactured by Arrayit and Life Technologies (USA), respectively. Hybridization was carried out using individual chambers for hybridization SecureSeal (Invitrogen, USA), in separate wells that contribute labeled cDNA from the cells of animals of different age.

Final amount of protein product made was determined using microarray ELISA-kits and reagents Antibody Array Assay Kit (KAS20, Full Moon BioSystems, Inc., USA).

The chips were scanned with the confocal fluorescence scanner Affymetrix 428 using the Jaguar software. The obtained results are expressed as fluorescence units – rFLU per 1 cell.

The results were statistically processed using the Mann – Whitney test. Results were expressed as $M \pm SD$, where M – arithmetic mean, SD – standard deviation. Results with $P < 0.05$ were considered reliable.

Results and discussion

One of the important mechanisms of adaptation to high doses of heavy metals and of metals of variable valence is to increase the gene expression of metallothioneins (MT), low molecular weight proteins, containing in its composition high percentage of cysteine clusters (Pykhteeva, 2009; Thirumoorthy, 2011). Due to this MT is capable of binding divalent metals with high affinity. Now there are found more than 10 isoforms of these proteins in different living facilities (Davis and Causins, 2000). MT bind both essential metals (copper, zinc, selenium, ensuring their transport to the sites of utilization or excretion when excess flow) and metals-toxicants (cadmium, mercury, lead, etc.). MT are found in almost all organs of mammals. The destruction of the complex of MT with metals, at least for some of the isoforms, occurs in the lysosomes of the kidneys, and then released in the form of ionic metals excreted in the urine.

Age-related changes of gene expression of all five MT are characterized by a rise in the first half of ontogeny both in skin and lungs (Table 1). For skin characterized by the clear maximum of MT gene expression in 3 months, for light this maximum is less clear. For 24 months, the expression of all MT genes in fibroblasts of skin and lungs sharply decreases 2–3 times compared to the maximum.

Almost all age groups have the higher level of protein-MT in skin compared to the lungs, and sharp decline in the amount of product is observed by 24 months (Table 2).

Changes in ontogenesis are less expressed and have the opposite direction to MT 1-3 or reaching the maximum at 3 months for MT 4 and 5 in lung tissue.

Gene expression of ubiquitin (Table 3) that controls the splitting of short-lived or damaged proteins (Li, 2008), increases in lung fibroblast at 3 months 1.5 times, and further it decreases below the level in 2 week animals. In skin high expression of this gene is also observed for 3 months, but the decline is not so significant.

Table 1

Gene expression of metallothionein in cultured fibroblasts of skin and lungs in rats of different age (rFLU per 1 cell)

Gen (Protein)	Tissue	Expression			
		0.5 month	1 month	3 month	24 month
MTL1 (MT1)	skin	33.0 ± 2.0	116.0 ± 7.0 ^{^*}	144.1 ± 8.0 ^{^*}	51.1 ± 3.1 ^{^*}
	lung	59.0 ± 1.0	74.0 ± 1.0 ^{^*}	118.3 ± 2.0 ^{^*}	48.2 ± 1.0 ^{^*}
MTL2 (MT2)	skin	2.0 ± 0.0	59.0 ± 4.0 ^{^*}	56.1 ± 4.0 [^]	15.0 ± 1.0 ^{^*}
	lung	22.0 ± 2.0	41.1 ± 4.0 ^{^*}	49.0 ± 5.0 [^]	17.1 ± 2.0 ^{^*}
MTL3 (MT3)	skin	8.0 ± 1.0	52.0 ± 4.0 ^{^*}	56.1 ± 4.0 [^]	16.0 ± 1.0 ^{^*}
	lung	30.0 ± 1.0	37.1 ± 1.0 ^{^*}	49.1 ± 1.0 ^{^*}	18.0 ± 1.0 ^{^*}
MTL4 (MT4)	skin	7.0 ± 1.0	48.3 ± 3.1 ^{^*}	44.0 ± 3.0 [^]	20.1 ± 1.1 ^{^*}
	lung	28.0 ± 2.0	35.0 ± 2.0 ^{^*}	40.0 ± 3.0 [^]	21.0 ± 1.1 ^{^*}
MTL5 (MT5)	skin	43.1 ± 3.0	140.1 ± 9.1 ^{^*}	97.1 ± 6.3 ^{^*}	52.1 ± 3.0 ^{^*}
	lung	71.1 ± 4.1	88.1 ± 5.2 ^{^*}	81.1 ± 5.2 [^]	49.1 ± 3.0 ^{^*}

Note: * – significantly (P < 0.05) compared to the previous age; ^ – significantly (P < 0.05) relative to 0.5 months.

Table 2

Product quantity of metallothionein in cultured fibroblasts of skin and lungs in rats of different age (rFLU per 1 cell)

Gen (Protein)	Tissue	Product quantity			
		0.5 month	1 month	3 month	24 month
MTL1 (MT1)	skin	822.4 ± 168.3	605.4 ± 124.2	399.5 ± 82.3 [^]	169.1 ± 35.4 ^{^*}
	lung	140.4 ± 25.2	157.1 ± 27.3	168.1 ± 29.0	228.4 ± 40.1 [^]
MTL2 (MT2)	skin	764.1 ± 185.0	499.4 ± 121.3	261.1 ± 63.0 ^{^*}	127.6 ± 31.1 ^{^*}
	lung	84.3 ± 19.2	94.4 ± 21.0	115.0 ± 25.2	133.3 ± 29.2 [^]
MTL3 (MT3)	skin	777.4 ± 167.1	487.3 ± 105.5 ^{^*}	261.8 ± 55.2 ^{^*}	128.0 ± 27.0 ^{^*}
	lung	64.3 ± 6.0	72.6 ± 7.7	106.3 ± 10.5 ^{^*}	114.7 ± 11.5 [^]
MTL4 (MT4)	skin	774.1 ± 199.4	487.1 ± 125.7	243.2 ± 62.9 ^{^*}	128.7 ± 33.7 ^{^*}
	lung	74.0 ± 8.1	83.4 ± 8.2	102.1 ± 10.0 ^{^*}	97.5 ± 10.2 [^]
MTL5 (MT5)	skin	841.1 ± 198.2	649.8 ± 153.2	325.8 ± 77.0 ^{^*}	170.0 ± 40.0 ^{^*}
	lung	152.0 ± 6.0	171.6 ± 7.6 ^{^*}	209.0 ± 9.9 ^{^*}	168.8 ± 7.7

Note: see Table 1.

Table 3

Gene expression of ubiquitin and p53 in cultured fibroblasts of skin and lungs in rats of different age (rFLU per 1 cell)

Gen (Protein)	Tissue	Gene expression			
		0.5 month	1 month	3 month	24 month
UBB (ubiquitin)	skin	251.1 ± 12.0	312.0 ± 15.1 ^{^*}	622.0 ± 31.0 ^{^*}	444.4 ± 22.2 ^{^*}
	lung	316.0 ± 3.1	424.3 ± 5.1 ^{^*}	491.4 ± 5.0 ^{^*}	218.1 ± 2.2 ^{^*}
TP53 (p53)	skin	33.0 ± 2.0	41.4 ± 3.0 ^{^*}	63.3 ± 4.5 ^{^*}	159.6 ± 10.1 ^{^*}
	lung	59.1 ± 4.1	62.1 ± 4.0	55.4 ± 3.1	143.0 ± 9.0 ^{^*}

Note: see Table 1.

The amount of ubiquitin gene product in lungs increases for 3 months age and then remains practically unchanged (Table 4). In skin there is a decline in the period from 2 weeks to 1 month, climbing to 3 months and the sharp decline to old age (approximately 3 times compared with 3-month age). Obviously, similarities of the dynamics of gene expression and their products, for MT and ubiquitin, suggests that at young age the ability of fibroblasts of skin and lungs contributes to successful protection of connective tissue from its proteins damage by different external influences. But with age geneti-

cally determined adaptability to damaging factors is reduced, and this may partly explain the accumulation of damaged proteins with age in several age-related pathologies.

Gene TP53, which controls genome stability and triggers apoptosis under the action of genome damaging factors (Chumakov, 2007), is maximally expressed in old age both in lungs and skin (Table 3). Quantity of the product is significantly reduced in skin for 3 months and remains virtually unchanged in the second half of ontogeny (Table 4). In the lung fibroblast protein p53 fluctuates less, its maximum is observed in 1 month.

Product quantity of ubiquitin and p53 in cultured fibroblasts of skin and lungs in rats of different age (rFLU per 1 cell)

Gen (Protein)	Tissue	Product quantity			
		0.5 month	1 month	3 month	24 month
UBB (ubiquitin)	skin	1226.6 ± 11.4	969.1 ± 9.0 ^{^*}	1146.4 ± 10.1 ^{^*}	399.1 ± 3.6 ^{^*}
	lung	700.7 ± 38.3	787.4 ± 43.2 ^{^*}	968.2 ± 53.0 ^{^*}	964.1 ± 52.1 ^{^*}
TP53 (p53)	skin	822.2 ± 3.1	467.1 ± 1.0 ^{^*}	273.0 ± 1.0 ^{^*}	297.1 ± 1.0 ^{^*}
	lung	186.3 ± 6.0	209.2 ± 7.2 ^{^*}	161.1 ± 5.0 ^{^*}	149.0 ± 5.0 ^{^*}

Note: see Table 1.

Obviously, the mechanism of p53 action is significantly more complicated and it does not fit the pattern similar to that of other protective proteins investigated. The differences between the dynamics of p53 gene and its products both in skin and lungs also reveal more complex picture of changes in ontogenesis, which interpretation needs further research.

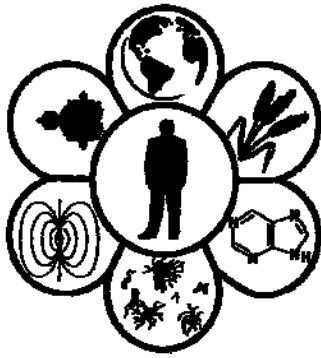
Conclusions

We found similarities of the gene expression studied at different age, typical to MT and ubiquitin both in skin and lungs. They consist in achieving the maximum expression within 3 months. Dynamics of p53 protein gene expression and its accumulation in fibroblasts differs significantly in ontogenesis from the dynamics of MT and ubiquitin. Besides, essential distinctions in the gene and the protein p53 in fibroblasts of the skin and lungs were found.

References

- Ali-Bahar, M., 2004. Dermal fibroblasts from different layers of human skin are heterogeneous in expression of collagenase and types I and III procollagen mRNA. *Wound Repair Regen.* 12(2), 175–182.
- Barder, N., Grune, T., 2006. Protein oxidation and proteolysis. *Biol. Chem.* 387(10-11), 1351–1355.
- Blagosklonny, M.V., 2010. Calorie restriction: Decelerating mTOR-driven aging from cells to organisms (including humans). *Cell Circle* 9(4), 683–688.
- Blagosklonny, M.V., Hall, M.N., 2009. Growth and aging: A common molecular mechanism. *Aging* 1(4), 357–362.
- Chang, H.Y., Chi, J.-T., Dudoit, S., Bondre, C., van de Rijn, M., Botstein, D., Brown, P.O., 2002. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(20), 12877–12882.
- Chumakov, P.M., 2007. Belok p53 i ego universal'nye funkcii v mnogokletochnom organizme [The p53 protein and its universal function in a multicellular organism]. *Uspehi Biologicheskoy Himii*, 47, 3–52.
- Davis, S.R., Cousins, R.J., 2000. Metallothionein expression in animals: Physiological perspective on function. *J. Nutr.* 130, 1085–1088.
- Degterev, A., Yuan, J., 2008. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 378–390.
- Harrison, D.E., Strong, R., Sharp, Z.D., Nelson, J.F., Astle, C.M., Flurkey, K., Nadon, N.L., Wilkinson, J.E., Frenkel, K., Carter, C.S., Pahor, M., Javors, M.A., Fernandez, E., Miller, R.A., 2009. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* 460, 392–395.
- Hoyt, M.A., Zich, J., Zhang, M., Govaerts, C., Coffino, P., 2006. Glycine-alanine repeats impair proper substrate unfolding by the proteasome. *EMBO J.* 25(8), 1720–1729.
- Jang, T., Catalgol, B., Grune, T., 2009. Age related differences in oxidative protein damage in young and senescent fibroblasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 483, 127–135.
- Johnson, S.C., Rabinovitch, P.S., Kaeberlein, M., 2013. mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. *Nature* 493, 338–345.
- Li, W., Ye, Y., 2008. Polyubiquitin chains: Functions, structures, and mechanisms. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 2397–2406.
- Liuzzi, J.P., Blanchard, R.K., Cousins, R.J., 2001. Differential regulation of zinc transporter 1, 2, and 4 mRNA expression by dietary zinc in rats. *J. Nutr.* 131, 46–52.
- Muller, F.L., Lustgarten, M.S., Jang, Y., Richardson, A., Van Remmen, H., 2007. Trends in oxidative aging theories. *Free Radical Bio. Med.* 43, 477–503.
- Pyhteeva, E.G., 2009. Metallothionein: Biologicheskaja funkcija. Rol' metallothioneinov v transporte metallov v organizme [Metallothioneins: Biological function. Role of metallothioneins in the transport of metals in the body]. *Aktual'nye Problemy Transportnoj Mediciny* 4(18), 44–58.
- Ran, Q., Liang, H., Ikeno, Y., Qi, W., Prolla, T.A., Roberts II, L.J., Wolf, N., VanRemmen, H., Richardson, A., 2007. Reduction in glutathione peroxidase 4 increases life span through increased sensitivity to apoptosis. *J. Gerontol. Biol. Sci. Med. Sci.* 62(9), 932–942.
- Rinn, J.L., Bondre, C., Gladstone, H.B., Brown, P.O., Chang, H.Y., 2006. Anatomic demarcation by positional variation in fibroblast gene expression programs. *PLoS Genet.* 2(7), 119.
- Rodríguez-Rodero, S., Fernandez Morera, J.L., Fernandez, A.F., Menendez Torre, E., Fraga, M.F., 2010. Epigenetic regulation of aging. *Discovery Medicine* 10(52), 225–233.
- Salminen, A., Hyttinen, J.M.T., Kauppinen, A., Kaamiranta, K., 2012. Context-dependent regulation of autophagy by IKK-NF-κB signaling: Impact on the aging process. *Int. J. Cell Biol.* 849541.
- Sharp, Z.D., 2011. Aging and TOR: Interwoven in the fabric of life. *Cell. Mol. Life Sci.* 68(4), 587–597.
- Thirumoorthy, N., Sunder, A.S., Manisenthil Kumar, K.T., Senthil Kumar, M., Ganesh, G.N.K., Chatterjee, M., 2011. A review of metallothionein isoforms and their role in pathophysiology. *World J. Surg. Oncol.* 9, 54.
- Vousden, K.H., Lane, D.P., 2007. p53 in health and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8(8), 275–283.

Надійшла до редколегії 24.09.2015



УДК 612.112.9+612.176:636.5

Індекс стимуляції нейтрофілів у людей, котрі споживають м'ясо курчат-бройлерів за умов корекції передзабійного 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

Наведено дані про зміни індексу стимуляції нейтрофілів (ІСН) крові чоловіків після споживання м'яса курчат-бройлерів, яким перед забоєм до корму аерозольним методом вносили імуномодулятори природного походження. Антистресорами та імуномодуляторами у передзабійний період курчат-бройлерів слугували біологічно активні речовини з екстракту селезінки. Птиці дослідної групи (І група) за п'ять днів до забою вводили аерозольним методом екстракт селезінки (70% спиртовий розчин біологічно активних речовин, об'ємом 1,4 мл на курча). Птиці контрольної групи (ІІ) за п'ять днів до забою таким же чином давали до корму 70% розчин етанолу в аналогічному об'ємі. У цільній крові чоловіків визначали ІСН. У крові курчат-бройлерів досліджували вміст поліамінів путресцину, сперміну та спермідину. Вірогідно більший вміст поліамінів спостерігали у курчат-бройлерів першої дослідної групи, яким додатково до основного раціону вводили екстракт селезінки, отриманий із застосуванням ультразвуку. Отримані результати можуть бути використані у дослідженнях показників імунітету сільськогосподарських тварин із метою підвищення резистентності організму, корекції та нівелювання стресового стану тварин перед забоєм і поліпшення якості продукції.

Ключові слова: природна резистентність; екстракт селезінки; курчата-бройлери; поліаміни; передзабійний стрес

Neutrophils stimulation index in people under consumption of broiler chickens meat at pre-slaughter stress correction

S. Grabovsky¹, O. Grabovska²

¹Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named after S.Z. Gzhytskyj, Lviv, Ukraine
²Institute of Animal Biology of NAAS, Lviv, Ukraine

The data about changes in neutrophils stimulation index in men blood after consumption of broiler chicken meat with the natural origin immunomodulators, introduced in feed before slaughter, is presented in this paper. Spleen extract biologically active substances were used as immunomodulators and anti-stressors during pre-slaughter period. Biologically active substances influence on putrescin, spermine and spermidine content in broiler chicken blood before slaughter and on some non-specific resistance indices in people was determined after consumption of broiler chicken meat. Two groups of broiler chickens at one month age were formed for the study. The spleen extract obtained with ultrasound application (I research group) served as biologically active substances was added to the feed of broiler chickens in pre-slaughter period (five days before slaughter). Blood polyamines such as putrescin, spermine and spermidine were determined by the method of High-performance liquid chromatography (HPLC) on the liquid chromatograph Agilent 1200 (USA). The second experiment was conducted on 10 people. We recruited 10 healthy male medical students (20 years old, on average) after the National Medical license examina-

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, Pekarska Str., 50, 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

tion. Spleen extract polyamines as immunomodulators and anti-stressors have the most effective influence on total quantity of polyamines in broiler chicken blood. As a result of research, it is found that aerosol introduction of spleen extract into broiler chicken feed reliably increases total quantity of polyamines by 39% and, in particular, spermidine concentration by 34%, and spermine by 40% compared with broiler chickens of the control group. Some non-specific body resistance indices in men blood upon consumption of broiler chicken meat varied within the physiological norm. The neutrophils stimulation index increased in men blood (+0,82) after consumption of meat of broiler chickens to which spleen extract as immunomodulator and anti-stressor was introduced before slaughter (experimental group). The neutrophils stimulation index decreased in men blood (-2,21) after consumption of broiler chickens meat at pre-slaughter stress (control group). The neutrophils stimulation index in men blood of experimental and control groups differed by 34,8%, but did not go beyond the physiological norm. At the final stage of poultry feeding it is necessary to consider pre-slaughter stress and to apply biologically active substances of natural origin, such as spleen extract. The results obtained in the experiment on broiler chickens can be used in studies of non-specific resistance indices of the farm animals for increasing the organism resistance, correction and avoiding of pre-slaughter stress and improvement of product quality.

Keywords: natural resistance; spleen extract; broiler chickens; polyamines; pre-slaughter stress

Вступ

Екологічний стан навколишнього середовища, спосіб життя та харчування, сфера діяльності, надмірні фізичні навантаження – далеко не всі чинники, впливу яких знає імунна система організму людини протягом свого життя. Стреси різного характеру, пригнічений стан організму, застосування деяких лікарських засобів руйнують імунну систему. У контролі вродженої імунної відповіді у вищих хребетних важливу роль відіграють поліаміни: спермідин, спермін та путресцин. Поліаміни можуть сприяти розвитку відповідної адаптивної імунної реакції (Reyes-Becerril et al., 2010; Minois et al., 2011; Maslyanko et al., 2013), регулювати апоптоз В-клітин під час делеції клону (Nitta et al., 2001), поглинатися Т- та В-лімфоцитами, а В-лімфоцити можуть ініціювати транспорт позаклітинних поліамінів (De Benedette et al., 1993).

У літературі недостатньо висвітлені питання щодо впливу передзабійного стану тварин на окремі показники імунітету. Слід зауважити, що перед забоєм тварин не можна використовувати препарати, які б мали негативний вплив на організм людини, котра споживає м'ясу продукцію. Продукція тваринництва, отримана від сільськогосподарських тварин за стресового стану, в якому організм перебуває перед забоєм, може бути непридатною для споживання. Фагоцитоз – головний механізм природної резистентності, а також обов'язкова ланка індукції та формування специфічної імунної відповіді. Фагоцитарну роль виконують поліморфно-ядерні лейкоцити. Нейтрофільні гранулоцити найчастіше фагоцитують збудників гострих інфекцій. У гранулах фагоцитів міститься набір неензимних катіонних білків, лізоцим, мієлопероксидаза, за рахунок яких відбувається пригнічення активності фагоцитованих бактерій та їх перетравлення (Frimel, 1987).

Англійські вчені-онкоепідеміологи (Doll and Peto, 1984) підрахували питому частку різноманітних чинників, що впливають на виникнення раку. Центральна роль у процесі канцерогенезу належить харчуванню: цей чинник складає 35% серед можливих причин онкології. Друге місце посідає паління, на яке припадає 30% випадків. На інші причини онкологічних новоутворень доводиться значно менший відсоток. Далеко не секрет, що існує зв'язок між складом і характером харчування людини та вірогідністю розвитку злоякісних пухлин. Близько 40% випадків онкологічних захворювань у чоловіків і 60% у жінок, за даними ВООЗ,

зумовлені незбалансованим харчуванням (Bespalov, 2008). При цьому, крім незбалансованого харчування, в основному звертається увага на хімічні речовини, фізичні чинники, віруси та мікроорганізми, нераціональне зберігання, переробку та пакування їжі, кулінарну обробку та приготування, але не враховується стресовий стан тварин перед забоєм. Нині ще недостатньо уваги приділено впливу таких продуктів харчування на імунітет людини.

У попередніх дослідженнях (модельний дослід) встановлено вплив передзабійного стану на клітинний імунітет та рівень кортизолу у плазмі крові шурів і курчат-бройлерів. Внесення у корм екстракту селезінки супроводжувалось зниженням рівня кортизолу у плазмі крові як шурів, так курчат-бройлерів, що може свідчити про зменшення стресу перед забоєм (Grabovskyi, 2014a, 2014b). У крові шурів, які протягом п'яти діб перед забоєм додатково з кормом отримували екстракт селезінки, вірогідно підвищився фагоцитарний індекс і зменшилась концентрація кортизолу (Grabovskyi, 2013a). Для стимулювання імунітету та зменшення стресового стану перед забоєм курчат-бройлерів ми використали екстракт селезінки, отриманий із застосуванням ультразвуку (Grabovskyi, 2013b).

Мета даної статті – оцінити вплив біологічно активних речовин екстракту селезінки на концентрацію путресцину, сперміну, спермідину в крові курчат-бройлерів в умовах передзабійного стресу та на показники неспецифічного імунітету у людей, котрі споживають м'ясо цих курчат.

Матеріал і методи досліджень

Для проведення першого дослідження сформовано дві групи курчат-бройлерів одномісячного віку (по 5 курчат у кожній). Як біологічно активні речовини у передзабійний період (за п'ять діб до забою) у корм курчат-бройлерів аерозольним методом вводили екстракт селезінки (70% спиртовий розчин екстракту селезінки, об'ємом 1,4 мл на одне курча дослідної групи). Курчатам контрольної групи аналогічно додавали до корму 70% розчин етанолу в еквівалентному об'ємі. Дослід тривав п'ять діб. Забій птиці проводили у ранкові години. В експерименті дотримано усі біоетичні норми Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і наукових цілей» (Страсбург, 1986 р.), «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах», ухвалені Першим

Національним конгресом із біоетики (Київ, 2001), та принципи гуманності, викладені у директиві Європейської Спільноти (Directive, 2010).

Для проведення другого досліді підібрано 10 чоловіків віком 20–21 рік та масою тіла 60–65 кг, яких поділили на дві групи (по п'ять у кожній). Чоловіки споживали м'ясо курчат-бройлерів масою тіла від 1,8 до 2,0 кг на початку та у кінці досліді, який тривав три дні. М'ясо було тушковане лише на соняшниковій олії. Половину м'яса курчати чоловіки споживали після першого відбору крові, решту – протягом двох діб. На наступний день зранку (о 9 годині) знову брали кров для аналізу.

Вміст поліамінів у крові визначали методом рідинної хроматографії високого тиску (РХВТ) (Gerbaut, 1991) на рідинному хроматографі Agilent 1200 (США). Фагоцитарну активність нейтрофілів периферійної крові визначали методом Grimel (1987). Принцип методу заснований на кількісному визначенні захоплених нейтрофілами гранул латексу. НСТ-тест виконували відповідно до методик Grimel (1987), Lapovets and Lutsyk (2002). Метод базується на піноцитозі фагоцитами світло-жовтого розчину нітросинього тетразоліну (НСТ), який відновлюється у цитоплазмі клітин до нерозчинного диформагану (у вигляді темно-синіх гранул). Принцип методу: за умов стимульованого НСТ-тесту вивчено не тільки спонтанну здатність гранулоцитів відновлювати нітросиній тетразолій, а також проводити штучну стимуляцію клітин бактеріальними ендотоксинами, зимозаном. Такий тест свідчить про резервну бактерицидну здатність клітин.

Вірогідність різниці між вибірковими середніми оцінювали за t-критерієм Стьюдента, попередньо оцінюючи її відповідність нормальному розподілу.

Результати та їх обговорення

Аналізуючи отримані дані щодо вмісту поліамінів перед забоем у крові курчат-бройлерів дослідної групи, яким до корму додавали екстракт селезінки, оброблений ультразвуком, установили, що загальна кількість поліамінів збільшилась порівняно з контролем на 39% ($P < 0,01$) і, зокрема, концентрація спермідину — на 34% ($P < 0,05$), а сперміну — на 40% ($P < 0,01$). Концентрації путресцину були найменшими у крові курчат-бройлерів як дослідної, так і контрольної груп відносно інших поліамінів (рис. 1).

Отримані результати узгоджуються з даними інших авторів (Brodal et al., 1999; Soda et al., 2009; Hashemi et al., 2014; Pohlenz et al., 2014), оскільки додаткове застосування поліамінів може впливати на їх концентрацію у тканинах та крові зокрема. На основі досліджень свавців та птиці і, зокрема, курчат-бройлерів можна зробити висновок, що використання імуномодуляторів, які містять поліаміни, знижує негативний вплив передзабійного стресу та підвищує імунітет тварин.

Показники природної резистентності у крові людей, котрі споживали курчатину, зазнавали змін у межах фізіологічної норми. У крові чоловіків після споживання м'яса курчат-бройлерів, які перед забоем як антистресор та імуномодулятор отримували екстракт селезінки

(дослідна група), зріс ІСН (+0,82). У чоловіків, які споживали м'ясо курчат-бройлерів, котрим не давали екстракт селезінки (контрольна група) в умовах передзабійного стресу, ІСН знизився (–2,21) порівняно з початком досліді. Вірогідної різниці в інших показниках природної резистентності ми не спостерігали (рис. 2).

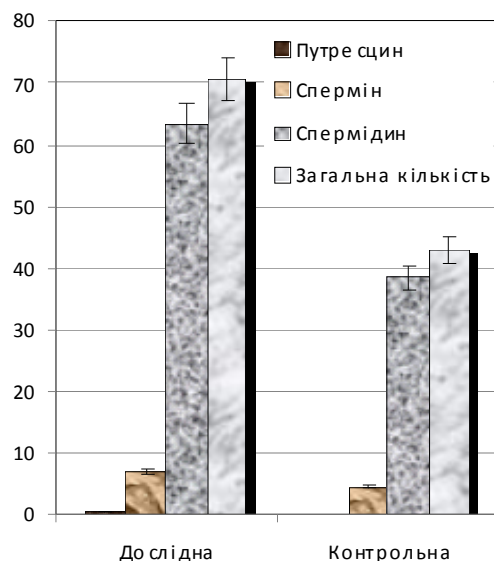


Рис. 1. Концентрація поліамінів у крові курчат-бройлерів (нмоль/мл)

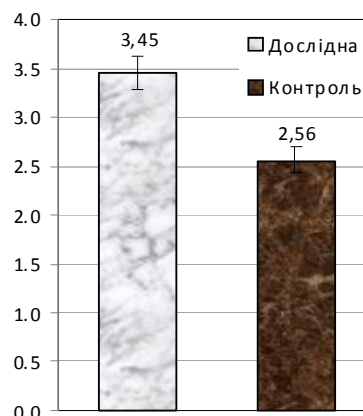


Рис. 2. Індекс стимуляції (нейтрофіли), абс. число (г/л)

Як видно на рисунку індекси стимуляції НТС у крові чоловіків дослідної та контрольної груп різнилися на 0,89 г/л (34,8%), хоча не виходили за межі фізіологічної норми. Імовірно поліаміни можуть впливати на показники імунітету людей, що узгоджується з дослідженнями інших авторів (Catros-Quemener et al., 1999; Kalac and Krausová, 2005; Kalač, 2014; Vargas et al., 2014; Galitsopoulou et al., 2015). Вірогідної різниці у показниках природної резистентності – концентрації лейкоцитів, нейтрофілів (паличкоядерних, сегментноядерних), фагоцитарного показника (нейтрофіли) (латекс-тест, 30 хв), НТС спонтанного та стимульованого ми не спостерігали. Перспективними є дослідження резистентності організму та, зокрема фагоцитарного індексу у сільськогосподарських тварин за умов передзабійного стресу на тлі використання імуностимуляторів природного походження.

Висновки

Додаткове уведення до корму імуностимуляторів (поліамінів), отриманих з екстракту селезінки, супроводжувалось підвищенням їх загальної кількості та вмісту путресцину, сперміну та спермідину у крові курчат-бройлерів за умов корекції передзабійного стресу, що, імовірно, сприяє поліпшенню якісних характеристик їх м'яса. Споживання м'яса цих курчат-бройлерів призводило до вірогідного підвищення індексу стимуляції нейтрофілів у крові чоловіків та резистентності їх організму.

Бібліографічні посилання

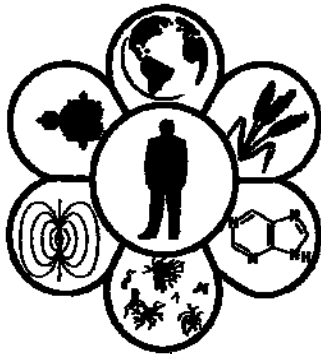
- Bespalov, V.G., 2008. Pitanie i rak. Dieticheskaia profilaktika onkologicheskikh zaboievanij [Nutrition and cancer. Dietary prevention of cancer]. JuSMA, Moscow (in Russian).
- Brodal, B.P., Eliassen, K.A., Ronning, H., Osmundsen, H., 1999. Effects of dietary polyamines and clofibrate on metabolism of polyamines in the rat. *J. Nutr. Biochem.* 10, 700–708.
- Catros-Quemener, V., Chamaillard, L., Bouet, F.M., 1999. Les polyamines: Role diagnostique et cible therapeutique en cancerologie. *S-Medecine / Sciences* 15, 1078–1085 (in French).
- De Benedette, M., De Olson, J.W., Snow, E.C., 1993. Expression of polyamine transporter activity during B-lymphocyte cell cycle progression. *The Journal of Immunology* 150(10), 4218–4224.
- Doll, R., Peto, R., 1984. Prichiny raka: Kolichestvennaja ocenka ustranimykh faktorov riska onkologicheskikh zaboievanij v SShA [Causes of cancer: Quantitative estimation of avoidable risks of cancer in the USA]. *Naukova Dumka, Kiev* (in Russian).
- Frimel, G., 1987. Immunologicheskie metody [Immunological methods]. *Medicine, Moscow* (in Russian).
- Galitsopoulou, A., Michaelidou, A.M., Meneses, G., Alichanidis, E., 2015. Polyamine profile in ovine and caprine colostrum and milk. *Food Chem.* 173, 80–85.
- Gerbaut, L., 1991. Determination of erythrocytic polyamines by reversed-phase liquid chromatography. *Clin. Chem.* 37(12), 2117–2120.
- Grabovskiy, S.S., 2013. Jekstragirovanie biologicheskii aktivnykh veshhestv selezenki s ispolzovaniem ultrazvuka [Extracting of biologically active substances of spleen with the application an ultrasound]. *Sbornik Nauchnykh Trudov SWorld.* 49, 3–6 (in Russian).
- Grabovskiy, S.S., 2013. Vliyanie biologicheskii aktivnykh veshhestv raznogo proishozhdenija na laboratornykh zhivotnykh v stressovom sostojanii [Different origin biologically active substances influence on laboratory animals at stress state]. *Sbornik Nauchnykh Trudov SWorld* 44, 13–15 (in Russian).
- 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]. *Biologichni Studiyi – Studia Biologica* 8(1), 93–102 (in Ukrainian).
- Grabovskiy, S.S., 2014. Vplyv imunomodulyatoriv pryrodnoho pokhodzhennya na vmist insulinu u krovi kurchat-broyleriv za umov stresu [Natural immunomodulators influence on insulin content in broiler chickens blood at pre-slaughter stress]. *ScienceRise* 1(1), 67–69 (in Ukrainian).
- Hashemi, S.M., Loh, T.C., Foo, H.L., Zulkifli, I., Hair-Bejo, M., 2014. Dietary putrescine effects on performance parameters, nutrient digestibility, intestinal morphology and tissue polyamine content of broilers fed low protein diet. *Iran. J. Vet. Res.* 15(4), 385–391.
- Kalač, P., 2014. Health effects and occurrence of dietary polyamines: A review for the period 2005 – mid 2013. *Food Chemistry* 161, 27–39.
- Kalac, P., Krausová, P., 2005. A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chemistry* 90, 219–230.
- Lapovets, L.Y., Lutsyk, B.D., 2002. Posibnyk z laboratornoyi imunolohiyi [Handbook of laboratory immunology]. *Lviv* (in Ukrainian).
- Maslyanko, R.P., Grabovskiy, S.S., Grabovska, O.S., 2013. Suchasni uyavleniya pro fahotsytoz [Modern notion of phagocytosis]. *Biolohiya Tvaryn* 15(3), 63–69 (in Ukrainian).
- Minois, N., Carmona-Gutierrez, D., Madeo, F., 2011. Polyamines in aging and disease. *Aging (Albany NY)* 3(8), 716–732.
- Nitta, T., Igarashi, K., Yamashita, A., Yamamoto, M., Yamamoto, N., 2001. Involvement of polyamines in B cell receptor-mediated apoptosis: Spermine functions as a negative modulator. *Exp. Cell Res.* 265(1), 174–183.
- Pohlenz, C., Buentello, A.J., Helland, S., Gatlin, D.M., 2014. Effects of dietary arginine supplementation on growth, protein optimization and innate immune response of channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque 1818). *Aquacult. Res.* 45(3), 491–500.
- Reyes-Becerril, M., Ascencio-Valle, F., Tovar-Ramírez, D., Meseguer, J., Esteban, M.A., 2011. Effects of polyamines on cellular innate immune response and the expression of immune-relevant genes in gilthead seabream leucocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 30, 248–254.
- Soda, K., Kano, Y., Sakuragi, M., Takao, K., Lefor, A., Konishi, F., 2009. Long-term oral polyamine intake increases blood polyamine concentrations. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 55, 361–366.
- Vargas, A.J., Ashbeck, E.L., Thomson, C.A., Gerner, E.W., Thompson, P., 2014. A dietary polyamine intake and polyamines measured in urine. *Nutr. Cancer* 66(7), 1144–1153.

Надійшла до редколегії 25.09.2015



Зміст

Бойко О.О. Гельмінтофауна овець і кіз Дніпропетровської області	87
Соколенко В.Л., Соколенко С.В. Активність радіонуклідів і реалізація функцій імунної системи у мешканців радіаційно забруднених територій	93
Кузнецова О.В. Особливості фракційного складу тканинної води в умовах загальної гіпертермії в експерименті	97
Шийнтум О.Н., Ушакова Г.А. Защитные/детоксикационные функции металлотионеинов в мозге и крови крыс при действии кадмия в контролируемой дозе	103
Нетроніна О.В. Вільні та зв'язані форми сіалових кислот у плазмі крові хворих на хронічний лімфолейкоз	108
Прищепя І.В., Прокушенкова О.Г., Недзвецкий В.С. Наночастинки C ₆₀ фулерену попереджають реактивний гліоз у сітківці старих щурів при гіперглікемії	113
Ковальчук Ю.П., Довбань О.О., Канга А.М., Ушакова Г.О. Вплив короткотривалої дії адреналіну на рівень протеїнів S-100b та НМКА у різних відділах головного мозку щурів	119
Алтухова Л.В., Кот К.В., Кот Ю.Г., Морозова К.С., Перський Е.Э. Биохимические механизмы ингибирования и заживления лучевого ожога кожи объемной аутотрансплантацией фибробластов и композиции фибробластов с кератиноцитами	125
Утевская О.М., Чухряева М.И., Агджоян А.Т., Атраментова Л.А., Балановская Е.В., Балановский О.П. Популяции Закарпатья и Буковины на генетическом фоне окружающих территорий	133
Маслак Г.С. Розподіл лейкоцитів периферичної крові за СопА-позитивними гліктопами у хворих на хронічні лейкози	141
Синетар Е.О., Брич О.І. Динаміка біоплівкового оброщення катетерів <i>Enterococcus faecalis</i>	146
Воробець Д.З. Ефективність різних методів корекції стриктури післоуретерального сегмента за даними діуретичної ультрасонографії	151
Дорош Л.С., Перетятко Т.Б., Гудзь С.П. Закономірності використання сульфат- і нітрат-іонів бактеріями <i>Desulfomicrobium sp. CrR3</i> та <i>Desulfovibrio desulfuricans Ya-11</i>	156
Кот Ю.Г., Кот Е.В., Морозова Е.С., Перський Е.Э., Грищенко М.А., Буланкина Н.И. Сравнение экспрессии генов металлотионеинов, убиквитина и p53 в фибробластах легких и кожи крыс разного возраста	161
Грабовський С.С., Грабовська О.С. Индекс стимуляції нейтрофілів у людей, котрі споживають м'ясо курчат-бройлерів за умов корекції передзабійного стресу	165



Content

Boyko A.A. Helminthofauna of sheep and goats in Dnipropetrovsk region	87
Sokolenko V.L., Sokolenko S.V. Radionuclide activity and the immune system functioning in residents of radiation contaminated areas	93
Kuznetsova O.V. Peculiarities of tissue water fractional composition in case of experimental whole-body hyperthermia	97
Shiyntum H.N., Ushakova G.A. Protective/detoxicative function of metallothionein in the rat brain and blood induced by controlled cadmium doses	103
Netronina O.V. Free and bound forms of sialic acid in blood plasma of patients with chronic lymphocytic leukemia	108
Prischepa I.V., Prokushenkova O.G., Nedzvetsky V.S. Nanoparticles C ₆₀ fullerene prevent reactive gliosis in retina of aged rats under hyperglycemia	113
Kovalchuk Y.P., Dovban O.O., Kanga A.M., Ushakova G.A. Short-term effect of adrenalin on S-100b and N-CAM level in the different rat brain areas	119
Altukhova L.V., Kot K.V., Kot Y.G., Morozova K.S., Persky Y.E. Biochemical mechanisms of skin radiation burns inhibition and healing by the volumetric autotransplantation of fibroblasts and of keratinocytes with fibroblasts composition	125
Utevska O.M., Chukhraeva M.I., Agdzhoyan A.T., Atramentova L.A., Balanovska E.V., Balanovsky O.P. Populations of Transcarpathia and Bukovina on the genetic landscape of surrounding regions	133
Maslak G.S. White blood cells of peripheral blood with ConA-positive glycotopes in patients with chronic leukemia	141
Synetar E.A., Brych O.I. The dynamics of biofilm overgrowth of <i>Enterococcus faecalis</i>	146
Vorobets D.Z. Effectiveness of different correction methods of pyeloureteral segment according to the data of diuretic ultrasonography	151
Dorosh L.S., Peretyatko T.B., Gudz S.P. The patterns of utilization of sulfate and nitrate ions by bacteria <i>Desulfomicrobium</i> sp. CrR3 and <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> Ya-11	156
Kot Y.G., Kot E.V., Morosova E.S., Persky E.E., Gritsenko M.A., Bulankina N.I. Comparison of gene expression of metallothioneins, ubiquitin and p53 in fibroblasts from lung and skin of rats of different age	161
Grabovskyi S., Grabovska O. Neutrophils stimulation index in people under consumption of broiler chickens meat at pre-slaughter stress correction	165

Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, медицина

Заснований у 2010 р.

Том 6(2)

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 30.09.2015. Формат 60×84 ¹/₁₆. Папір друкарський. Друк плоский. Ум. друк. арк. 15,1.
Ум. фарбовідб. 15,1. Обл.-вид. арк. 15,1. Тираж 100 пр. Вид. № . Замовлене

Свідоцтво державної реєстрації № ДК – 289 від 21.12.2000 р.

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