

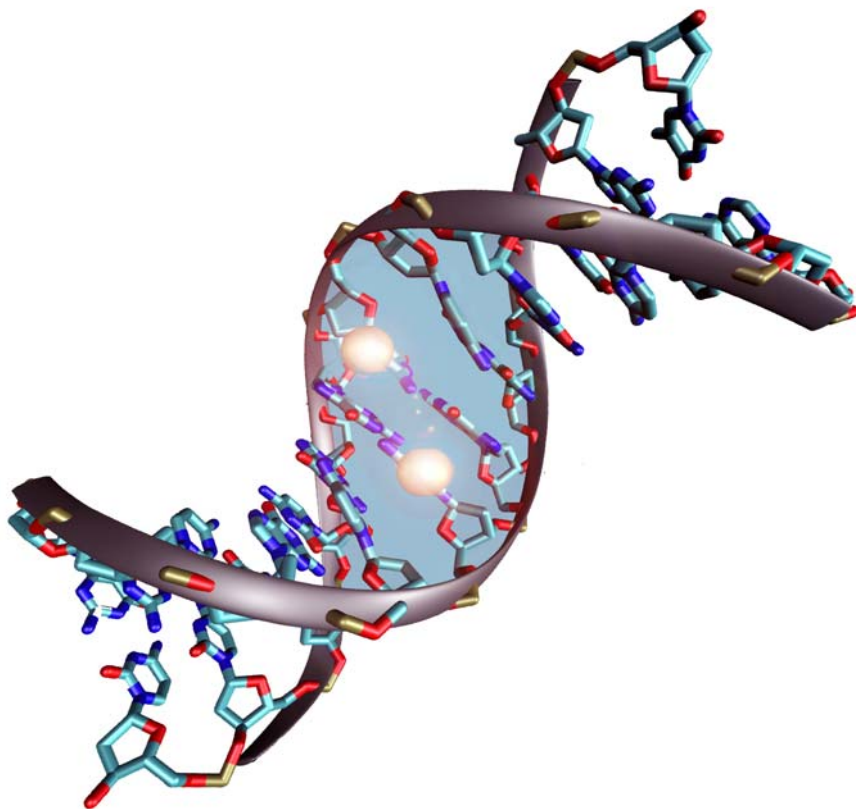
ВІСНИК

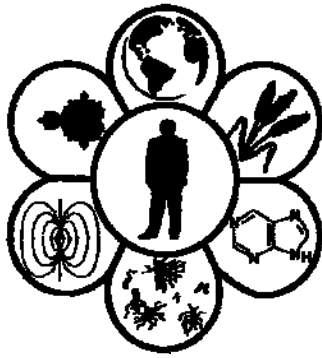
Дніпропетровського університету.

Біологія, медицина

Visnyk of Dnipropetrovsk University.

Biology, medicine





УДК 577.1:612.015

Динаміка активності амінотрансфераз сироватки крові щурів за оксидативного стресу та дії ліпосомального препарату

М.І. Харів

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

Наведено результати досліджень впливу комплексного ліпосомального препарату на динаміку показників активності амінотрансфераз організму щурів за змодельованого оксидативного стресу, викликаного застосуванням тетрахлорметану. Внутрішньом'язове уведення щурам дослідних груп 50% тетрахлоретану у дозі 0,25 мл на 100 г маси тіла тварини спричиняє антигенне навантаження на організм, викликає підвищення проникності клітинних оболонок гепатоцитів та мітохондріальних мембран. Про це свідчить зростання активності амінотрансфераз у сироватці крові протягом усього періоду досліджень. На другу добу досліджень відмічали підвищення АсАТ у 2,5 раза, АлАТ – удвічі, а коефіцієнта АсАТ/АлАТ – на 30% порівняно з контролем. На 14-ту добу досліджень активність даних показників залишалася вищою порівняно з показниками контрольної групи тварин: АсАТ і АлАТ відповідно на 93% та 81%, показник коефіцієнта був вищим і становив $2,89 \pm 0,05$ проти контролю $2,72 \pm 0,04$ (на 9% вище). Для нормалізації проникності клітинних оболонок гепатоцитів та мітохондріальних мембран за оксидативного стресу доцільно застосовувати ліпосомальний препарат, який у своєму складі містить бутафосфан, інтерферон, розторопшу плямисту та вітаміни. У разі застосування ліпосомального препарату щурам, за оксидативного стресу, у крові настає нормалізація активності ензимів переамінування (нормалізація активності АсАТ і АлАТ сироватки крові). На 14-ту добу дослідження показники ензиматичної активності амінотрансфераз у крові дослідних щурів коливалися в межах фізіологічних величин, що вказує на нормалізацію проникності клітинних оболонок гепатоцитів та мітохондріальних мембран за оксидативного стресу та за дії ліпосомального препарату.

Ключові слова: аспартат-амінотрансфераза; аланін-амінотрансфераза; печінка; бутафосфан; інтерферон; розторопша плямиста

Dynamics of indices of aminotransferase activity in the blood serum of rats under conditions of oxidative stress and effect of liposomal medicinal product

M. Khariv

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

The article presents the results of testing the effect of a developed complex liposomal medicinal product on the dynamics of aminotransferase activity indices of the organisms of rats under conditions of designed oxidative stress induced by means of carbon tetrachloride application. It was demonstrated that intramuscular administration to rats from the tested groups of 50% tetrachloroethene at the dose of 0.25 ml to 100 g of body weight causes antigen loading on the organism and increase in the cell membrane penetrability of hepatocytes and mitochondrial membranes. This was demonstrated by increase in activity of aminotransferase in the blood serum during the whole period of the experiment. On the second day of the test aspartate transaminase increased 2.5 times, alanine aminotransferase twice and the coefficient of AST/ALT by 30% in comparison with the control group. On the 14th day of the test the activity of these indices was higher compared to the indices in the control group, AST and ALT by 93% and 81% respectively, the coefficient index was higher and was equal to 2.89 ± 0.05 in comparison to the index for the control (2.72 ± 0.04), that is 9% higher than the control indices. In order to normalize cell membrane penetrability of hepatocytes and mitochondrial membranes under conditions of oxidative stress, it is useful to apply a liposomal medicinal product containing butafosfan, interferon, cardus marianus and vitamins. The application of the liposomal medicinal product to rats under the experimental conditions of oxidative stress caused the normalization of enzyme activity of reamidation in the blood, namely normalization of AST and ALT activity in the blood serum. On the 14th day the indices of enzyme activity of aminotransferase in the blood

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

*Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named after S.Z. Gzhytskyj, 50, Pekarska Str., Lviv, 79010, Ukraine
Tel.: +38-067-483-04-87. E-mail: Chariv_II@ukr.net*

of the tested rats fluctuated within the physiological values that demonstrate the normalization of cell membrane penetrability of hepatocytes and mitochondrial membranes under conditions of oxidative stress and the liposomal effect of the medicinal product.

Keywords: oxidative stress; alanine-aminotransferase; aspartate-aminotransferase; rat's organism; liposomal preparation; butafosfan; interferon; milk thistle

Вступ

Найбільша проблема у тваринництві нині – зниження імунобіологічної реактивності у постнатальний період розвитку та дія антропогенних чинників, які дестабілізують метаболічні процеси в організмі, спричинюють зниження природної резистентності, пригнічують протеїнсинтезувальну функцію печінки, впливають на ензимну активність амінотрансфераз. Відповідно до сучасних досліджень встановлено, що стійкість організму тварин до захворювань забезпечує імунна система, головна функція якої – розпізнавання та знешкодження чужорідних речовин для підтримання стабільності генетичного гомеостазу організму. Велику роль у цих процесах відіграє печінка, де синтезуються протеїни, особливо їх глобулінові фракції. У печінці відбувається також синтез ензимів амінотрансфераз, які підтримують загальний гомеостаз в організмі. Серед багатьох факторів, що негативно впливають на імунну систему, протеїнсинтезувальну та ензимну функцію печінки тварин, важливе місце посідають різні імунодепресанти, які пригнічують вищезгадані функції (Kotyat et al., 2015). За цих умов розвивається імунодефіцитний стан. Власне тому організм може уражатися вторинною бактеріальною або вірусною інфекцією (Devanto et al., 2002; Meyers et al., 2003). Для підвищення адаптаційної здатності та імунобіологічної реактивності організму, посилення протеїнсинтезувальної та ензиматичної функції тварин останніми роками з успіхом застосовують нові комплексні препарати (Liu and Finley, 2005; Rababah et al., 2005). Окремі автори встановили стимулювальний вплив бутафосфану, розторопші, вітамінів на імунну, антиоксидантну та гепатопротекторну активність у тварин. Однак метаболічна дія цих препаратів на функцію печінки та імунну систему на даний час у науковій літературі висвітлена недостатньо.

Наведене вище обґрунтовує доцільність дослідження впливу комплексного ліпосомального препарату (до складу якого входять бутафосфан, інтерферон, розторопша та вітаміни) на формування імунітету та забезпечення високої природної резистентності у тварин, їх впливу на функцію печінки, позитивного впливу на обмін речовин у їх організмі, підвищення росту та збереженості поголів'я.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проводили на молодих білих лабораторних щурах-самцях лінії Вістар масою тіла 180–200 г, яких утримували у стандартних умовах інститутського віварію Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів і кормових добавок. Протягом усього експерименту щурів утримували на збалансованому раціоні, що містив усі необхідні компоненти. Питну воду тварини отримували без обмежень із скляних напувалок об'ємом 0,2 літра.

Сформовано три групи щурів по 20 тварин у кожній. Щурам першої та другої дослідних груп для отримання оксидативного стресу на першу та третю добу досліджень вводили внутрішньом'язово 50% тетраклорметан у дозі 0,25 мл на 100 г маси тіла тварини, яку визначали їх щоденним зважуванням, що дозволило чітко дотримуватися досліджуваної дози препарату протягом усього експерименту. Тварини контрольної групи отримували аналогічний об'єм води для ін'єкцій. Теоретично можливий вплив води на аналізовані гематологічні та біохімічні показники був однаковим як на дослідні, так і на контрольну групу тварин. Другій дослідній групі тварин на першу та третю добу досліджень за годину після уведення тетраклорметану додатково вводили ліпосомальний препарат (2 мл на тварину). До складу даного препарату входять такі речовини: бутафосфан, інтерферон, розторопша ін'єкційна та вітаміни А, Е і D₃. Кров для біохімічних та гематологічних досліджень забирали під ефірним наркозом з яремної вени на другу, п'яту, десяту та п'ятнадцяту добу експерименту.

Усі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і наукових цілей (Страсбург, 1986 р.).

У сироватці крові за допомогою стандартних наборів реактивів фірми Simko Ltd (Чехія) визначали активність аспартат-амінотрансферази (АсАТ) (КФ 2.6.1.1) та аланін-амінотрансферази (АлАТ) (КФ 2.6.1.2) уніфікованим динітрофенілгідразиновим методом Райтмана – Френкеля. Метод базується на тому, що після додавання до сироватки крові 2,4-дифенілгідразинового реактиву відбувається переамінування, утворення глютамінової та піровиноградної кислот (АсАТ) або глютамінової та шавлевооцтової кислот (АлАТ) і субстрат забарвлюється у відповідний колір, інтенсивність якого пропорційна активності ензиму. Інтенсивність забарвлення субстрату визначали за допомогою приладу «Спекол».

Обробку результатів здійснювали у пакеті Statistica 6.0. Вірогідність різниці між вибірками оцінювали за t-критерієм Стьюдента, попередньо перевіривши нормальність їх розподілу. Розбіжності вважали вірогідними за $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Ензими – біологічні каталізатори, що прискорюють метаболічні процеси у цитоплазмі клітин. Вони безперервно синтезуються у клітинах і проникають у кров'яне русло. Для ензимів притаманна локалізація у відповідних клітинах та їх структурних елементах (цитоплазмі, мітохондріях, ядрі). За надмірної проникності клітинних мембран ензими надходять у кров і створюють у ній підвищену активність (гіперензимемію). Дослідження активності ензимів у сироватці крові має велике діагностичне та прогностичне значення за різних патологічних станів

структури паренхіматозних органів. За наявності в організмі патологічного процесу у крові ссавців і птахів змінюється якісний та кількісний склад ензимів, що відображають інтенсивність і спрямованість розвитку патології.

Результати досліджень активності амінотрансфераз щурів за оксидативного стресу та за дії ліпосомального препарату наведені на рисунках 1–3. Після розвитку оксидативного стресу у щурів, викликаного введенням тетрахлоретану (дослідна група 1), активність амінотрансфераз дещо відрізнялася від контрольної групи щурів. Це зумовлено збільшенням проникності клітинних мембран гепатоцитів та мітохондріальних мембран і надходженням внутрішньоклітинних ензимів у кров'яне русло.

На другу добу досліді у тварин першої дослідної групи (Д₁, яким вводили внутрішньом'язово 50% тетрахлорметан у дозі 0,25 мл на 100 г маси тіла) зареєстровано зростання у сироватці крові активності аспартатамінотрансфераз (АсАТ) у 2,5 раза (рис. 1), аланінамінотрансфераз (АлАТ) – удвічі (рис. 2) відносно контролю. Ці показники активності амінотрансфераз у першій дослідній групі залишалися високими на 5-ту та 10-ту добу досліджень. На 14-ту добу у першій дослідній групі показники активності аспартатамінотрансфераз і аланінамінотрансфераз дещо знизилися, проте були вищими за показники контрольної групи тварин (відповідно АсАТ – на 93%, АлАТ – на 81%). Досить показова величина коефіцієнта АсАТ/АлАТ на другу добу досліджень у першій дослідній групі тварин ($3,52 \pm 0,06$ проти контролю $2,72 \pm 0,04$, $P < 0,05$). Це вказує на те, що активність АсАТ вища за активність АлАТ. На 14-ту добу досліджень цей показник залишався високим ($2,89 \pm 0,05$ проти контролю $2,72 \pm 0,04$, $P < 0,05$), що на 9% вище контрольних показників.

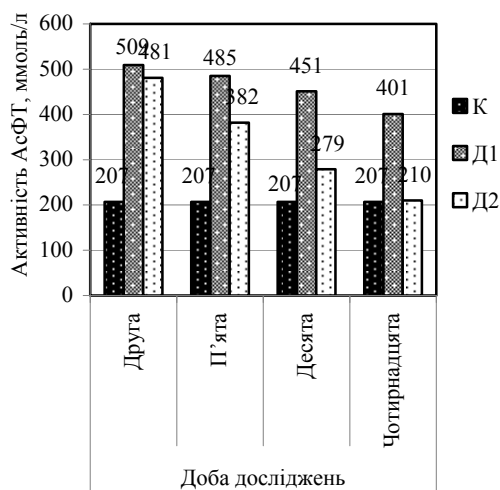


Рис. 1. Активність АсАТ сироватки крові щурів за оксидативного стресу та за дії ліпосомального препарату: К – контроль, Д₁ – хворі, Д₂ – ліковані

За оксидативного стресу та дії ліпосомального препарату у щурів другої дослідної групи (Д₂) на другу добу досліджень встановлено вірогідне зростання АсАТ у 2,3 раза (рис. 1), АлАТ – у 2,1 раза (рис. 2) відносно контролю, а величина коефіцієнта АсАТ/АлАТ у вказаний період досліді була вищою на 11,5% порівняно з показниками клінічно здорових щурів (рис. 3).

Вірогідні зміни зниження показників АсАТ та АлАТ за умов оксидативного стресу та за дії ліпосомального препарату у сироватці крові щурів відмічаємо на п'яту добу досліджень. Показник АсАТ сироватки крові щурів першої дослідної групи за умов оксидативного стресу становив $485,3 \pm 2,1$ ммоль/л, тоді як у контрольної групи тварин він дорівнював $207,3 \pm 3,0$ ммоль/л ($P < 0,05$). Показник АлАТ на даний період часу становив $141,2 \pm 6,2$ проти $76,2 \pm 4,5$ ммоль/л контрольної групи тварин. Зниження показників амінотрансфераз за оксидативного стресу та за дії ліпосомального препарату у сироватці крові щурів відмічаємо на 10-ту добу досліджень. Показники АсАТ і АлАТ порівняно із показниками другої доби досліджень ($278,8 \pm 1,8$ і $95,7 \pm 1,7$ ммоль/л) у контрольної групи тварин були відповідно нижчі ($207,3 \pm 3,0$ і $76,2 \pm 4,5$ ммоль/л), що вказує на поступову нормалізацію амінотрансфераз у сироватки крові за оксидативного стресу та за дії ліпосомального препарату.

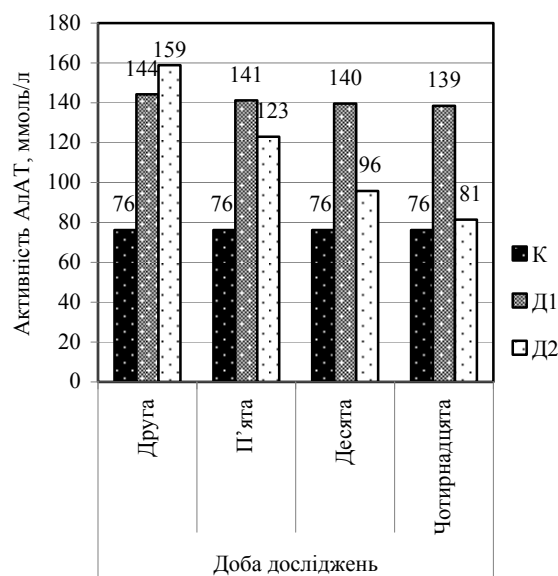


Рис. 2. Активність АлАТ сироватки крові щурів за оксидативного стресу та за дії ліпосомального препарату: К – контроль, Д₁ – хворі, Д₂ – ліковані

На 14-ту добу досліджень за оксидативного стресу та за дії ліпосомального препарату у щурів другої дослідної групи спостерігаємо нормалізацію показників активності амінотрансфераз. Показники АсАТ, АлАТ і коефіцієнт АсАТ/АлАТ порівняно з контрольною групою тварин перебувають у межах нормальних величин.

На основі наших досліджень встановлено позитивну дію ліпосомального препарату на організм щурів, які були інтоксиковані тетрахлорметаном, що проявляється нормалізацією активності амінотрансфераз у сироватці крові щурів. Низка авторів (Chen et al., 2000; Usha et al., 2007; Saba et al., 2010) зазначають, що токсична дія тетрахлорметану на печінку також супроводжується порушенням її функціонального стану, що характеризується накопиченням амінотрансфераз у сироватці крові лабораторних тварин. За літературними даними (Wolf, 1999; Sato et al., 1999; Longo et al., 2007; Morita et al., 2009), підвищення активності даних ензимів після ураження печінки корелює зі ступенем деструкції гепатоцитів.

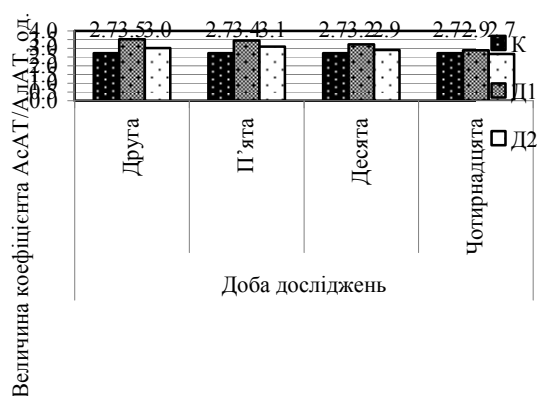


Рис. 3. Коефіцієнт АсАТ/АлАТ сироватки крові щурів за оксидативного стресу та за дії ліпосомального препарату: К – контроль, Д1 – хворі, Д2 – ліковані

Окремі науковці (Wolf, 1999; Cherkashina and Petrenko, 2006; Morita et al., 2009) вважають, що показники активності ензимів у сироватці крові не завжди об'єктивно відображають функціональний і морфологічний стани печінки. Адже амінотрансферази можуть проникати у кров з інших органів (особливо з міокарда) у разі виникнення інфаркту. Частковим джерелом надходження амінотрансфераз у сироватку крові після запальних процесів є лейкоцити, що руйнуються у вогнищі запалення, адже в лейкоцитах досить високий рівень амінотрансфераз. Проте більшість науковців (Calabrese et al., 2006; Longo et al., 2007; Usha et al., 2007) у ветеринарії та медицині пропонують визначення активності амінотрансфераз у сироватці крові застосовувати як чутливий тест на проникність мембран гепатоцитів у випадку ураження печінки екзогенними або ендогенними токсинами. Як зазначають клініцисти, висока активність АсАТ і АлАТ у сироватці крові відіграє діагностичну роль за виникнення гострого гепатиту тому, що характеризується високою чутливістю навіть за безсимптомного або легкого перебігу токсикозу. Після виникнення гепатитів активність АлАТ у сироватці крові підвищується раніше і більшою мірою, ніж активність АсАТ (Sato et al., 1999; Vyshakaliuk et al., 2015).

Ми вважаємо, що амінотрансферазна гіперензимемія у сироватці крові хворих тварин настала внаслідок дії на печінку тетрахлорметану, який діє деструктивно на фосfolіпіди клітинних мембран. Це зумовлює збільшення їх проникності та вивільнення амінотрансфераз із гепатоцитів у кров'яне русло. Швидшу нормалізацію активності амінотрансфераз у сироватці крові встановлено у щурів, яких за інтоксикації тетрахлоретаном лікували ліпосомальним препаратом, що у своєму складі містить розтопшу та володіє гепатопротекторною дією.

Висновки

У разі отруєння щурів тетрахлорметаном у печінці відбуваються глибокі деструктивні зміни клітинних оболонок гепатоцитів та мітохондріальних мембран, що проявляється підвищеною активністю ензимів аміно-

трансфераз: другу добу досліджень відмічали підвищення активності АсАТ у 2,5 раза, АлАТ – удвічі, а коефіцієнта АсАТ/АлАТ – на 30% порівняно з контролем. На 14-ту добу досліджень активність ферментів була вищою за показники контрольної групи тварин: АсАТ і АлАТ – відповідно на 93% і 81%, коефіцієнт становив $2,89 \pm 0,05$ проти контролю $2,72 \pm 0,04$.

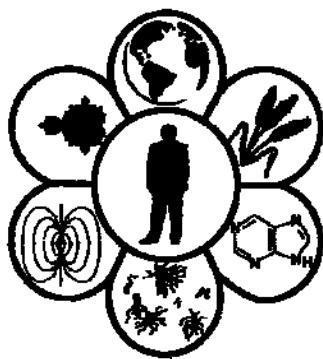
За умов застосування щурам ліпосомального препарату за оксидативного стресу у сироватці крові настає нормалізація активності амінотрансфераз. На 14-ту добу показники АсАТ, АлАТ і коефіцієнт АсАТ/АлАТ були в межах фізіологічних величин, що вказує на відновлення проникності клітинних оболонок гепатоцитів та мітохондріальних мембран у гепатоцитах печінки. Перспектива подальших досліджень – оцінка показників клітинного імунітету крові щурів за оксидативного стресу та за дії ліпосомального препарату.

Бібліографічні посилання

- Adom, K.K., Sorrells, M.E., Liu, R.H., 2005. Phytochemicals and antioxidant activity of milled fractions of different wheat varieties. *J. Agric. Food Chem.* 53(6), 2297–2306.
- Calabrese, E., Leonard, D., Zhao Xiaoqiang, 1999. Role of tissue repair in carbon tetrachloride hepatotoxicity in male and female Sprague-Dawley and Wistar rats. *Int. J. Toxicol.* 15, 62–69.
- Chen, W., Kennedy, D.O., Kojima, A., Matsui-Yuasa, I., 2000. Polyamines and thiols in the cytoprotective effect of L-cysteine and L-methionine on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Amino Acids* 18(4), 319–327.
- Cherkashina, D.V., Petrenko, A.Y., 2006. Hepatoprotective effect of fetal tissue cytosol and its thermostable fraction in rats with carbon tetrachloride-induced hepatitis. *B. Exp. Biol. Med.* 141(4), 544–547.
- Devanto, V., Wu, X., Liu, R.H., 2002. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 50(17), 4959–4964.
- Korniat, S.B., Sharan, M.M., Andrushko, O.B., Yaremchuk, I.M., 2015. Metabolichnyj profil' krovi koriv za likuvannja hipofunkciji jajechnykyv hormonal'nyj ta fitopreparatamy [Metabolic profile of cow blood under the treatment of ovaries hypofunction by hormonal and phyto-preparations]. *Biological Bulletin of Bogdan Chmelnytskyi Melitopol State Pedagogical University* 5(2), 103–111 (in Ukrainian).
- Liu, R.H., Finley, J., 2005. Potential cell culture models for antioxidants research. *J. Agric. Food Chem.* 53(10), 4311–4314.
- Longo, V., Chirulli, V., Gervasi, P.G., Nencioni, S., Pellegrini, M., 2007. Lisosan G, a powder of grain, does not interfere with the drug metabolizing enzymes and has a protective role on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Bio-technol. Lett.* 29(8), 1155–1159.
- Meyers, K.K., Watkins, C.B., Pritts, M.P., Liu, R.H., 2003. Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. *J. Agric. Food Chem.* 51(23), 6887–6892.
- Morita, M., Akai, S., Hosomi, H., Tsuneyama, K., Nakajima, M., Yokoi, T., 2009. Drug-induced hepato-toxicity test using gamma-glutamylcysteine synthetase knockdown rat. *Toxicol. Lett.* 189(2), 159–165.
- Rababah, T.M., Ereifej, K.I., Howard, L., 2014. Effect of ascorbic acid and dehydration on concentrations of total phenolics, antioxidant capacity, anthocyanins, and color in fruits. *J. Agric. Food Chem.* 53(11), 4444–4447.
- Saba, A.B., Oyagbemi, A.A., Azeez, O.I., 2010. Amelioration of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity and haemotox-

- icity by aqueous leaf extract of *Cnidioscolus aconitifolius* in rats. *Nig. J. Physiol. Sci.* 25, 139–147.
- Sato, S., Dai, W., Liu, X.-L., Asano, G., 1999. The protective effect of hepatocyte growth-promoting factor (pHGF) against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats: An ultrastructural study. *Med. Electron Microsc.* 32(3), 184–192.
- Usha, K., Mary Kasturi, G., Hemalatha, P., 2007. Hepatoprotective effect of *Hygrophila spinosa* and *Cassia occidentalis* on carbon tetrachloride induced liver damage in experimental rats. *Indian J. Clin. Biochem.* 22(2), 132–135.
- Vlizio, V.V., Fedoruk, R.S., Ratych, I.B., 2012. Laboratorni metody doslidzhen u biolohiyi, tvarynnytstvi ta veterynarniy metody [Laboratory methods of investigation in biology, stock-breeding and veterinary]. Spolom, Lviv (in Ukrainian).
- Vyshtakaliuk, A.B., Nazarov, N.G., Porfiriev, A.G., Zueva, I.V., Minnechanova, O.A., Mayatina, O.V., Reznik, V.S., Zobov, V.V., Nicolskyi, E.E., 2015. The influence of the Xymedon preparation (Hydroxyethyl dimethyl dihydro pyrimidine) on the rat liver recovery under toxic damage induced by carbon tetrachloride. *Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology* 462(1), 143–146.
- Wolf, P.L., 1999. Biochemical diagnosis of liver disease. *Indian J. Clin. Biochem.* 14(1), 59–90.

Надійшла до редколегії 19.02.2016



УДК 577.1:612.015

Вплив оксидативного стресу на систему антиоксидантного захисту організму щурів

Т.В. Мартишук

Інститут біології тварин Національної академії аграрних наук України, Львів, Україна

Наведено результати досліджень впливу оксидативного стресу на інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів та активність глутатіонової системи антиоксидантного захисту організму щурів. Внутрішньом'язове введення щурам дослідної групи 50% розчину тетрахлорметану у дозі 0,25 мл на 100 г маси тіла тварини спричиняє активацію процесів вільнорадикального окиснення з надмірним накопиченням проміжних та кінцевих продуктів перекисного окиснення ліпідів. Результати досліджень вказують на те, що розвиток оксидативного стресу викликає значне та вірогідне прискорення утворення та накопичення в плазмі крові щурів у всі терміни дослідження гідроперекисів ліпідів і малонового діальдегіду. Найвищим рівень гідроперекисів ліпідів у плазмі крові щурів за оксидативного стресу був на другу добу досліді (0,843 од. Е/мл) порівняно з контролем (0,245 од. Е/мл). Під час дослідження вмісту малонового діальдегіду встановлено, що він був вищим у 2,03 раза порівняно з контролем у тварин дослідної групи на п'яту добу. На 10- та 14-ту добу досліді відмічаємо незначне зниження рівня гідроперекисів ліпідів і малонового діальдегіду. Розвиток оксидативного стресу також спричиняє пригнічення активності глутатіонової системи антиоксидантного захисту організму щурів. Про це свідчить низька активність глутатіонпероксидази та низький рівень відновленого глутатіону у крові щурів дослідної групи. На п'яту добу досліді активність глутатіонпероксидази та рівень відновленого глутатіону у крові щурів, яким вводили тетрахлорметан, був найнижчим (порівняно з контролем дані показники знизилися відповідно на 53% і 51%). На 10-ту та 14-ту добу досліді активність глутатіонпероксидази та рівень відновленого глутатіону у крові щурів дослідної групи дещо зросли, однак порівняно із контролем були вірогідно нижчими. Встановлено суттєве порушення окисно-антиоксидантної рівноваги у тварин за оксидативного стресу, яке характеризується активацією процесів вільнорадикального окиснення ліпідів із надмірним накопиченням проміжних та кінцевих продуктів ПОЛ, пригніченням активності системи антиоксидантного захисту.

Ключові слова: тетрахлорметан; гідроперекиси ліпідів; малоновий діальдегід; активні форми кисню; глутатіонпероксидаза; відновлений глутатіон

The influence of oxidative stress on the state of the antioxidant defense system in the organism of rats

T.V. Martyshuk

Institute of Animal Biology of NAAS of Ukraine, Lviv, Ukraine

This article presents the results of research on the influence of oxidative stress on the intensity of the process of lipid peroxidation and the activity of the glutathione system of antioxidant defense in the organisms of rats. Intramuscular injection of 50% solution of tetrachloromethane at a dose of 0.25 ml per 100 g of body weight to rats from the experimental group causes activation of the process of free radical lipid oxidation with excessive accumulation of intermediate and final products of lipid peroxidation. The research results indicate that the development of oxidative stress leads to significant and probable acceleration of the formation and accumulation in the plasma of the rats, in all stages of the experiment, of lipid hydroperoxides and malonic dialdehyde. The highest level of hydroperoxides of lipids in the blood plasma of rats under oxidative stress was on the second day of the experiment, where it was 843 unE/ml, whereas in the control this index was 0.245 unE/ml. During the research into the content of malondialdehyde it was found that in the experimental group of animals it was 2.03 times higher than in the control group on the 5th day. On the 10th and 14th days of the experiment we observed a slight reduction in the levels of lipid hydroperoxides and malondialdehyde. The development of oxidative stress also leads to inhibition of the glutathione system of antioxidant defense in the rats' organism. This shows the low activity of glutathione peroxidase and the low level of restored glutathione in

the blood of the rats from the experimental group. On the 5th day of experiment the activity of glutathione peroxidase and restored glutathione level in the blood of the rats which were injected with carbon tetrachloride was at its lowest, compared with the control these indices decreased respectively by 53% and 51%. On the 10th and 14th days of the experiment the activity of glutathione peroxidase and restored glutathione level in the blood of the rats from the experimental group were slightly increased, but compared to the control they were still significantly lower. Significant disturbances were found in the oxidation-antioxidant balance of the animals under oxidative stress, which is characterized by the activation of the processes of free radical lipid oxidation with excessive accumulation of intermediate and final products and the inhibition of the antioxidant defense system.

Keywords: carbon tetrachloride; lipid hydroperoxide; malonic dialdehyde; active forms of oxygen; glutathione peroxidase; restored glutathione

Вступ

Активні форми кисню – продукти клітинного метаболізму. До них належать вільні радикали, продукти неповного відновлення атомарного кисню, а також пероксид водню, синглетний кисень тощо (Fridovich, 1995; Sohal, 2002; Fruehauf and Meyskens, 2007). Це молекули з високою реакційною здатністю, які можуть порушувати гомеостаз внутрішньоклітинного середовища, реагуючи з макромолекулами, такими як ДНК, білки, ліпіди (Pera et al., 1999). За низьких концентрацій АФК впливають на фізіологічні клітинні процеси: регуляцію тонуусу судин, клітинну проліферацію, синтез простагландинів, передачу сигналів від міжклітинних сигнальних молекул на регуляторні системи, які контролюють експресію генів, мікробіцидну дію фагоцитів (Sharoval and Gromovaaya, 2003). Збільшення в організмі тварин АФК спричинює некроз клітин. Порушення гомеостазу в клітині внаслідок підвищення вмісту активних форм кисню – ключовий механізм розвитку оксидативного стресу (Chumakova et al., 2009; Dubinina, 2001). До таких порушень гомеостазу, які викликають оксидативний стрес, відносять: зміну гомеостазу у результаті дії патологічних чинників, зміну гомеостазу у результаті порушення генетичної інформації, дефект регулювальної системи або органа-мішені (Pera et al., 1999; Dubinina, 2001; Sohal, 2002).

За дії патологічного чинника відбувається зміна інтенсивності перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), накопичення в крові концентрації продуктів вільнорадикального окиснення та активних форм кисню, зниження буферної ємності крові відносно підтримування оптимальних параметрів інтенсивності вільнорадикальних реакцій (Lander, 1997; Valko et al., 2007).

Вільнорадикальне окиснення відіграє надзвичайно важливу роль у розвитку багатьох патологічних процесів. Отруєння експериментальних тварин тетрахлорметаном за морфологічною картиною та біохімічними змінами близьке до гострих уражень печінки різної етіології у людини та тварин. Саме тому у нашій роботі використано класичну модель ушкодження субклітинних мембран гепатоцитів та розвитку оксидативного стресу на основі застосування тетрахлорметану. При цьому в організмі у результаті метаболізму CCl_4 утворюються продукти вільнорадикальної природи – індуктори ПОЛ, внаслідок чого порушується структура клітин печінки та їх основні функції (Calabrese et al., 1999; Kuziv et al., 2005; Cherkashina and Petrenko, 2006; Vyshtakaliuk et al., 2015).

За умов активації процесів ПОЛ, велике значення має функціональна активність внутрішньоклітинних захисних систем, до яких у першу чергу належить система антиоксидантного захисту, представлена комплексом неферментних антиоксидантів і спеціалізованих

ферментів антиоксидантів. Ця система запобігає руйнівній дії продуктів ПОЛ на мембрани та інші структурні елементи клітин. Абсолютне або відносне зниження активності системи антиоксидантного захисту зумовлює посилення процесів ПОЛ (Sharoval and Gromovaaya, 2003). Функціональну основу системи антиоксидантного захисту формує глутатіонова система, складові елементи якої – власне глутатіон і ензими, що каталізують реакції його зворотного перетворення (окиснення або відновлення). До даних ензимів відносять глутатіонпероксидазу та глутатіонредуктазу. Участь глутатіону та пов'язаних із ним систем у процесах біотрансформації та детоксикації можна розглядати як один із загальних механізмів, що визначають стійкість організму до негативної дії токсинів. Аналіз літератури свідчить про те, що рівні GSH, активності глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази (ензимів синтезу та катаболізму GSH) можуть використовуватись як критерії оцінки негативної дії токсинів різної хімічної природи (Sharoval and Gromovaaya, 2003).

Мета досліджень – з'ясувати вплив оксидативного стресу на рівень продуктів перекисного окиснення ліпідів та активність глутатіонової системи антиоксидантного захисту у крові щурів.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проводили на білих статевозрілих молодих щурах-самцях лінії Вістар масою 180–200 г, яких утримували на стандартному раціоні інститутського віварію Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів і кормових добавок. Протягом усього експерименту щурів утримували на збалансованому раціоні, що містив усі необхідні компоненти. Питну воду тварини отримували без обмежень зі скляних напувалок об'ємом 0,2 літра.

Тварин поділили на дві групи, по 10 тварин у кожній. I група (К) – інтактні тварини, II група (Д) – щури, уражені тетрахлорметаном. Токсичне ураження щурів викликали шляхом внутрішньом'язового уведення 50% тетрахлорметану у дозі 0,25 мл на 100 г маси тіла тварини на першу та третю добу досліджень.

Кров для біохімічних досліджень забирали під ефірним наркозом з яремної вени на другу, п'яту, десятю та п'ятнадцяту добу експерименту. У плазмі крові визначали вміст гідроперексидів ліпідів (ГПЛ) та рівень малонового діальдегіду (МДА). Глутатіонпероксидазну активність (ГП) визначали за швидкістю окиснення глутатіону за присутності гідроперексиду третинного бутилу та відновленого глутатіону в еритроцитах крові (Vizlo et al., 2012). Усі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до Європейської конвенції про захист

хребетних тварин, яких використовують для експериментальних і наукових цілей (Страсбург, 1986 р.).

Статистичне опрацювання показників проводили за допомогою стандартних комп'ютерних програм (Statistica Version 6, StatSoft, Inc., SPSS Statistics 17.0) з визначенням середнього арифметичного (M) та похибки (m). В усіх випадках вірогідними вважали відмінності між групами за $P < 0,05$ (ANOVA).

Результати та їх обговорення

Пероксидне окиснення ліпідів в організмі тварин – нормальний фізіологічний процес. У мітохондріальних мембранах підтримується певний рівень ПОЛ, що має велике функціональне значення та відображає ступінь впливу молекулярного кисню на мітохондріальні ліпіди в нормальних фізіологічних умовах. При цьому роль пероксидних процесів визначається їх здатністю регулюва-

ти структурно-функціональний стан мембран, що має вирішальне значення для функціонування ферментних систем (Dubinina, 2001). Після внутрішньом'язового введення лабораторним тваринам дослідної групи тетрахлорметану, концентрація гідроперекисів ліпідів, проміжних продуктів перекисного окиснення ліпідів, у їх крові була вірогідно вищою, ніж у крові щурів контрольної групи (табл. 1). При зіставленні динаміки проміжних і кінцевих продуктів ПОЛ у крові щурів зареєстровано односпрямовані їх зміни. На другу добу досліджень у крові щурів дослідної групи встановлено найвищий рівень цього показника, який відносно контролю зріс у 3,47 раза. У подальшому рівень гідроперекисів ліпідів у крові щурів дослідної групи знижувався і на десяту добу дослідження становив $0,625 \pm 0,014$ од. Е/мл. На чотирнадцяту добу дослідження знову відмічаємо зростання рівня проміжного продукту ПОЛ, де порівняно із тваринами контрольної групи він збільшився у 2,90 раза ($P < 0,001$).

Таблиця 1

Вміст продуктів перекисного окиснення у плазмі крові щурів за оксидативного стресу ($M \pm m, n = 10$)

Групи тварин	До введення тетрахлорметану	Доба дослідження			
		2	5	10	14
Гідроперекиси ліпідів, одЕ/мл					
Контроль	$0,245 \pm 0,022$	$0,243 \pm 0,021$	$0,240 \pm 0,021$	$0,242 \pm 0,019$	$0,244 \pm 0,021$
Дослід	$0,240 \pm 0,022$	$0,843 \pm 0,020^*$	$0,760 \pm 0,033^*$	$0,625 \pm 0,014^*$	$0,705 \pm 0,025^*$
Малоновый діальдегід, нмоль/мл					
Контроль	$4,16 \pm 0,105$	$4,12 \pm 0,074$	$4,13 \pm 0,102$	$4,15 \pm 0,101$	$4,14 \pm 0,095$
Дослід	$4,17 \pm 0,077$	$7,88 \pm 0,067^*$	$8,43 \pm 0,082^*$	$7,99 \pm 0,066^*$	$8,14 \pm 0,073^*$

Аналогічну різницю виявлено також у плазмі крові щурів у процесі дослідження кінцевих продуктів ПОЛ – малонового діальдегіду, який утворюється під час розкладання деяких первинних і вторинних продуктів перекисного окиснення ліпідів (Janero, 1990). На другу добу дослідження рівень малонового діальдегіду у крові щурів дослідної групи зріс у 1,89 раза відносно контролю. На п'яту добу дослідження рівень кінцевих продуктів ПОЛ у плазмі крові щурів, яким вводили тетрахлорметан, був найвищим і відповідно становив $8,43 \pm 0,082$ нмоль/мл, тоді як у контролі – $4,13 \pm 0,102$ нмоль/мл. На 10-ту та 14-ту добу дослідження у плазмі крові щурів дослідної групи відмічаємо незначне зниження рівня МДА, однак порівняно з контрольною групою щурів даний показник був вищим у 1,93 і 1,96 раза відповідно. У цілому одержані нами результати вказують на те, що розвиток оксидативного стресу зумовлює значне та вірогідне ($P < 0,001$) прискорення утворення та накопичення у плазмі крові щурів у всі терміни дослідження рівня гідроперекисів ліпідів та малонового діальдегіду.

Активізація ПОЛ у печінці може бути зумовлена розвитком стресової реакції. Стрес – відображення всіх адаптаційних реакцій організму, що виникають у відповідь на певний подразник, у нашому дослідженні це введення тетрахлорметану (Chumakova et al., 2009). Тетрахлорметан у такий спосіб індукує утворення низки радикальних метаболітів, які є активними окисниками біологічних субстратів. Вони проявляють виражену цитотоксичну дію та ініціюють процеси перекисного окиснення ліпідів (Teschke et al., 1984; Dubinina, 2001; Chumakova et al., 2009).

Розвиток оксидативного стресу у щурів, викликаний внутрішньом'язовим введенням тетрахлорметану, супро-

воджувався пригніченням активності глутатіонової системи антиоксидантного захисту. У щурів дослідної групи спостерігали зниження активності глутатіонпероксидази – ензиму, який забезпечує захист мембран клітин від руйнівної дії пероксидних радикалів. Даний ензим каталізує розпад перекису водню та окиснює глутатіон. Встановлено, що на другу добу дослідження активність глутатіонпероксидази у крові дослідної групи щурів була найнижчою (відносно контрольної групи вона знизилася на 61%). У подальшому активність досліджуваного ензиму у крові щурів за розвитку оксидативного стресу дещо зросла, однак порівняно з контрольною групою щурів вона була нижчою на 53%. На 10-ту і 14-ту добу дослідження активність глутатіонпероксидази у крові щурів дослідної групи коливалась у межах $0,135-0,147$ нмоль GSH/хв \times мг білка.

Відновлений глутатіон – основний сірковмісний антиоксидант в організмі тварин. Він захищає сульфгідрильні групи глобіну, мембрани еритроцитів, двовалентне залізо від дії окиснювачів. Він – центральний компонент системи антиоксидантного захисту майже всіх клітин і органів. Його антиоксидантна дія пов'язана з перенесенням сульфгідрильних груп (Shapoval and Gromova, 2003). За розвитку оксидативного стресу рівень відновленого глутатіону у крові дослідної групи щурів на другу добу дослідження знизився на 50% відносно контролю. Найнижчим рівень відновленого глутатіону був у крові дослідної групи щурів на п'яту добу дослідження, де відповідно коливався у межах $0,255 \pm 0,014$ мкмоль/мл. На 10-ту і 14-ту добу дослідження рівень досліджуваного показника порівняно з контролем був нижчим на 45% і 47%.

Вміст відновленого глутатіону та глутатіонпероксидазна активність у крові щурів за умов оксидативного стресу ($M \pm m$, $n = 10$)

Групи тварин	До введення тетрахлорметану	Доба дослід			
		2	5	10	14
Глутатіонпероксидаза, нмоль GSH/хв \times мг білка					
Контроль	0,290 \pm 0,012	0,293 \pm 0,010	0,281 \pm 0,014	0,295 \pm 0,012	0,279 \pm 0,010
Дослід	0,295 \pm 0,011	0,115 \pm 0,010*	0,133 \pm 0,019*	0,135 \pm 0,014*	0,147 \pm 0,017*
Відновлений глутатіон, мкмоль/мл					
Контроль	0,520 \pm 0,015	0,525 \pm 0,019	0,518 \pm 0,011	0,522 \pm 0,017	0,530 \pm 0,015
Дослід	0,524 \pm 0,017	0,265 \pm 0,025*	0,255 \pm 0,014*	0,285 \pm 0,014*	0,280 \pm 0,020*

Незначне підвищення активності глутатіонпероксидази та рівня відновленого глутатіону в останню добу дослід, можливо, зумовлене тим, що відбувається посилене утворення радикальних метаболітів і збільшується вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів унаслідок токсичної дії тетрахлорметану. За цих умов вмикається захисна реакція організму тварин на дану патологію та активується система антиоксидантного захисту організму. Згідно з існуючими поглядами на патогенез токсичної дії тетрахлорметану, він пов'язаний із вільнорадикальними метаболітами, що утворюються в результаті руйнування молекул CCl_4 . У результаті посилення перекисного окиснення ліпідних комплексів внутрішньоклітинних мембран порушується активність ензимів, низка функцій клітини (синтез білків, обмін β -ліпопротеїдів), виникає деструкція нуклеотидів тощо. Припускають, що основне місце утворення вільних радикалів – ендоплазматична сітка та мікосоми клітини (Fadhel, 2002; Kuziv et al., 2005). Одержані результати дослідження вказують на суттєві порушення рівноваги прооксидантно-антиоксидантної системи печінки та переважання механізмів пошкодження над механізмами захисту у разі інтоксикації тетрахлорметаном.

Згідно з даними морфологічного вивчення печінки щурів, отруєних тетрахлорметаном, підтверджено інтенсифікацію вільнорадикальних процесів. Під час дослідження Kuziv et al. (2005) виявлено зв'язок між показниками антиоксидантного захисту та деструктивними змінами гепатоцитів або ступенем розвитку токсичного гепатозу. Таке пригнічення складових системи антиоксидантного захисту, ймовірно, зумовлене їх виснаженням унаслідок інтенсифікації ПОЛ за впливу тетрахлорметану, а також порушенням їх синтезу, спричиненим деструкцією мембранних компонентів гранулярної та агранулярної ендоплазматичної сітки, вільних рибосом і полісом цитоплазми гепатоцитів.

Окремі автори (Chen et al., 2000; Usha et al., 2007; Saba et al., 2010) зазначають, що токсична дія тетрахлорметану на печінку також супроводжується порушенням її функціонального стану, що характеризується накопиченням амінотрансфераз у сироватці крові лабораторних тварин. Підвищення активності даних ензимів після ураження печінки тісно корелює зі ступенем деструкції гепатоцитів (Wolf, 1999; Sato et al., 1999; Longo et al., 2007; Morita et al., 2009). Про зниження активності ензимів системи антиоксидантного захисту у нирках за умов введення щурам тетрахлорметану вказують також інші автори (Matsiopa et al., 2012). Отже, отримані результати вказують на те, що в умовах інтоксикації тетрахлорметаном у гепатоцитах і

крові дослідних щурів встановлено інтенсифікацію вільнорадикальних процесів, яка викликає активацію ліпопероксидації та нагромадження ендогенних токсичних продуктів.

Висновки

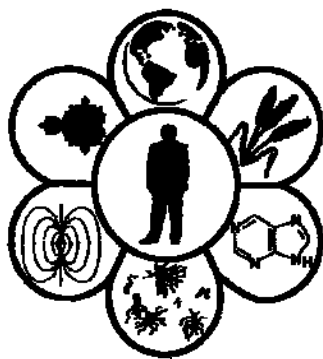
Проведена серія досліджень дозволила встановити суттєве порушення окисно-антиоксидантної рівноваги у тварин за оксидативного стресу, яка характеризується у першу чергу активацією процесів вільнорадикального окиснення ліпідів та пригніченням активності глутатіонової системи антиоксидантного захисту. Введення дослідним щурам тетрахлорметану сприяло надмірному накопиченню вмісту як проміжних, так і кінцевих продуктів ПОЛ, зумовило вірогідне збільшення вмісту гідроперекисів ліпідів та малонового діальдегіду у плазмі крові тварин у 3,47 і 2,03 раза порівняно з інтактними тваринами. Активність ензимної та неензимної ланки глутатіонової системи у крові щурів за розвитку оксидативного стресу на п'яту добу дослід була найнижчою порівняно з контролем (показники знизилися відповідно на 53% і 51%).

Бібліографічні посилання

- Calabrese, E., Leonard, D., Zhao Xiaohong, 1999. Role of tissue repair in carbon tetrachloride hepatotoxicity in male and female Sprague-Dawley and Wistar rats. *Int. J. Toxicol.* 15, 62–69.
- Chen, W., Kennedy, D.O., Kojima, A., Matsui-Yuasa, I., 2000. Polyamines and thiols in the cytoprotective effect of L-cysteine and L-methionine on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Amino Acids* 18(4), 319–327.
- Cherkashina, D.V., Petrenko, A.Y., 2006. Hepatoprotective effect of fetal tissue cytosol and its thermostable fraction in rats with carbon tetrachloride-induced hepatitis. *B. Exp. Biol. Med.* 141(4), 544–547.
- Chumakova, A.S. Teplyiy, D.L., Nesterova, Y.V., 2009. *Izmenenie svobodnoradikalnykh protsessov v razlichnykh organakh kryis raznogo vozrasta pri ostrom stresse* [Change of free radical processes in various organs of rats of different age with acute stress]. *Biologicheskije Issledovaniya* 4, 34–37 (in Russian).
- Dubinina, O.Y., 2001. *Okisnyuvalniy stres i okisnyuvalna modifikatsiya bilkiv* [Oxidative stress and oxidative modification of proteins]. *Medychna Himija* 3(2), 5–12 (in Ukrainian).
- Fadhel, Z.A., Amran, S., 2002. Effects of black tea extract on carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation in liver, kidneys, and testes of rats. *Phytother. Res.* 16, 28–32.

- Fridovich, I., 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 97–112.
- Fruehauf, J.P., Meyskens, F.L. Jr., 2007. Reactive oxygen species: A breath of life or death? *Clin. Cancer Res.* 13(1), 789–794.
- Janero, D.R., 1990. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Bio. Med.* 9(6), 515–540.
- Kuziv, O.Y., Bodnar, Y.Y., Kuziv, P.P., Klymchuk, L.F., Zavad's'ka, T.S., Derpak, Y.Y., 2005. Efektyvnist' korektsiyi tetrakhlormetanovoho hepatozu povnym holoduvannyam [Efficiency of tetrachlorometan liver pathology correction from starvation]. *Fiziol. Zh.* 51(5), 71–78 (in Ukrainian).
- Lander, H.M., 1997. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J.* 11(2), 118–124.
- Longo, V., Chirulli, V., Giovanni Gervasi, P., Pellegrini, M., 2007. Lisosan G, a powder of grain, does not interfere with the drug metabolizing enzymes and has a protective role on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Biotechnol. Lett.* 29(8), 1155–1159.
- Matsiopa, I.V., Grigor'eva, N.F., Meshchysheh, I.F., 2012. Effect of *Echinacea purpurea* tincture on the rat kidney antioxidant system under carbon tetrachloride intoxication. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 46(7), 441–442.
- Morita, M., Akai, S., Hosomi, H., Tsuneyama, K., Nakajima, M., Yokoi, T., 2009. Drug-induced hepato-toxicity test using gamma-glutamylcysteine synthetase knockdown rat. *Toxicol. Lett.* 189(2), 159–165.
- Pera, N., Phung, N., Farrel, G.C., 1999. Oxidative stress in hepatic fibrogenesis: Implications from a nutritional model of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 30, 493–494.
- Saba, A.B., Oyagbemi, A.A., Azeez, O.I., 2010. Amelioration of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity and haemotoxicity by aqueous leaf extract of *Cnidioscolus aconitifolius* in rats. *Nig. J. Physiol. Sci.* 25, 139–147.
- Sato, S., Dai, W., Liu, X.-L., Asano, G., 1999. The protective effect of hepatocyte growth-promoting factor (pHGF) against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats: An ultrastructural study. *Medical Electron Microscopy* 32(3), 184–192.
- Shapoval, G.S., Gromovaya, V.F., 2003. Mehanizmy antioksidantnoy zashchity organizma pri deystvii aktivnykh form kisloroda [The mechanisms of antioxidant defense in the action of reactive oxygen species]. *Ukr. Biokhim. Zh.* 75(2), 5–13 (in Russian).
- Sohal, R.S., 2002. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radical Bio. Med.* 33(1), 37–44.
- Teschk, R., Vierke, W., Gellert, J., 1984. Effect of ethanol on carbon tetrachloride levels and hepatotoxicity after acute carbon tetrachloride poisoning. *Arch. Toxicol.* 56(2), 78–82.
- Usha, K., Mary Kasturi, G., Hemalatha, P., 2007. Hepatoprotective effect of *Hygrophila spinosa* and *Cassia occidentalis* on carbon tetrachloride induced liver damage in experimental rats. *Indian J. Clin. Biochem.* 22(2), 132–135.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 39(1), 44–84.
- Vlizlo, V.V., Fedoruk, R.S., Ratych, I.B., 2012. Laboratorni metody doslidzhen u biolohiyi, tvarynnystvii ta veterynarniy medytsyni [Laboratory methods of investigation in biology, stock-breeding and veterinary]. Spolom, Lviv (in Ukrainian).
- Vyshtakaliuk, A.B., Nazarov, N.G., Porfiriev, A.G., Zueva, I.V., Minnechanova, O.A., Mayatina, O.V., Reznik, V.S., Zobov, V.V., Nicolskyi, E.E., 2015. The influence of the Xymedon preparation (Hydroxyethylidimethylidihydropyrimidine) on the rat liver recovery under toxic damage induced by carbon tetrachloride. *Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology* 462(1), 143–146.
- Wolf, P.L., 1999. Biochemical diagnosis of liver disease. *Indian J. Clin. Biochem.* 14(1), 59–90.

Надійшла до редколегії 23.02.2016



УДК 636.4.087:615.355

Оцінка ефективності використання ферментного препарату «Целовіридин Гх20» у складі кормів для годівлі свиней

А.О. Дейнега, В.О. Лесова, А.С. Анацький

Дніпродзержинський державний технічний університет, Дніпродзержинськ, Україна

Відмічено необхідність підвищення поживної цінності кормів, застосовуваних у практиці тваринництва, за рахунок використання ферментних препаратів для розщеплення целюлози, пектинів та інших рослинних біополімерів. Цей технологічний захід актуальний у годівлі видів тварин, у шлунково-кишковому тракті яких відсутні мікроорганізми, здатні до руйнації целюлози. Досліджено вплив ферментного препарату «Целовіридин Гх20» у складі кормових раціонів молодняка свиней на ростові та біохімічні показники тварин. До складу раціону входило 60% ячменю, 20% пшениці, 20% білково-вітамінно-мінерального комплексу «ШенПігСтарт». Застосування «Целовіридину Гх20» у кількості 100 г/тонну корму сприяє зростанню коефіцієнтів перетравлювання клітковини та протеїну на 13,8% і 7,0% відповідно порівняно з контролем і, як наслідок, зумовлює збільшення приросту живої ваги тварин на 11,6%. Отримані результати можна пояснити збільшенням доступності поживних речовин кормів для перетравлювання у шлунково-кишковому тракті свиней за рахунок гідролітичної дії доданого ферментного комплексу на целюлозовмісні компоненти кормів. Результатом зазначених явищ також є позитивна динаміка засвоєння азоту кормів тваринами дослідної групи: на 19% зменшилась його кількість у фізіологічних виділеннях і на 12,5% збільшилось використання. Препарат не чинить впливу на гематологічні показники організму свиней і обмін кальцію та фосфору. Це означає, що «Целовіридин Гх20» не накопичується в організмі, а поступово втрачає ферментативну активність і за дії власних протеаз шлунка свиней розщеплюється до вільних амінокислот, які засвоюються тваринами. Використання препарату має не тільки фізіологічне, а й економічне значення, оскільки дозволяє скоротити термін досягнення забійної ваги (близької до 100 кг) на 11 діб, а отже, зменшити споживання кормів і витрати на них у вирощуванні свиней в умовах аграрного господарства.

Ключові слова: полісахариди; травлення; засвоєність; приріст живої ваги

Evaluation of efficiency of using the enzyme preparation «Celloviridin Dx20» in the content of pig feed

A.O. Dejneg, V.O. Lesova, A.S. Anatsky

Dniprodzerzhynsk State Technical University, Dniprodzerzhynsk, Ukraine

One of the main problems in the feeding of farm animals is the low degree of digestion and assimilation of nutrients in the feed used in animal production. In the bodies of animals such as pigs and poultry enzymes and microflora which are necessary for breaking down cellulose and other polysaccharides of vegetable raw materials are absent, therefore they not only fail to be digested in the gastrointestinal tract, but also obstruct access of other digestive enzymes to the other feed components, in particular intracellular proteins. The only way to solve this problem is deliberate introduction of enzymes into food. Depending on the type and composition of the feed, amylolytic, proteolytic, cellulolytic enzyme preparations are used. The purpose of this work is to assess the effect of the enzyme preparation "Celloviridin Dx20" as a fodder component on the growth and biochemical parameters of young pigs. For this purpose, a scientific and economic experiment on feeding young pigs was conducted at the agro-industrial farm «Niva» (Novonikolaevka village, Dnipropetrovsk region), in which the enzyme preparation «Celloviridin Dx20», which promotes the breakdown of plant cell polysaccharides (cellulose, xylans) was introduced to a standard feed mixture used in swine husbandry. The composition of the ration consisted of 60% barley, 20% wheat and 20% of the protein-vitamin-mineral complex «ShenPigStart». The results of the experiment showed that the introduction into the feed mixture of the enzyme preparation at 100 g per ton helps to increase the body weight of pigs by 11.6% compared to the control, can increase the digestion rate of fibre (13.8%), protein and fat. These results can be explained by the mechanism of action of the enzyme

complex, which consists in the hydrolysis of polysaccharides of plant cell walls in the feed in the digestive tract of pigs, the formation of digestible polysaccharides and the release of additional quantities of intracellular proteins. The result of these phenomena is also a positive trend in feed nitrogen assimilation in animals of the experimental group: a 19% decrease in the amount of physiological secretions and a 12.5% increase in nitrogen use. At the same time hematology (hemoglobin, erythrocytes, leukocytes), calcium and phosphorus metabolism remained unchanged. This shows that the preparation used does not accumulate in the body and gradually loses enzymatic activity, and under the influence of the pigs' stomach proteases it is broken down into separate amino acids which are absorbed by the animals. The resulting stimulatory effect of using "Celloviridin Dx20" has not only physiological but also economic importance, as it helps reduce the time for the pigs to reach slaughter weight (close to 100 kg) by 11 days, and consequently, reduces feed intake and its costs in rearing pigs on farms. Therefore, it is advisable to use "Celloviridin Dx20" in swine husbandry.

Keywords: polysaccharides; digestion; assimilation; weight gain

Вступ

Основні шляхи збільшення обсягів продукції тваринництва та підвищення ефективності агропромислового комплексу – зміцнення кормової бази галузі, організація науково обґрунтованої годівлі тварин, вдосконалення технологічних процесів виробництва кормів (Notter et al., 2013; Anica-Popa et al., 2015). До найпоширеніших кормів для годівлі більшості сільськогосподарських тварин відносять ячмінь, овес, жито, непродовольчу пшеницю та продукти її переробки (Sefer et al., 2012). Характерна ознака цієї сировинної бази – високий вміст клітковини та інших некрохмалистих речовин (бета-глюкани, пентозани, целюлоза, геміцелюлоза, пектини). Зазначені речовини містяться у клітинних стінках ендосперму зерна, не усуваються під час лушення та ніби затримують легкозасвоювані поживні речовини всередині клітин, ускладнюючи їх контакт із власними ферментами травної системи тварин. Це спричинює зниження поживності зернових культур, потенціалу їх використання у годівлі тварин. Близько 1/3 органічних речовин кормів не перетравлюється тваринами та ще менша кількість трансформується у продукцію (Garg et al., 2013).

Організм жуйних тварин перебуває у стані симбіозу з целюлозолітичними мікроорганізмами (*Ruminococcus albus*, *R. flavefaciens*, *Bacteroides succinogenes*), і це дозволяє їм перетравлювати корми з високим умістом клітковини. Прикріплюючись до субстратів, ці бактерії виділяють ферменти, які деструктують фрагменти рослин, руйнуючи целюлозу, відокремлюючи бічні ланцюги молекул, і далі гідролізують утворені олігосахариди до простих вуглеводів, які засвоюються тваринами (Menendez et al., 2015). У той же час у моногастричних тварин симбіотичні відносини із целюлозолітичними мікроорганізмами виражені значно слабше. Зокрема, свині та птиця не здатні перетравлювати клітковину у великих кількостях, і, як наслідок, ускладнюється засвоєння інших поживних речовин корму, наприклад білка, «скранованого» клітковиною (Gonzalez et al., 2013). Через низьке засвоєння кормів знижується приріст живої ваги тварин, погіршуються якісні характеристики м'яса, сала, збільшується витрата сировини, що, в цілому, зумовлює низьку ефективність вирощування тварин з однокамерним шлунком на фуражних зернових кормах, робить нерентабельним фермерське господарство (Tkachev, 1981; Suo Cheng et al., 2012). У зв'язку із цим, актуальним завданням для підвищення продуктивності тварин стало забезпечення їх високоякісними, повноцінними кормами, які б містили компоненти живлення у доступній для перетравлювання тваринами формі.

Для розроблення та балансування раціонів за поживними речовинами та елементами живлення з метою підвищення продуктивної дії корму велике значення має використання біологічно активних речовин, зокрема, ферментних препаратів, здатних розщеплювати компоненти стінок рослинних клітин, перетворюючи не доступні для травлення речовини у легкозасвоювані сполуки (Shulaev et al., 2011).

Сучасний ринок ферментів для сільського господарства представлений широким асортиментом препаратів вітчизняного та закордонного виробництва. Для поліпшення процесів травлення у тварин найбільше застосовують амілолітичні, целюлозолітичні, протеолітичні ферменти та мультиензимні комплекси змішаної дії (Kononenko, 2011; Mukesh Kumar et al., 2014; Moreira et al., 2015). Серед таких препаратів слід зазначити Амілоризин, Глюкаваморин, Амілосубтилін, Пектаваморин, Целовіридин різних найменувань (Пх, П10х, Г3х, Г10х, Г15х тощо), спрямовані у першу чергу на розщеплення складних полісахаридів рослин, що поліпшує та прискорює процеси травлення у тварин.

Сучасне високоефективне свинарство та птахівництво не можливе без застосування у складі кормів целюлозолітичних ферментних препаратів, які технологічно отримують культивуванням міцеліальних грибів родів *Trichoderma* і *Aspergillus* (Mojsov, 2010; Dhillon et al., 2011; Agrawal et al., 2013; Vintila, 2014). Залежно від виду мікроорганізму, з якого отримані целюлозолітичні ферментні препарати, вони відрізняються термостабільністю, оптимумом рН, умовами дії та інактивації, активністю, що буде визначати кількість препарату, яку необхідно додавати до кормів. Для оцінки ефективності застосування ферментних препаратів у тваринництві використовують різні групи показників: фізіологічні (приріст живої ваги, швидкість набору маси), біохімічні (склад крові), фізико-хімічні (показники якості сала, м'яса), морфологічні (розміри та співвідношення між внутрішніми органами, їх забарвленість, довжина тіла та його частин) (Ovsyannikov, 1976; Kornyat et al., 2015).

Мета статті – охарактеризувати вплив ферментного препарату «Целовіридин Гх20» у складі кормів для годівлі молодняка свиней на ростові та біохімічні показники тварин.

Матеріал і методи досліджень

Для досягнення поставленої мети на базі агропромислового господарства «Нива» (с. Новомиколаївка, Дніпропетровська обл.) виконано науково-дослідницьку роботу з годівлі свиней стандартними кормовими сумішами, збагаченими ферментним препаратом «Целовіридин Гх20».

Для досліджень сформовано контрольну та дослідну групи свиней по 15 голів, віком 60 діб, враховуючи аналогію породи, походження, живої маси, відсутність патологій розвитку. Упродовж дослідного періоду здійснювали годівлю тварин обох груп за загальноприйнятною схемою (двічі на добу, без обмежень доступу до води) та рекомендованими раціонами, які відрізнялись лише наявністю ферментного препарату. До складу раціону входило 60% ячменю, 20% пшениці та 20% білково-вітамінно-мінерального комплексу «ШенПігСтарт» (Caisin et al., 2012). Хімічний склад кормової суміші (табл. 1) визначали за такими методиками: протеїн – методом Кельдаля (Lebedev and Usovich, 1976), амінокислоти – іонообмінна хроматографія із фотометричним детектуванням (за міждержавним стандартом ГОСТ 32195-2013), вітаміни – високоефективна рідинна хроматографія (Skurixin and Shabaev, 1996), макро- та мікроелементи – атомно-абсорбційним методом (Toth, 2015).

Таблиця 1

Хімічний склад кормових сумішей для годівлі свиней упродовж дослідного періоду

Компонент	Вміст
Сухі речовини, г/кг	0,88
Протеїн, г/кг	171,15
Лізин, г/кг	7,35
Треонін, г/кг	3,98
Метіонін, г/кг	6,21
Клітковина, г/кг	44,23
Кальцій, г/кг	9,54
Фосфор, г/кг	7,82
Залізо, мг/кг	85,65
Мідь, мг/кг	9,35
Цинк, мг/кг	50,05
Кобальт, мг/кг	45,16
Марганець, мг/кг	0,62
Йод, мг/кг	0,55
Вітамін А, тис. МО	12,75
Вітамін D, тис. МО	1,63
Вітамін Е, мг/кг	32,14
Вітамін В ₁ , мг/кг	4,22
Вітамін В ₂ , мг/кг	4,05
Вітамін В ₆ , мг/кг	2,03
Вітамін В ₁₂ , мкг/кг	21,32

До кормів тваринам дослідної групи додатково вводили «Целовіридин Гх20» виробництва ДП «Ензим» (м. Ладизин, Вінницька область) у кількості 100 г на одну тону корму (рекомендована доза застосування цього препарату). «Целовіридин Гх20» – позаклітинний білок, що виділяється у процесі глибинного культивування гриба *Trichoderma viride* та являє собою порошок світло-кремового кольору з активністю 1 000 од./г. До складу препарату входить комплекс целюлозолітичних ферментів, серед яких основні – карбогідрат целулаза, бета-глюканаз, ксиланаз. Препарат здатний до глибокої деградації клітинних стінок і окремих полісахаридів рослин: целюлози, глюкану, ксилану, геміцелюлози. Руйнуючи стінки рослинних клітин, ферментний комплекс: збільшує доступність крохмалю, протеїну та жиру для впливу ферментів травного тракту, компенсує їх дефіцит на ранніх стадіях розвитку та за умов стресу, коли вироблення власних ферментів лімітоване. Ферментний препарат

до складу кормів вносили шляхом багатоступеневого змішування.

Дослідний період годівлі тривав до досягнення тваринами ваги, близької до 100 кг; упродовж нього проводили систематичний контроль стану здоров'я та розвитку тварин, визначали абсолютний і середньодобовий приріст живої маси, здійснювали біохімічний аналіз крові, сечі та екскрементів свиней для визначення показників перетравлювання основних поживних речовин, засвоєння азоту, кальцію, фосфору в організмі тварин, досліджували гематологічні показники (Ovsyannikov, 1976). Статистичну обробку отриманих даних здійснювали, розраховуючи середнє значення та стандартну похибку (програма Statistica 6.0). Достовірність відмінностей контрольної та дослідної груп оцінювали методом ANOVA. Відмінності вважали достовірними за $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Аналіз результатів агропромислового експерименту (табл. 2) доцільно провести окремо за кожною групою досліджуваних показників. Як видно з наведених даних, в умовах згодовування тваринам дослідної групи кормів із додаванням целовіридину вдалось досягти збільшення показників приросту живої ваги: абсолютний і середньодобовий приріст вищий на 11,6% та 21,6% відповідно, ніж у контрольній групі. При цьому час досягнення тваринами живої маси, близької до 100 кг, скоротився на 11 діб. Збагачення кормів ферментним препаратом сприяло збільшенню коефіцієнта перетравлювання поживних речовин, у першу чергу клітковини (на 13,8%), а також протеїну та жиру.

Таблиця 2

Фізіолого-біохімічні показники годівлі свиней у дослідному періоді

Показник	Група	
	дослідна	контрольна
Приріст живої маси		
Жива маса на початку досліду, кг	21,5 ± 0,15	21,7 ± 0,13
Жива маса після закінчення досліду, кг	106,6 ± 0,12	97,9 ± 0,12
Абсолютний приріст, кг	85,1 ± 0,11	76,2 ± 0,14
Тривалість дослідного періоду, діб	123	134
Середньодобовий приріст ваги, г	691,7 ± 0,08	568,7 ± 0,10
Коефіцієнти перетравлювання поживних речовин кормів, %		
Сухі речовини	76,3 ± 0,27	72,1 ± 0,31
Протеїн	75,5 ± 0,15*	67,2 ± 0,13
Жир	57,1 ± 0,31*	52,2 ± 0,22
Клітковина	40,2 ± 0,14*	26,4 ± 0,18
Біохімічні показники крові		
Еритроцити, 10 ¹² /л	5,3 ± 0,11	5,2 ± 0,06
Лейкоцити, 10 ⁹ /л	14,4 ± 0,62	14,6 ± 0,08
Гемоглобін, г/л	108,1 ± 1,53	106,9 ± 1,74
Загальний білок, г/л	57,1 ± 0,31	54,4 ± 0,25
Кальцій, г/л	9,3 ± 0,09	9,3 ± 0,13
Фосфор, г/л	5,9 ± 0,06	5,8 ± 0,08

Примітки: наведено середнє та стандартна похибка; * – відмінності дослідної групи від контрольної достовірні на рівні $P < 0,05$.

Отримані результати можна пояснити збільшенням доступності поживних речовин кормів для перетравлю-

вання у шлунково-кишковому тракці свиней за рахунок гідролітичної дії доданого ферментного комплексу на целюлозовмісні компоненти кормів (Stamen et al., 2015). У результаті ферментативної деструкції рослинних біополімерів утворюються олігомери меншої молекулярної маси і, таким чином, має знижуватись в'язкість хімусу у травному тракці свиней, поліпшуватись усмоктання поживних речовин у тонкому відділі кишківника. Результатом зазначених явищ також стала позитивна динаміка засвоєння азоту кормів тваринами дослідної групи: на 19,0% зменшилась його кількість у фізіологічних виділеннях і на 12,5% збільшилось використання.

Таблиця 3

Баланс у свиней кальцію, фосфору та азоту

Показник	Група					
	дослідна			контрольна		
	Ca	P	N	Ca	P	N
Надійшло з кормом, г	22,70	17,65	66,37	23,20	17,90	67,48
Виділено, г: із сечею; з екскрементами	0,63	0,53	23,15	0,65	0,55	28,72
	10,13	9,77	15,64	10,05	9,93	19,12
Використано від прийнятого: г %	11,94	7,35	27,58	12,50	7,42	15,64
	52,60	41,64	41,55	53,88	41,45	29,10

Як свідчать гематологічні дослідження, біохімічні показники крові тварин обох груп практично не різняться між собою, тобто ферментний препарат не чинить впливу на концентрацію формених елементів крові, гемоглобіну, білка, обмін кальцію та фосфору. Одержані дані вказують, що застосовуваний препарат не накопичується в організмі, а поступово втрачає ферментативну активність і за дії власних протеаз шлунка свиней розщеплюється до вільних амінокислот, які засвоюються тваринами.

Висновки

Застосування ферментного препарату «Целовіридин Гх20» у складі кормів для годівлі свиней дозволяє збільшити засвоюваність основних груп поживних речовин, у першу чергу клітковини, а також протеїну, жирів і, за рахунок цього, досягти активізації ростових процесів тварин. Механізм дії ферментного комплексу полягає в гідролізі полісахаридів клітинних оболонок рослинної частини кормів у травному тракці свиней, утворенні доступних для перетравлювання олігосахаридів, вивільненні додаткової кількості внутріклітинних білків. «Целовіридин Гх20» не чинить впливу на біохімічні показники крові тварин, обмін кальцію та фосфору, а, поступово втрачаючи свою активність у шлунку тварин, руйнується та засвоюється як додаткове джерело білка. Поліпшення травлення тварин виражається у збільшенні абсолютного та середньодобового приросту ваги свиней (на 11,6% і 21,6%). Одержаний стимулювальний ефект від використання препарату має не тільки фізіологічне, а й економічне значення, оскільки дозволяє скоротити термін досягнення забійної ваги (близької до 100 кг) на 11 діб, а отже, зменшити споживання кормів та витрати на них у вирощуванні свиней в умовах аграрного господарства.

Тому застосування «Целовіридину Гх20» у свинарстві можна вважати доцільним.

Бібліографічні посилання

Agrawal, R., Satlewal, A., Verma, A., 2013. Production of an extracellular cellobiase in solid state fermentation. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 2(4), 2339–2350.

Anica-Popa, A., Anica-Popa, I.-F., Anica-Popa, L.-E., 2015. Analysis of the correlation between the fodder receipts and the economical performances of the pig breeding units. *Academic Journal of Economic Studies* 1(3), 105–114.

Caisin, L., Grosu, N., Kovalenko, A., 2012. The Influence of the preparation primix Bionorm K on the digestibility of the nutrients in the fodders for young pigs. *Lucrari Stiintifice: Zootehnie si Biotehnologii* 45(1), 33–37.

Dhillon, G.S., Oberoi, H.S., Kaur, S., Bansal, S., Brar, S.K., 2011. Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. *Ind. Crop. Prod.* 34, 1160–1167.

Garg, M.R., Sherasia, P.L., Bhandari, B.M., Phondba, B.T., Shelke, S.K., Makkar, H.P., 2013. Effects of feeding nutritionally balanced rations on animal productivity, feed conversion efficiency, feed nitrogen use efficiency, rumen microbial protein supply, parasitic load, immunity and enteric methane emissions of milking animals under field conditions. *Anim. Feed Sci. Tech.* 179, 24–35.

González, E., Muñoz, M., García Casco, J. M., 2013. Predictive ability of the feeding system in Iberian pig by means of several analytical methods. *Grasas Aceites* 64(2), 191–200.

Kononenko, S.I., Paksutov, N.S., 2011. Fermenty v kormlenii molodnjaka svinej [Enzymes in feeding young pigs]. *Kormlenie Sel'skhozjajstvennyh Zhivotnyh i Kormoproizvodstvo* 7, 18–21 (in Russian).

Kornyat, S.B., Sharan, M.M., Andrushko, O.B., Yaremchuk, I.M., 2015. Metabolichnyj profil' krovi koriv za likuvannja hipofunkcii jaječnykiv hormonal'nyh ta fitopreparatamy [Metabolic profile of cow blood under the treatment of ovaries hypofunction by hormonal and phyto-preparations]. *Biological Bulletin of Bogdan Chmelnytskyi Melitopol State Pedagogical University* 5(2), 103–111 (in Ukrainian).

Lebedev, P.T., Usovich, A.T., 1976. *Metody issledovanija kormov, organov i tkanej zhivotnyh* [Research methods of feed, animal organs and tissues]. Rosselkhozizdat, Moscow (in Russian).

Menendez, E., Garcia-Fraile, P., Rivas, R., 2015. Biotechnological applications of bacterial cellulases. *Bioengineering* 2(3), 163–182.

Mojsov, K., 2010. Application of solid-state fermentation for cellulase enzyme production using *Trichoderma viride*. *Perspectives of Innovations, Economics and Business* 5(2), 108–110.

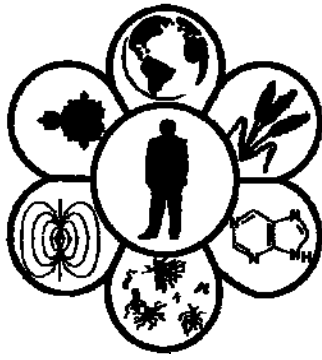
Moreira, L., Álvares, A., Gomes da Silva, F., Freitas, S., Ferreira Filho, E., 2015. Xylan-degrading enzymes from *Aspergillus terreus*: Physicochemical features and functional studies on hydrolysis of cellulose pulp. *Carbohydr. Polym.* 134, 700–708.

Mukesh Kumar, D.J., Immaculate Nancy Rebecca, A., Balashanmugam, P., Bala Kumaran, M.D., Ravi Kumar, M., Kalichelvan, P.T., 2014. Production of cellulase enzyme by *Trichoderma reesei* Cef19 and its application in the production of bio-ethanol. *Pak. J. Biol. Sci.* 17(5), 735–739.

Notter, D., Scherf, B., Hoffmann I., 2013. Breeding of animals. In: *Encyclopedia of Biodiversity* (2nd ed.). Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg. 636–649.

- Ovsyannikov, A.I., 1976. Osnovy opytnogo dela v zivotnovodstve [Basics of experimental work in cattle-breeding]. Kolos, Moscow (in Russian).
- Šefer, D., Petrujkić, B., Marković, R., Grdović, S., Radulović, S., Jovanović, D., 2012. Chemical composition of complete fodder mixes for pig diet during 2007–2009. Veterinarski Glasnik 66, 311–323.
- Shulaev, G.M., Betin, A.N., Enuvatov, A.U., 2011. Fermentnye preparaty novogo pokolenija “Agroksil”, “Agrocell” i “Agrofit” [Enzyme preparations of the new generation “Agroksil”, “Agrocell” and “Agrofit”]. Svinovodstvo 8, 32–35 (in Russian).
- Skurixin, V., Shabaev, S., 1996. Metody analiza vitaminov A, E, D i karotina v kormah, biologičeskikh ob’ektah i produktah zivotnovodstva [Methods of analysis of vitamins A, E, D and carotene in animal feed, biological objects and products of animal]. Himija, Moscow (in Russian).
- Stamen, R., Marković, R., Dobrila, J., Šefer, D., 2015. The use of phytobiotics in growth stimulation of weaned pigs. Veterinarski Glasnik 69, 63–74.
- Suo, C., Yin, Y., Wang, X., Lou, X., Song, D., Wang, X., Gu, Q., 2012. Effects of *Lactobacillus plantarum* ZJ316 on pig growth and pork quality. BMC Vet. Res. 8(1), 89.
- Tkachev, E.Z., 1981. Fiziologija pitaniya svinej [Nutrition physiology of pigs]. Kolos, Moscow (in Russian).
- Toth, T., 2015. Heavy metal screening in compounds feeds. Lucrari Stiintifice: Zootehnie si Biotehnologii 48(1), 51–56.
- Vintilă, T., 2014. Sorghum bagasse as substrate for cellulase production by submerged and solid-state cultures of *Trichoderma*. Lucrari Stiintifice: Zootehnie si Biotehnologii 47(1), 121–125.

Надійшла до редколегії 29.02.2016



УДК 612.8+613.8

Зв'язок успішності навчання та когнітивних здібностей студентів із психофізіологічними особливостями

Т.О. Третяк¹, О.В. Севериновська¹, М. Бойко²

¹Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпропетровськ, Україна
²Негевський університет імені Бен-Гуріона, Беер-Шева, Ізраїль

Розуміння індивідуальних особливостей студентів і специфіки їх прояву в навчальній діяльності дозволяє передбачити, за яких умов ці прояви будуть найсприятливішими, а за яких завадять засвоєнню знань і розвитку особистості під час навчання. Більшість студентів-біологів амбіверти та екстраверти. Між оцінками за результати навчання та типом особистості існує статистично значущий зв'язок: успішніші студенти-амбіверти. За розвитком можливих типів прояву асиметрії серед студентів-біологів «правші» та праворукі складують 87%, ліворукі та «лівші» – 13%. Залежність між успішністю навчання та проявом асиметрії відсутня. У більшості біологів сангвінічно-холеричний темперамент і слабо виражена або відсутня астения. У менш успішних – високий рівень ситуативної тривоги. Виявлено зв'язок між успішністю навчання та ситуативною тривожністю, а також між типом особистості та рівнем ситуативної тривоги (в інтровертів та екстравертів високий рівень ситуативної тривоги, в амбівертів – помірний). Складніше навчатись екстравертам із високим рівнем тривожності. Успішні студенти-біологи мають високий рівень наочно-образного, предметно-дійового та креативного типу мислення. Встановлено достовірні негативні кореляції зв'язки між предметно-дійовим типом мислення та інтроверсією, позитивні – між інтуїтивним мисленням та інтроверсією, незалежно від результатів навчання. Успішні в навчанні студенти мають позитивну кореляцію між абстрактно-символічним типом мислення та інтроверсією, наочно-образним, словесно-логічним, абстрактно-символічним і креативним типом мислення та екстраверсією. Майже всі типи мислення виражені в успішних амбівертів, причому прояв певного типу мислення посилюється зі збільшенням прояву амбіверсії. Розумова активність супроводжується вірогідним збільшенням сатурації. В інтро- та амбівертів, які показали високі результати тестів, при інтуїтивному та наочно-образному мисленні зменшується частота серцевих скорочень, а в екстравертів, які дали мало правильних відповідей, навпаки, збільшується. Під час виконання завдань на словесно-логічне мислення частота серцевих скорочень у студентів усіх типологічних груп збільшується. Питання про взаємозв'язок індивідуально-типологічних особливостей, когнітивних здібностей та успішності навчальної діяльності має велике теоретичне та практичне значення для розроблення нових методичних підходів до якісної підготовки фахівців.

Ключові слова: амбіверти; екстраверти; інтроверти; мислення; темперамент; тривожність; стресостійкість

Connection of students' academic performance and cognitive abilities with their psychological characteristics

T.O. Tretiak¹, O.V. Severynovska¹, M. Boyko²

¹Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine
²Ben Gurion University of the Negev, Beer Sheva, Israel

The contents of education must correspond not only to the level of knowledge and competencies, but also be directed to self-determination of the personality and creation of conditions for its self-development and self-realization. The aim of this study was to identify the psycho-physiological peculiarities of Biology students and to establish the connection between the students' academic performance, their cognitive abilities and their psycho-physiological characteristics, which is essential for improving the academic process and bringing it to the

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, пр. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ, 49010, Україна
Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Gagarin Ave., 72, Dnipropetrovsk, 49010, Ukraine
Tel.: +38-050-565-73-81. E-mail: tessamina78@mail.ru

Негевський університет імені Бен-Гуріона, Р.О.В. 653, Беер-Шева, 8410501, Ізраїль
Ben-Gurion University of the Negev, P.O.B. 653, Beer-Sheva, 8410501, Israel

high level of professional education necessary for graduates of higher educational establishments to compete successfully in the job market. It was established that the majority (46%) of Biology students are ambiverts, 34% of them are extroverts, and 18% – introverts. There is a statistically reliable connection between the academic grades and the personality type: the more successful students are ambiverts and introverts. Extroverts demonstrate lower academic results. According to different types of asymmetry manifestation among Biology students, the right-handed accounted for 35% of the tested, those with prevailing right hand – 51%, those with prevailing left hand – 1.2% and the left-handed – 12%. There is no dependence of academic performance on the asymmetry manifestation. Most Biology students have a sanguine-choleric temperament and slightly expressed or absent asymmetry, which testifies to the power of nervous processes and is a precondition for successful studying. The majority of students, irrespective of the academic performance level, have a low level of stress resistance and a medium level of personality anxiety. Students who score A and B points for academic performance, have a medium level of situational anxiety. Those who score C points have a high level of anxiety. There is no connection between the academic points and personality anxiety level, but there is significant connection between academic performance and situational anxiety. There has been established a significant dependence of academic performance on the level of situational anxiety: introverts and extroverts have a high level, ambiverts have a medium level of situational anxiety. Introverts and ambiverts with a low and medium anxiety level demonstrate higher academic performance. Extroverts with a high anxiety level find it more difficult to study. The majority of Biology students have a high level of visual-imaginative, object-active and creative thinking types. 83% of students have a high and a medium level of verbal-logical thinking type. Abstract-symbolic and intuitive thinking are developed in lesser degree. There has been established a reliable negative correlative connection between object-active thinking type and introversion, and a positive connection between intuitive thinking and introversion, irrespective of academic results. The more introversion is expressed, the more intuition is developed. Academically successful students demonstrated a positive correlation between the abstract-symbolic thinking type and introversion. Extroverts with low academic performance don't have significant correlation connections with the thinking types, whereas it is characteristic for academically successful students to demonstrate a higher level of visual-imaginative, verbal-logical, abstract-symbolic and creative thinking along with an increase in demonstrating extroversion. Practically all thinking types (except for the object-active) are more fully expressed in successful ambiverts; the manifestation of a certain thinking type increases while ambiversion increases. Less academically successful students have a reliable correlative connection between ambiversion and visual-imaginative, abstract-symbolic and creative thinking. Performance of tasks connected with all thinking types irrespective of typological characteristics of students was accompanied by a reliable increase in saturation. More diversified reactions in the process of thinking activity were observed in the cardio-vascular system: introverts and ambiverts who demonstrated high results in the tests, showed significant decrease of heart beat rate in the process of intuitive and visual-imaginative thinking. Extroverts who demonstrated low results in the tests, by contrast, showed an increase in heart beat rate. When students of all typological groups were doing tasks connected with verbal-logical thinking, their heart beat rate significantly increased. Ambiverts and introverts were more successful. Thus, the whole range of psychological and physiological characteristics of a person defines his successful academic performance and real activity.

Keywords: ambiverts; extroverts; introverts; thinking; temperament; anxiety; stress resistance

Вступ

Вища освіта відіграє важливу роль у суспільстві завдяки створенню нових знань, передачі їх студентам і стимулюванню інновацій (Fatima, 2014; Rahman et al., 2015; Martín, 2015). Кожний суб'єкт освітнього процесу (студенти, батьки, викладачі, адміністрація, суспільство) зацікавлений у забезпеченості якості освіти (Dunrong and Fan, 2009; Vorobyova et al., 2014; Santos Rego, 2014; Bergsmann et al., 2015; Đonlagić and Fazlić, 2015; Layne et al., 2015). Проте якості приписують різні значення, інколи суперечливі. Батьки, наприклад, можуть пов'язувати якість освіти з престижністю вузу та можливістю працевлаштування після закінчення навчання. Для студентів якість освіти – це оволодіння професійними знаннями та навичками, які знадобляться у майбутній трудовій діяльності. Для адміністрації – створення системи забезпечення якості освіти (Sav, 2012), умов поєднання теорії та практики (Winter, 2016), добір високопрофесійного кадрового складу. Для викладача – оволодіння знаннями та компетенціями згідно зі спеціальністю, а також позитивні оцінки. Для промисловості та бізнесу якість освіти співвідноситься із життєвою позицією, вміннями, навичками та знаннями випускників. Для суспільства якість пов'язана із задоволенням потреб країни (Dombrovskaya, 2013; Voccansuso et al., 2015), світу (Ibrahim et al., 2015), а також із ціннісними орієнтаціями, громадянською позицією, технократичною або гуманістичною спрямованістю професійної діяльності.

З одного боку, контроль знань студентів – один з основних елементів оцінки якості освіти. Він не лише включає тестування студентів після вивчення матеріалу,

а і здійснюється комплексно, враховуючи загальний рівень підготовки майбутнього фахівця, вміння самостійно опановувати новий матеріал, вирішувати проблемні питання, критично мислити (Gojkovab et al., 2015), використовуючи набуті знання, вміння будувати стосунки з іншими та подати себе як професіонала (Demchig, 2014; Prisacariu, 2015). З іншого боку, необхідно визначити якості особистості, які мають каузальний зв'язок із досягненням високих результатів у навчанні та професійній діяльності. Успішність освоєння знань і реалізація трудової діяльності визначаються не тільки особливостями пізнавальних і психомоторних процесів, що характеризують здібності, а й такими якостями людини як особливості мотивації, темпераменту, емоційно-вольової сфери, характеру, а також фізіологічними та фізичними особливостями (Rubtsova, 2015).

Крім усього зазначеного важливою складовою якості освіти у вищій школі є самовдосконалення, розвиток індивідуальних якостей особистості, формування основних життєвих принципів та кредо, формування себе як неповторної особистості. В інформаційному потоці студент повинен навчитись знаходити необхідне та найсуттєвіше у найкоротші терміни, розвиваючи професійну інтуїцію, яка поліпшує досвід роботи (Marcovici and Blume-Marcovici, 2013; Kaltoft et al., 2014).

Тому мета цієї статті – виявити психофізіологічні якості студентів-біологів, установити зв'язки між успішністю навчання, когнітивними здібностями студентів та психофізіологічними показниками, що необхідно для вдосконалення навчального процесу та спрямованості його на високий рівень професійної освіти для зростання конкурентоспроможності випускників вищів на ринку праці.

Матеріал і методи досліджень

У дослідженні брали участь 175 студенток III–IV курсів (віком 21–24 років) факультету біології, екології та медицини Дніпропетровського національного університету імені Олеся Гончара, які навчаються на денному відділенні за напрямом «Біологія». Всі дівчата дали добровільну згоду на участь в експерименті. Експериментальна група відібрана випадковим чином. Тестування проводили на заліковому тиждні. На момент дослідження особи не пред'являли скарг на здоров'я, наявність головного болю, фізичну стомленість, сонливість. Дослідження проводили у тихому, добре провітрюваному затемненому приміщенні з постійною температурою +20...+22 °С, у ранковій годині, що дозволило виключити вплив добових коливань вегетативного судинного ритму на результати дослідження. Експерименти проводили у два етапи: на першому визначали психофізіологічні та когнітивні особливості студентів за тестовими методами, на другому – визначали рівень сатурації та частоту серцевих скорочень при інтуїтивному, образному та логічному мисленні.

Соціальну екстра-інтроверсію визначали за опитувальником К. Юнга (Jung, 1998). Тип функціональної асиметрії визначали за методиками: поза Наполеона, схрещення пальців рук, провідне око. Формулу темпераменту визначали за А. Беловим (тест у збірці Batarashev et al., 2007). Особистісну та ситуативну тривожність визначали за тестом Спілбергера – Ханіна (тест у збірці Batarashev, 2005). Індекс астенії визначали за шкалою астеничного стану (Rogov, 1999), стресостійкість – за методикою Popova and Sokolov (1994). За тестами-малюнками визначали домінування сенсорного або інтуїтивного мислення. За методикою Г. Резапкіної (Rezapkina, 2006) – домінування типу мислення та співвідношення різних типів мислення (предметно-дійове, абстрактно-символічне, словесно-логічне, наочно-образне, креативність). Вербально-логічне мислення оцінювали за методикою «виключення понять» (Rymskiy and Rymskaya, 1995).

Дослідження ступеня насичення киснем гемоглобіну артеріальної крові (сатурації) та частоти пульсу проводили клінічним неінвазивним методом за допомогою пальцевого пульсоксиметра серії ХУ300 (згідно з інструкцією до приладу) до розумового навантаження та під час уявних операцій.

Сатурація (насичення киснем) – процентне відношення кількості зв'язаного з киснем гемоглобіну (HbO₂) до загальної кількості у крові гемоглобіну (Hb). Принцип дії приладу заснований на тому, що присутній у крові оксигемоглобін і дезоксигемоглобін мають різне поглинання світла в червоній та інфрачервоній області спектра. Оксигемоглобін переважно поглинає світло в інфрачервоній області спектра (940 нм), а дезоксигемоглобін – у червоній (680 нм). Автоматично за аналізом поглинання випромінювання з червоною та з інфрачервоною довжиною хвиль підраховуються значення сатурації, результати виводяться на екран.

Значення частоти пульсу, які отримуються у результаті аналізу пульсової хвилі, що характеризує частоту серцевих скорочень у часі, виводяться на екран приладу. Діапазон вимірів – 70–99%, точність ± 2%.

У другій серії експериментів досліджували інтуїтивний, вербально-логічний та наочно-образний типи мис-

лення. Випробувані у вільному режимі виконували тестові завдання за кожним типом мислення упродовж 5 хвилин. Після кожного тесту робили перерву на 15 хвилин. Фіксували самопочуття студентів. Для дослідження інтуїтивного мислення запропоновано фотографії рослин, тварин, грибів, м'язів та кісток людини, а також підписи до них латиною. Студентам необхідно було із трьох відповідей інтуїтивно вибрати правильну. Зазначимо, що всі об'єкти обрано із програмного матеріалу, який студенти вивчали, але не пам'ятали на даний момент. Якщо студент знав правильну відповідь – завдання пропускатись.

Для дослідження наочно-образного мислення студентам запропоновано завдання зі збірки тестів на розвиток образного мислення (Phillips, 2012).

Вербально-логічне мислення вивчали за тестом М. Войнаровського (Vojnarovskij, 2013). Цей тест спрямований на визначення здібності до логічного мислення: досліджуваному необхідно знайти формальну правильність того або іншого логічного твердження на основі визначеного формулювання. Тест не потребує математичних знань. Всі слова потрібно тлумачити так, як це робиться у повсякденному житті. Реальна дійсність не відіграє ніякої ролі (це дещо ускладнює завдання, оскільки зміст деяких тверджень абсурдний, але текст логічний). Після кожного тесту визначали коефіцієнт успішності виконання завдання у відсотках.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою пакета прикладних програм SPSS 17, рівень взаємозв'язку визначали за критерієм χ^2 Пірсона, порівняння двох незалежних вибірок – за непараметричним U-критерієм Манна – Уїтні, залежність між двома змінними – за коефіцієнтом кореляції Спірмена та вважали статистично значущими за рівня значущості $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення

За тестом К.Г. Юнга кожен людину можна охарактеризувати як екстра- чи інтроверта. Таке диференціювання особистостей у психологів та фізіологів досить важливе. Екстраверсія – підхід, який орієнтує людину в напрямку зовнішнього (об'єктивного), а інтроверсія, навпаки, – у бік внутрішнього (суб'єктивного) світу. На початку дослідження ми припустили, що існує залежність між типологічними особливостями людини, когнітивного діяльності та успішністю навчання. Саме цьому питанню присвячене дане дослідження. Більшість (47%) студентів експериментальної групи належать до амбівертів (табл. 1): вони товариські, не схильні до детального самоаналізу; 35% – екстраверти дуже люблять спілкуватись, зовсім не схильні до самоаналізу, ініціативні, але не наполегливі. Решта (18%) – інтроверти, мало спілкуються з одногрупниками, схильні до самоаналізу, замкнені, пасивні.

Серед 175 студентів, які взяли участь у дослідженні, 87 осіб мали середній бал за навчання А та В за шкалою ECTS, або 82–92 бали, а 88 осіб – С, що відповідає 75–81 балу за навчальну діяльність за 100-бальною шкалою.

У таблиці 2 наведено залежність між якістю та успішністю навчання та типом особистості. Значення критерію χ^2 Пірсона ($\chi^2 = 37,91$, $P < 0,01$) вказує на зв'язок між оцінками за навчання та типом особистості (інтроверт, амбі-

верт, екстраверт). Отримані результати дозволяють зробити висновок, що за співвідношенням усіх трьох видів асиметрій «рука – палець – провідне око» у студентів можна виділити профілі ППП, ПЛП, ПЛЛ, ППЛ, які характеризують різні варіанти прояву праворукості, а також

ЛЛЛ, ЛЛП, ЛПЛ, ЛПП, що характеризують ліворукість. Найпоширенішими типами серед студентів факультету біології, екології та медицини виявилися ППП, ПЛП, ПЛЛ, що характеризує «правшість», менше поширені ЛЛЛ, ЛЛП, ЛПЛ, ЛПП, що характеризує «лівшість».

Таблиця 1

Визначення типу характеру за К. Юнгом

Показник	Сутність показника	Кількість балів	Кількість студентів	%
Інтроверт	соціальна пасивність, спрямованість на внутрішній світ	0–35	32	18
Амбіверт	риса характеру інтроверта та екстраверта проявляються рівною мірою	35–65	82	47
Екстраверт	спрямованість у зовнішній світ	66–100	61	35

Отримані дані дозволили поділити випробовуваних на чотири групи за розвитком можливих типів прояву асиметрії: чисті «правші», праворукі, ліворукі, «лівші». «Правші» ППП склали 35% від усіх досліджуваних, праворукі ПЛП – 28,0%, праворукі ПЛЛ – 23,8%, ліворукі (ЛЛП, ЛПЛ, ЛПП, ЛЛЛ) – 1,2%, а «чисті лівші» – 12%. У роботі Войченко (2014) вказано, що у вибірці з 200–500 осіб 9,5% дівчат – «лівші», а інші «правші», або праворукі, що збігається з нашими даними.

Таблиця 2

Зв'язок між успішністю навчання та типом особистості

Середній бал за ECTS	Тип особистості			Усього студентів
	інтроверти	амбіверти	екстраверти	
A, B	20	56	11	87
C	12	26	50	88
Усього	32	82	61	175

Примітки: кількість ступенів свободи дорівнює 2, $\chi^2 = 37,91$, критичне значення χ^2 за $P < 0,01$ становить 9,21, зв'язок між факторною та результативними ознаками статистично достовірний за $P < 0,01$.

Про відсутність залежності між успішністю навчання та проявом асиметрії говорять результати, наведені у таблиці 3. Домінує холеричний тип темпераменту (14% студентів), сангвінічний (12%), холерично-сангвінічний (9%), флегматичний (6%) та меланхолічний (5%) поширені менше. Явно виражений холеричний темперамент у 5% осіб, сангвінічний – у 4%, холерично-сангвінічний – у 3%, холерично-флегматичний – у 2%, флегматичний – у 4%, сангвінічно-флегматичний – у 3%, меланхолічний – у 8%, сангвінічно-меланхолічний – у 3%, флегматично-меланхолічний – у 1% студентів. У решти – 21% осіб середньовиражені риси всіх типів темпераменту. Отже, більшість студентів-біологів мають сильний тип нервової системи, що відповідає сангвінічно-холеричному темпераменту, зумовлює високу працездатність та витривалість у навчанні. Досліди Я. Стреляу (Strelyau, 1982) не дозволили встановити кореляційної залежності між рівнем інтелектуальних здібностей і властивостями темпераменту. Серед індивідуумів із високим рівнем інтелектуальних здібностей присутні як холерики та сангвініки, так і флегматики та меланхоліки.

Феномену тривожності, який має особливе місце у житті людини, його впливу на формування та розвиток особистості нині присвячено значну кількість наукових праць. Тривожність безпосередньо впливає на успішність навчання. Рівень тривоги студентів не пов'язаний із результатами успішності їх навчання (табл. 4). Проте виявлено зв'язок між успішністю навчання та ситуативною

тривожністю (табл. 5): в успішніших студентів помірний рівень ситуативної тривоги, у менш успішних виявлено помірний та високий рівні тривоги під час залікового тижня.

Таблиця 3

Відношення між успішністю навчання та проявом функціональної асиметрії

Середній бал за ECTS	Прояв асиметрії			Усього студентів
	«правші»	праворукі	«лівші», ліворукі	
A, B	30	45	12	87
C	31	46	11	88
Усього	61	91	24	175

Примітки: кількість ступенів свободи дорівнює 2, $\chi^2 = 0,07$, критичне значення χ^2 за $P < 0,05$ становить 5,99, зв'язок між факторною та результативними ознаками відсутній.

Таблиця 4

Зв'язок між успішністю навчання та рівнем особистісної тривоги

Середній бал за ECTS	Рівень особистісної тривоги			Усього студентів
	низький	помірний	високий	
A, B	47	30	10	87
C	33	33	22	88
Усього	90	63	22	175

Примітки: кількість ступенів свободи дорівнює 2, $\chi^2 = 0,32$, критичне значення χ^2 за $P < 0,05$ становить 5,99, зв'язок між факторною та результативними ознаками відсутній.

Таблиця 5

Зв'язок між успішністю навчання та рівнем ситуативної тривоги

Середній бал за ECTS	Рівень ситуативної тривоги			Усього студентів
	низький	помірний	високий	
A, B	20	40	27	87
C	10	31	47	88
Усього	30	71	74	175

Примітки: кількість ступенів свободи дорівнює 2, $\chi^2 = 8,97$, критичне значення χ^2 за $P < 0,05$ становить 5,99, зв'язок між факторною та результативними ознаками статистично достовірний за $P < 0,05$.

Підвищений стан тривоги дезорганізує навчальну діяльність. Тому необхідно звернути увагу на заходи щодо оптимізації рівня тривожності, що зробить процес навчання ефективнішим: на основі зняття зайвого напруження, активації уваги, пам'яті, уяви, мислення та інтелектуальних здібностей студентів. Аналіз взаємодії між типом особистості та рівнем ситуативної тривоги вказує на

взаємозв'язок між цими параметрами (табл. 6). У більшості інтровертів та екстравертів спостерігається високий рівень ситуативної тривоги (45–62 бали), в амбівертів – помірний (31–41 бали). Аналізуючи успішність навчання, можна сказати, що інтроверти та амбіверти з низьким, або помірним рівнем тривожності показують вищі результати під час навчання. Складніше навчатись екстравертам із високим рівнем тривожності. Пред'явлення ними високих вимог до себе, прагнення до отримання найвищих оцінок на фоні високого рівня ситуативної тривожності може бути причиною розвитку невротичного конфлікту, емоційних зривів або психосоматичних захворювань. Тому успішність навчання цих студентів досягається більшою ціною, але це питання потребує додаткового вивчення.

Таблиця 6

Зв'язок між екстра- та інтроверсією та рівнем ситуативної тривоги

Тип особистості	Рівень ситуативної тривоги			Усього студентів
	низький	помірний	високий	
Інтроверт	10	11	32	32
Амбіверт	10	50	22	82
Екстраверт	10	10	41	61
Усього	30	71	74	175

Примітки: кількість ступенів свободи дорівнює 4, $\chi^2 = 36,48$, критичне значення χ^2 за $P < 0,01$ становить 13,28, зв'язок між факторною та результативними ознаками статистично достовірний за $P < 0,01$.

У більшості студентів астенія відсутня або слабо виражена (табл. 7). Студенти з помірним рівнем розвитку астенії характеризуються достатньо вираженим флегматичним і меланхолічним типом темпераменту, тобто їм властива слабка сила нервових процесів. Під терміном «астенічний стан» або «зниження психічної активації» розуміють такий психічний стан, який характеризується нервовою слабкістю та підвищеною виснаженістю нервових центрів, подразливістю, зниженням продуктивності психічних процесів, порушенням сну, фізичною слабкістю та іншими вегето-судинними порушеннями.

Таблиця 7

Визначення індексу астенії

Показник	Кількість балів	Кількість студентів	%
Астенія відсутня	30–50	128	73
Слабовиражена астенія	51–75	42	24
Помірна астенія	76–100	5	3
Виражена астенія	101–120	–	–

Стресостійкість – термін, що характеризує певну сукупність особистісних якостей, які дозволяють людині переносити значні інтелектуальні, вольові та емоційні навантаження (перевантаження), зумовлені особливостями професійної діяльності, без особливих шкідливих наслідків для діяльності, оточуючих і свого здоров'я. У результаті тестування на стійкість до стресу встановили, що 34% студентів мали високий і середній рівень стресостійкості, але у більшості біологів (65%) – низький (табл. 8).

У своєму житті кожна людина постійно перебуває під впливом комплексу стрес-факторів, до того ж будь-який вид професійної діяльності пов'язаний зі стресами різного характеру, і емоційне реагування на них може спричинити

ти «професійне вигорання». Тому висока стресостійкість – обов'язкова вимога для більшості спеціальностей. У цьому плані одна з практичних рекомендацій для студентів – розвивати свою стресостійкість, вчитись відключатись від зайвого та планувати власний час, виділяючи пріоритетні та значимі справи. Враховуючи малу кількість студентів із високим рівнем стресостійкості, ми не можемо провести статистичний аналіз даних, але зазначимо, що амбіверти та інтроверти мали вищі показники стресостійкості, ніж екстраверти. Останні характеризуються найнижчими показниками стійкості до стресу.

Таблиця 8

Визначення рівня стресостійкості

Рівні стресостійкості	Характеристика стійкості до стресу	Кількість балів	Кількість студентів	%
Дуже низький	ймовірна нестійкість в умовах стресу	52–54	2	1,2
Низький		50–51	112	64
Нижче середнього		46–49	25	14
Трохи нижче середнього		42–45	11	6
Середній	здатність до подолання стресу, активні та успішні дії	38–41	12	7
Трохи вищий за середній		34–37	5	3
Вище середнього		30–33	2	1,2
Високий	стресова стійкість, сміливість, рішучість, схильність до ризику	26–29	5	3
Дуже високий		18–25	1	0,6

Для вивчення когнітивних здібностей студентів-біологів за тестовими методами дослідили деякі види мислення: предметно-дійове, наочно-образне, словесно-логічне, абстрактно-символічне, креативне, інтуїтивне (табл. 9). Встановили, що більшість успішних студентів факультету мають високий рівень наочно-образного, предметно-дійового та креативного типу мислення. Домінування саме цих видів мислення відмічали й у менш успішних студентів, але вони набрали меншу кількість балів, ніж студенти попередньої групи. Предметно-дійове мислення спирається на безпосереднє сприйняття предметів, реальне перетворення ситуації у процесі дій із предметами. Особи з розвиненим предметно-дійовим типом мислення засвоюють інформацію через рухи. Наочно-образне мислення спирається на уявлення та образи. Його функції пов'язані з уявленням ситуації та її зміною, яку людина хоче отримати в результаті своєї діяльності. Саме цей тип мислення домінує у студентів вивченої групи, що виражається у прагненні біологів до творчості, легкого сприйняття інформації, яка подається у вигляді презентацій або супроводжується ілюстраціями. Такий тип викладу матеріалу майже за всіма дисциплінами дозволяє активізувати обидві півкулі мозку та запам'ятати більшу кількість матеріалу, а закріплення теоретичного матеріалу на практичних і лабораторних заняттях дозволяє триваліше його утримувати в пам'яті.

Успішні біологи володіють креативним типом мислення, що відповідає потребам сьогодення. Креативність – здатність мислити творчо, знаходити нестандартні розв'язки задач. Це – рідкісна та незамінна якість, яка відрізняє талановитих та успішних людей у будь-якій сфері діяльності.

У 53% та 40% студентів середній та високий рівень словесно-логічного типу мислення, яке здійснюється за допомогою логічних операцій із поняттями. Вони можуть сформулювати свої думки та донести їх до інших. Цей тип мислення необхідний для описання та узагальнення результатів наукової роботи.

Таблиця 9

Рівень розвитку типу мислення

Тип мислення	Середній бал за ECTS			
	A, B		C	
	серед-не, M	середньо-квадратичне відхилення, SD	серед-не, M	середньо-квадратичне відхилення, SD
Предметно-дійове	5,7	1,5	3,2	1,3
Наочно-образне	6,3	1,3	5,2	1,2
Словесно-логічне	4,8	0,9	3,1	1,4
Абстрактно-символічне	4,4	1,4	2,8	0,6
Креативне	5,0	1,6	4,8	1,4
Інтуїтивне	3,2	1,1	1,7	0,2

Щодо абстрактно-символічного типу мислення, яке здійснюється за допомогою математичних формул і операцій, цей тип розвинутий у біологів слабше, ніж попередні, хоча програма підготовки бакалаврів включає вивчення точних дисциплін, таких як вища матема-

тика та фізика. Цікаво, що є контингент (4%) із високим рівнем розвитку цього типу мислення. Ці студенти можуть висувати гіпотези у своїх наукових роботах і наближатись до відкриття, вони виступали на конференціях із результатами наукових робіт, проявили себе як допитливі та творчі науковці.

У біологів низькі показники інтуїтивного мислення. Це найбільш загадковий та найменш вивчений тип уявних операцій, який пов'язують з осяянням. Вважаємо, що студентам, які прагнуть до самоудосконалення, необхідно звернути увагу саме на нього, інтуїція знадобиться не тільки під час написання тестів, а й у професійній сфері для того, щоб бути конкурентоспроможним фахівцем.

Для аналізу зв'язку змінних (типів мислення та типологічних особливостей) використано метод рангової кореляції Спірмена та розраховано кореляцію у двох групах студентів із різним рівнем успішності (табл. 10). У студентів обох груп установили достовірні негативні кореляційні зв'язки між предметно-дійовим типом мислення та інтроверсією, позитивні – між інтуїтивним мисленням та інтроверсією. Тобто чим більше виражена інтроверсія, тим менше розвинений предметно-дійовий тип мислення та більша інтуїція. До того ж успішніші у навчанні студенти мають позитивну кореляцію між абстрактно-символічним типом мислення та інтроверсією.

Таблиця 10

Результати кореляційного аналізу між типом мислення та типологічними особливостями студентів із різним рівнем успішності у навчанні

Типологічні особливості особистості	Типи мислення					
	предметно-дійове	наочно-образне	словесно-логічне	абстрактно-символічне	креативне	інтуїтивне
Середній бал за ECTS A, B						
Інтроверти	-0,45*	0,10	-0,22	0,38*	-0,10	0,84*
Амбіверти	0,32	0,52*	0,70*	0,51*	0,66*	0,52*
Екстраверти	0,10	0,80*	0,65*	0,51*	0,52*	-0,03
Середній бал за ECTS C						
Інтроверти	-0,50*	0,07	-0,31	0,24	-0,06	0,71*
Амбіверти	0,21	0,49*	0,20	0,42*	0,50*	0,39
Екстраверти	0,10	0,30	0,22	0,11	0,21	-0,01

Примітка: * – статистично вірогідна кореляція між ознаками за $P < 0,05$.

В екстравертів із низькою успішністю вірогідні кореляційні зв'язки з типами мислення відсутні, тоді як для успішних студентів характерно разом зі збільшенням прояву екстраверсії проявляти вищий рівень наочно-образного, словесно-логічного, абстрактно-символічного та креативного типів мислення ($r = 0,51-0,80$ за $P < 0,05$).

Майже всі типи мислення (крім предметно-дійового) найяскравіше виражені в успішних амбівертів, причому прояв певного типу мислення збільшується зі збільшенням прояву амбіверсії. У менш успішних студентів суттєвий кореляційний зв'язок між амбіверсією та наочно-образним, абстрактно-символічним і креативним мисленням. Така якість як креативність допомагає студентам використовувати всі ресурси особистості для оптимізації пізнавальної та трудової діяльності. Враховуючи той факт, що професійні інтереси розвиваються під час навчання у виші, необхідна систематична діагностика професійних навичок для якісної та всебічної оцінки про-

BLEM, які виникають під час підготовки спеціалістів, із розробкою заходів щодо їх усунення.

Мислення – завжди активний процес пізнавальної діяльності, який потребує адекватно метаболічного забезпечення, і насамперед, забезпечення киснем, що досягається інтенсифікацією кровопостачання. Тому наступний етап дослідження – визначення сатурації та частоти серцевих скорочень (ЧСС) під час уявної активності (табл. 11, 12). Для статистичного порівняння експериментальних даних із контролем використано непараметричний U-критерій Манна – Уїтні.

Виконання завдань на всі типи мислення незалежно від типологічних особливостей студентів супроводжувалось вірогідним збільшенням насичення гемоглобіном артеріальної крові. Більш різноспрямовані реакції за уявної активності спостерігали з боку серцево-судинної системи: в інтро- та амбівертів, які показали високі результати тестів, при інтуїтивному мисленні зареєстроване вірогідне зменшення ЧСС, а в екстравертів, які дали мало

правильних відповідей, навпаки – її збільшення. Інтуїтивне мислення, яке потребує зосередженості та спокою, щоб звернутись до підсвідомого та винести у свідомість правильну інформацію, супроводжується уповільненням серцевого ритму.

Подібну ситуацію спостерігали і за умов наочно-образного мислення: зменшення ЧСС в амбівертів та збільшення в екстравертів. Виконання завдань на словесно-логічне мислення вірогідно збільшувало ЧСС у студентів

усіх типологічних груп. Успішнішими були амбіверти та інтроверти, а екстраверти показали низькі результати. Отже, чим вищий рівень розвитку логічного мислення, тим більшою мірою активується серцево-судинна система. Після виконання завдання успішні студенти повідомили, що докладали зусиль під час тестування. Менш успішні студенти зазначили, що їм було складно прослідкувати логічний зв'язок у твердженнях, а відповіді вони давали наважання, не докладаючи зусиль.

Таблиця 11

Сатурація при розумовій діяльності у студентів із різними типологічними особливостями

Типологічні особливості особистості	Ступінь насичення киснем гемоглобіну артеріальної крові, %			
	контроль (перед розумовим навантаженням)	інтуїтивне мислення	наочно-образне мислення	словесно-логічне мислення
Інтроверти	92,3 ± 1,21	97,7 ± 1,10*	94,1 ± 1,04*	95,7 ± 0,83*
Амбіверти	92,5 ± 1,44	95,2 ± 0,68*	94,1 ± 0,96*	96,2 ± 0,76*
Екстраверти	92,2 ± 1,10	94,5 ± 1,02*	95,2 ± 0,98*	98,1 ± 1,32*

Примітка: * – відмінності результатів експериментальної групи порівняно з контролем вірогідні за $P < 0,05$.

Таблиця 12

ЧСС при розумовій діяльності студентів із різними типологічними особливостями

Типологічні особливості особистості	ЧСС, уд./хв			
	контроль	інтуїтивне мислення	наочно-образне мислення	словесно-логічне мислення
Інтроверти	84,2 ± 2,67	79,1 ± 2,13*	84,6 ± 2,29	95,7 ± 0,83*
Амбіверти	84,7 ± 3,09	81,2 ± 3,06*	81,1 ± 2,25*	96,2 ± 0,76*
Екстраверти	79,7 ± 2,08	84,8 ± 2,35*	85,2 ± 2,13*	84,2 ± 1,03*

Примітка: див. табл. 11.

Вважаємо, що інтро-екстраверсія – один із типологічних особистісних факторів, який необхідно враховувати у процесі навчання для створення сприятливішого середовища, збереження психологічного здоров'я студентів, що безпосередньо впливає на підвищення якості освіти. Педагогічні підходи до естра- та інтровертів суттєво відрізняються на всіх етапах освітнього процесу (Blandin, 2013; Davidson et al., 2015).

Виявлені закономірності показують, що більшість студентів факультету складають амбіверти, на подібний розподіл випадкової вибірки вказують також інші автори (Georgiev et al., 2014), й амбіверти найуспішніші в навчанні. Існує вірогідний зв'язок між успішністю навчання та ситуативною тривожністю (Dewaele, 2007): у більшості успішніших студентів помірний рівень ситуативної тривоги, а у менш успішних – помірний та високий рівні тривоги під час залікового тижня. Подібні результати – зниження показників навчання та зменшення використання ефективних стратегій підготовки до тестів у студентів із високим рівнем тривожності отримані у дослідженні Cassady (2004). Аналізуючи успішність навчання, зазначимо, що інтроверти та амбіверти з низьким або помірним рівнем тривожності мають вищі результати навчання. Складніше навчатись екстравертам із високим рівнем тривожності. Висока стресостійкість – обов'язкова вимога для більшості спеціальностей (Griffith and Brem, 2004).

Успішні студенти-біологи мають високий рівень наочно-образного, предметно-дійового та креативного типу мислення. Взагалі мислення має мотивований та цілеспрямований характер. Усі операції розумового процесу викликані потребами, мотивами, інтересами особистості, її цілями та завданнями (Dai et al., 1998).

Велике значення має активне прагнення людини до розвитку свого інтелекту та готовність активно використовувати його в корисній для людства діяльності.

Завдяки вивченню індивідуальних особливостей студентів викладач отримує цінну інформацію не тільки про знання, вміння та навички студентів, а й, головне, про особистості фуркантів, їх психофізіологічний стан. Ці знання необхідні для подальшого планування процесу навчання та обрання методів навчання, виховання, та, головне, вони допомагають удосконалити систему контролю якості знань з урахуванням психічного здоров'я студентів (Erlbaum, 2005; Offir et al., 2007). Адже розвиток фізичних, моральних і естетичних якостей студентів безпосередньо залежить від уважності викладача та правильного вибору засобів та системи контролю знань. Інноваційні методи навчання з урахуванням індивідуально-типологічних особливостей студентів дозволять зробити навчальний процес ефективнішим, а результати контролю об'єктивнішими.

Висновки

Більшість (47%) студентів експериментальної групи – амбіверти, 35% – екстраверти, 18% – інтроверти. Існує статистично вірогідний зв'язок між оцінками за навчання та типом особистості. Успішніші студенти-амбіверти та інтроверти. Екстраверти показують нижчі результати у навчанні.

За розвитком можливих типів прояву асиметрії серед студентів-біологів «правіші» ППП склали 35% усіх досліджуваних, праворукі ПЛП – 28% та праворукі ПЛЛ – 23,8%, ліворукі (ЛЛП, ЛПЛ, ЛПП, ЛЛЛ) становили

1,2%, а «лівші» – 12%. Залежність між успішністю навчання та проявом асиметрії відсутня.

У більшості біологів сангвінічно-холеричний темперамент і слабо виражена чи відсутня астения, що свідчить про силу нервових процесів та природні задатки витримувати навантаження; 65% студентів притаманний низький рівень стійкості до стресу, що негативно впливає на їх навчання. У більшості біологів (незалежно від рівня успішності у навчанні) низький і помірний рівень особистісної тривоги. Зареєстровано помірний рівень ситуативної тривоги у студентів, які мають середній бал за навчання А та В і високий у студентів з оцінками С. Відсутня взаємодія між балом за навчання та рівнем особистісної тривоги, але існує вірогідний зв'язок між успішністю навчання та ситуативною тривожністю.

Установлено достовірний зв'язок між типом особистості та рівнем ситуативної тривоги. У більшості інтровертів і екстравертів високий рівень ситуативної тривоги, в амбівертів – помірний. Інтроверти та амбіверти з низьким, або помірним рівнем тривожності мають вищі результати навчання. Складніше навчатись екстравертам із високим рівнем тривожності.

Успішні студенти-біологи мають високий рівень наочно-образного, предметно-дійового та креативного типу мислення, чому сприяє використання наочності у процесі навчання, достатня кількість практичних і лабораторних робіт. У 53% та 40% студентів середній та високий рівень словесно-логічного типу мислення, яке здійснюється за допомогою логічних операцій із поняттями. Вони можуть сформулювати свої думки та донести до інших. Меншою мірою у біологів розвинене абстрактно-символічне та інтуїтивне мислення. У студентів установлено вірогідні негативні кореляційні зв'язки між предметно-дійовим типом мислення та інтроверсією, позитивні – між інтуїтивним мисленням та інтроверсією. Тобто чим більше виражена інтроверсія, тим менше розвинений предметно-дійовий тип мислення та більше інтуїція. Успішні в навчанні студенти мають позитивну кореляцію між абстрактно-символічним типом мислення та інтроверсією.

Для успішних студентів характерно разом зі збільшенням прояву екстраверсії проявляти вищий рівень наочно-образного, словесно-логічного, абстрактно-символічного та креативного типів мислення.

Майже всі типи мислення більше виражені в успішних амбівертів, причому прояв певного типу мислення збільшується зі збільшенням прояву амбіверсії. У менш успішних студентів суттєвий кореляційний зв'язок між амбіверсією та наочно-образним, абстрактно-символічним і креативним мисленням. Така якість як креативність допомагає студентам використовувати всі ресурси особистості для оптимізації пізнавальної та трудової діяльності.

Виконання завдань на всі типи мислення незалежно від типологічних особливостей студентів супроводжувалось вірогідним збільшенням насичення гемоглобіном артеріальної крові. Більш різноспрямовані реакції за уявної активності спостерігали з боку серцево-судинної системи: в інтро- та амбівертів, які показали високі результати тестів, при інтуїтивному мисленні – вірогідне зменшення ЧСС, а в екстравертів, які дали мало пра-

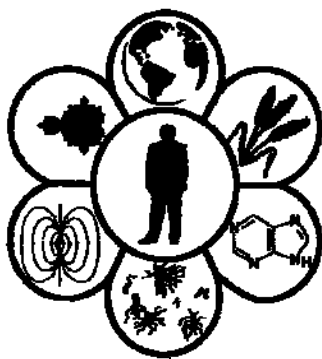
вильних відповідей, навпаки, – збільшення. Подібну ситуацію спостерігали за умов наочно-образного мислення: зменшення ЧСС в амбівертів та збільшення в екстравертів. Під час виконання завдань на словесно-логічне мислення ЧСС у студентів усіх типологічних груп вірогідно збільшувалась. Успішнішими були амбіверти та інтроверти, екстраверти показали низькі результати тестування. Отже, чим вищий рівень розвитку логічного мислення, тим більше активується серцево-судинна система, хоча фізіологічні механізми цього явища потребують подальших досліджень.

Бібліографічні посилання

- Batarshev, A.V., 2005. Bazovye psichologicheskie svojstva i samoopredelenie lichnosti: Prakticheskoe rukovodstvo po psichologicheskoy diagnostike [Basic psychological characteristics and self-identity: A practical guide to psychological diagnostics]. Rech', Sankt-Peterburg (in Russian).
- Batarshev, A.V., Alekseeva, I.J., Majorova, E.V., 2007. Diagnostika professional'no vazhnyh kachestv [Diagnostics of professionally important qualities]. Piter, Sankt-Peterburg (in Russian).
- Bergsmann, E., Schultes, M.T., Winter, P., Schober, B., Spiel, C., 2015. Evaluation of competence-based teaching in higher education: From theory to practice. Eval. Program Plann. 52, 1–9.
- Blandin, K., 2013. Temperament and typology. J. Anal. Psychol. 58, 118–136.
- Boccanfuso, D., Larouche, A., Trandafir, M., 2015. Quality of higher education and the labor market in developing countries: Evidence from an education Reform in Senegal. World Dev. 74, 412–424.
- Bojchenko, J. S. 2014. Adaptacionnye vozmozhnosti lichnosti sovremennogo studenta [Adaptive possibilities and individual-psychological characteristics of a modern student's personality]. Sovremennye Nauchnye Issledovaniya 2, 266–269 (in Russian).
- Cassady, J.C., 2004. The influence of cognitive test anxiety across the learning-testing cycle. Learn. Instr. 14(6), 569–592.
- Dai, D.Y., Moon, S.M., Feldhusen, J.F., 1998. Achievement motivation and gifted students: A social cognitive perspective. Educ. Psychol. 32, 1532–6985.
- Davidson, B., Gillies, R.A., Pelletier, A.L., 2015. Introversion and medical student education: Challenges for both students and educators. Teach. Learn. Med. 27(1), 99–104.
- Demchig, B., 2014. Knowledge management capability level assessment of the higher education institutions: Case study from Mongolia. Procedia Soc. Behav. Sci. 174, 3633–3640.
- Dewaele, J-M., 2007. The effect of multilingualism, sociobiographical, and situational factors on communicative anxiety and foreign language anxiety of mature language learners. International Journal of Bilingualism 11(4), 391–409.
- Dombrovskaya, S.M., 2013. Suchasni tehnologii' vprovadzhenja innovacijnyh derzhavnyh mehanizmiv reformuvannja systemy osvity v Ukrai'ni [Modern technologies of implementation of state innovative mechanisms of reforming system in education in Ukraine]. Universytets'ki Naukovi Zapysky 2(46), 5–11 (in Ukrainian).
- Đonlagić, S., Fazlić, S., 2015. Quality assessment in higher education using the SERVQUAL model. Management 20(1), 39–57.
- Dunrong, B., Fan, M., 2009. On student evaluation of teaching and improvement of the teaching quality assurance system at higher education institutions. Chinese Educ. Soc. 42(2), 100–115.

- Ebrahimi, S., Rezaee, R., 2015. Current state of professional and core competency in pediatric residency program at Shiraz University of Medical Sciences: A local survey. *J. Adv. Med. Educ. Prof.* 3(4), 183–188.
- Fatima, H., 2014. Research, higher education and the quality of teaching: Inquiry in a Japanese academic context. *Res. High. Educ.* 24, 10–25.
- Ferris, T., 2009. Inside intuition. *IEEE T. Prof. Commun.* 52(1), 115–116.
- Georgiev, S.Y., Christov, C.V., Philipova, D.T., 2014. Ambiversion as independent personality characteristic. *Act. Nerv. Super. Rediviva* 56(3–4), 65–72.
- Gojkovab, G., Stojanović, A., Gojkov-Rajić, A., 2015. Critical thinking of students – indicator of quality in higher education. *Procedia Soc. Behav. Sci.* 191, 591–596.
- Griffith, J.A., Brem, S.K., 2004. Teaching evolutionary biology: Pressures, stress, and coping. *Journal of Research in Science Teaching* 41(8), 791–809.
- Ibrahim, H., Abdel-Razig, S., Nair, S.C., 2015. Medical students' perceptions of international accreditation. *Int. J. Med. Educ.* 6, 121–124.
- Jung, K.G., 1998. *Psihologicheskie tipy* [Psychological types]. Popuri, Moscow (in Russian).
- Kaltoft, M.K., Nielsen, J.B., Salkeld, G., Dowie, J., 2014. Enhancing informatics competency under uncertainty at the point of decision: A knowing about knowing vision. *Stud. Health Technol. Inform.* 205, 975–979.
- Layne, P., 2015. Transforming higher education institutions. In: Layne, P.C., Lake, P. (Eds.) *Professional learning and development in schools and higher education*. Springer, 11, 27–45.
- Martin, P., Potočnik, K., Fras, A.B., 2015. Determinants of students' innovation in higher education. *Studies in Higher Education* 1–15.
- Molodyh, E.S., 2005. *Vlijanie profilja lateral'noj organizacii mozga na uspeshnost' adaptacii k obrazovatel'nomu procesu lic podrostkovogo i junosheskogo vozrasta* [Impact profile lateral brain organization for successful adaptation to the educational process of persons of teenage and youthful age]. Synopsis, Tomsk (in Russian).
- Offir, B., Bezalel, R., Barth, I., 2007. Introverts, extroverts, and achievement in a distance learning environment. *The American Journal of Distance Education* 21(1), 3–19.
- Phillips, C.F., 2012. *Kreativ i obraznoe myshlenie: 50 + 50 zadach dlja trenirovki* [Creative and imaginative thinking: 50 + 50 tasks for training]. Jeksmo, Moscow (in Russian).
- Popova, Z.M., Sokolov, I.V., 1994. *Stress zhizni* [Stress of life]. Lejla, Sankt-Peterburg (in Russian).
- Prisacariu, A., 2015. New perspectives of quality assurance in european higher education. *Procedia Soc. Behav. Sci.* 180, 119–126.
- Rahman, A., Norashikin, H., Aluwi, A., 2015. Satisfaction on blended learning in a public higher education institution: What factors matter? *Procedia Soc. Behav. Sci.* 211, 768–775.
- Rezapkina, G.V., 2006. *Otbor v profil'nye klassy* [Selection to profile classes]. Genezis, Moscow (in Russian).
- Rogov, E.I., 1999. *Nastol'naja kniga prakticheskogo psihologa* [Practical psychologist's textbook]. Vldos, Moscow (in Russian).
- Rubtsova, N.E., 2015. *Osnovnye napravlenija klassifikacij professional'noj dejatel'nosti* [The main directions of professional activity classifications]. *Psihologija i Psihotehnika* 5, 501–510 (in Russian).
- Rymskiy, S., Rymkaya, R.R., 1995. *Al'manah psihologicheskikh testov* [The almanac of psychological tests]. KSP, Moscow (in Russian).
- Santos Rego, M.Á., 2014. Purposes of the university and employability challenges in higher education. *Procedia Soc. Behav. Sci.* 139, 16–25.
- Sav, G.T., 2012. Productivity, efficiency, and managerial performance regress and gains in United States universities: A data envelopment analysis. *Advances in Management and Applied Economics* 2(3), 13–32.
- Streljau, J., 1982. *Rol' temperamenta v psihicheskom razvitii* [The role in the mental development of temperament]. Nauka, Moscow (in Russian).
- Vojnarovskij, M., 2013. *Test na logicheskoe myshlenie* [Test for logical thinking]. Retrieved from www.testoteka.narod.ru/pozn/1/10-on.html.
- Vorobyova, O.P., Zhdanova, K.O., Zarubinska, I.B., Kalashnikova, S.A., Kozievska, O.I., Lyniova, I.O., Lugovyj, V.I., Slyusarenko, O.M., Talanova, Z.V., 2014. *Avtonomija ta vrjaduvannja u vyshnij osviti* [Autonomy and management in higher education]. Nacional'na Akademija Pedagogichnyh Nauk Ukrainy, Instytut Vyshhoi' Osvity, Kyiv (in Ukrainian).
- Winter, P., 2016. Using a high-performance planning model to increase levels of functional effectiveness within professional development. *Journal for Nurses in Professional Development* 32(1), 33–40.

Надійшла до редколегії 19.02.2016



УДК612.398:616.12-005.4+615.22-092.9

Вплив кардіопротекторів на протеазно-інгібіторний потенціал крові та серця щурів з адреналін-індукованою ішемією міокарда

В.А. Паронік¹, О.Е. Шаульська¹, Л.М. Дяченко², А.І. Шевцова¹

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

²Дніпропетровський державний аграрно-економічний університет, Дніпропетровськ, Україна

Проведене комплексне дослідження впливу корвітину та доксицикліну на фізіологічний стан і протеазно-інгібіторний баланс крові та серцевого м'язу у щурів з адреналін-індукованою ішемією міокарда (АІМ). Активність матриксних металопротеїназ 2 та 9 (ММП2 та ММП9) визначено методом ензим-зимографії, активність трипсиноподібних ензимів (ТПЕ), рівень альфа-1 інгібітора протеїназ (ІП1) та альфа-2 макроглобуліну (α 2-МГ) – методами спектрофотометричного аналізу з використанням специфічного субстрату. За АІМ порушується протеазно-інгібіторний потенціал крові та серцевого м'язу. У плазмі крові підвищується активність ММП9, проММП9/2 та рівень ІП1 на тлі незмінної активності ММП2. Активність ТПЕ та рівень ІП1 у щурів з АІМ не змінюються, але знижується рівень α 2-МГ. У серцевому м'язі, навпаки, збільшується активність ММП2 та рівень ІП1. Застосування корвітину сприяє відновленню рівня ММП, але порушує баланс системи ТПЕ/ІП1- α 2-МГ. За впливу доксицикліну блокується активність ММП9, значно знижується активність ММП2, що свідчить про інгібувальний вплив цього препарату на активність досліджуваних матриксних металопротеїназ. Зроблено висновок про перспективність визначення протеазно-інгібіторного балансу під час дослідження ефективності дії фармакологічних препаратів.

Ключові слова: адреналінова ішемія міокарда; інгібітори протеолізу; матриксні металопротеїнази; кардіопротектори

The effect of cardioprotectors on protease-inhibitory potential in blood and heart of rats with epinephrine-induced myocardial ischemia

V. Paronik¹, O. Shaul's'ka¹, L. Diachenko², A. Shevtsova¹

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

²Dnipropetrovsk State Agrarian and Economic University, Dnipropetrovsk, Ukraine

Coronary heart disease is one of the major causes of illness and of deaths in Europe, therefore the definition of the signaling pathways involved in cardioprotection represents a challenging goal in order to discover novel pharmacological approaches. One of the mechanisms included in the implementation of signaling methods is proteolysis, so the aim of our study was to study the balance between activity of the proteolytic enzymes and their inhibitors in the experimental myocardial ischemia of rats and the impact of corvitin (C) and doxycycline (D) on these parameters. Ischemia was induced in Wistar rats by the intraperitoneal injection of epinephrine at a dose of 0.2 mg/100 g of weight during 10 days. All animals were divided into 4 groups: 1 – control (8 rats), 2 – rats with epinephrine-induced myocardial ischemia (EIM, n = 10), 3 – rats, which were entered C after completion of epinephrine injections (n = 10), 4 – rats, which accepted D during 6 days after finishing of epinephrine injections (n = 10). The electrical activity of the heart was recorded on an electrocardiogram (ECG). Activities of matrix metalloproteinases 2 and 9 (MMP2, MMP9) were studied by enzyme-zymography, the activity of trypsin-like enzymes (TLE), levels of alpha-1 proteinase inhibitor (IP1) and alpha-2-macroglobulin (α 2-MG) in the blood and the heart were determined by spectrophotometric methods. The experimental results suggest that epinephrine injections lead to changes in the ECG typical for ischemic myocardium. The data obtained showed that the protease-inhibitory balance in the blood and in heart was disturbed. Activity of MMP9, proMMP9/2 and level of IP1 increased in blood plasma of rats with EIM, but activities of MMP2, TLE were unchanged in this group. In the heart muscle the activity

ДЗ «Дніпропетровська державна медична академія МОЗ України», вул. Дзержинського, 9, Дніпропетровськ, 49044, Україна
SE "Dnipropetrovsk Medical Academy of the Health Ministry of Ukraine", Dzerzhinsky Str., 9, Dnipropetrovsk, 49044, Ukraine

Дніпропетровський державний аграрно-економічний університет, вул. Ворошилова, 25, Дніпропетровськ, 49600, Україна
Dnipropetrovsk State Agrarian and Economic University, Voroshylova Str., 25, Dnipropetrovsk, 49600, Ukraine
Tel.: +38-099-735-09-10. E-mail: paronic@ukr.net, info@dsau.dp.ua

of MMP2 and level of IP1 increased. Administration of C resulted in the recovery of MMPs level, but disturbed the balance in the system TLE/IP1- α 2-MG. Administration of D blocked the activity of MMP9, significantly reduced the activity of MMP2, which testifies the inhibitory effect of this drug on the activity of matrix metalloproteinases. Based on these results, we conclude that definition of protease-inhibitory balance in the blood plasma of patients with coronary artery disease is promising as an additional diagnostic complex and for monitoring of the effectiveness of therapy.

Keywords: epinephrine-induced myocardial ischemia; inhibitors of proteolysis; matrix metalloproteinases; cardioprotectors

Вступ

Ішемічна хвороба серця (ІХС) – серйозна проблема сучасності. Незважаючи на досягнення у профілактиці та розробленні лікувальних заходів, ІХС залишається найпоширенішим захворюванням на планеті, лідером за частотою ускладнень і сумної медичної статистики. Для захисту міокарда в умовах ішемії застосовують фармакологічні препарати, які мають різноманітні точки дії та ефекти впливу, об'єднані під загальною назвою «кардіопротектори». Серед препаратів із кардіопротекторною дією велику увагу привертають біофлавоноїд кверцетин і антибіотик доксициклін. Обидва препарати володіють антиоксидантними, протизапальними та цитопротекторними властивостями (Malik et al., 2013), що сприяє зменшенню ушкоджень кардіоміоцитів за умов ішемії та відновленню їх функціональної активності після інфаркту міокарда (Aljavi et al., 2012). У зв'язку з тим, що біофлавоноїди впливають на структуру та сигнальні шляхи мітохондрій (органел, які постачають більшу частину енергії у клітинах), інтерес багатьох дослідників прикутий до пошуку раціонального та ефективного застосування цих препаратів у лікуванні серцево-судинних захворювань (Testai, 2015). В експериментах із дослідження впливу різних кардіопротекторів на стан серцевого м'яза під час моделювання ішемії або реперфузії у щурів доведено позитивний ефект синергічного використання біофлавоноїду епікатехіну разом із доксицикліном (Ortiz-Vilchis et al., 2014). Як вважають автори цього дослідження, зниження зони інфаркту за умов комплексного застосування зазначених препаратів пов'язане зі швидшим відновленням стану мітохондрій і постачанням енергії у зону ушкодження міокарда.

Останнім часом з'явилися публікації, в яких обговорюється здатність препаратів із кардіопротекторною дією впливати на активність матриксних металопротеїназ – ензимів, що беруть участь у дестабілізації та руйнуванні атеросклеротичної бляшки та процесах ангіогенезу (Rodriguez-Granillo et al., 2011, Deleon-Pennell et al., 2015). Серед трьох десятків відомих нині матриксних металопротеїназ найбільшу увагу в кардіології приділяють ММП2 та ММП9, або желатиназам А та В. Установлено їх патогенетичне та діагностичне значення у розриві покриття нестабільної атеросклеротичної бляшки (Baggen et al., 2016) та процесах постінфарктного ремоделювання лівого шлуночка (Münch et al., 2016). Пошук кардіопротекторних препаратів, в основі лікувальної дії яких лежить регулювальний вплив на активність матрикс-деградувальних ферментів, вважають перспективним напрямом фармакокорекції серцево-судинних захворювань (Lizotte-Waniewski, 2015) і трансплантології (Malik, 2013; Ozcinar, 2014). У деяких статтях показано зниження активності ММП за дії доксицикліну (Oliveira et al., 2016), але його вплив на загальний протеазно-інгібіторний потенціал крові та серцевого м'яза після випадку ішемії

практично не висвітлений. Що стосується корвітину, то дані відносно ролі цього біофлавоноїду у підтриманні рівноваги в системі «протеоліз – антипротеоліз» суперечливі та потребують ретельної перевірки. Визначення балансу між процесами протеолізу та його гальмування за дії інгібіторів в умовах ішемії міокарда може надати корисну інформацію стосовно біохімічних механізмів ушкодження клітин і раціонального застосування кардіопротекторів.

Мета статті – визначити зміни функціонального стану, активності матрикс-деградувальних ферментів та їх інгібіторів в умовах ішемії міокарда у щурів, оцінити вплив на зазначені показники корвітину та доксицикліну.

Матеріал і методи досліджень

Ішемію міокарда моделювали у щурів лінії Вістар за схемою, запропонованою Л.Д. Хідровою (Hidrova, 2010), згідно з якою адреналін (0,2 мг/100 г маси) вводили підшкірно упродовж 10 діб. Середня маса дослідних тварин складала 195 ± 5 г. Щурів поділили на чотири групи: I група – контрольна ($n = 8$, щурам вводили фізіологічний розчин), II – щури з адреналін-індукованою ішемією міокарда (АІМ, $n = 10$), III група після моделювання АІМ отримувала корвітин (К) упродовж 5 діб внутрішньочеревинно за такою схемою: перша доба – 5,2 мг/100 г; друга та третя – по 1,8 мг/100 г ваги тварини. У IV групі щурів застосовували доксициклін (Д) після моделювання АІМ, який вводили перорально у дозі 3,5 мг/кг. Тварин утримували у стандартних умовах віварію ДЗ «Дніпропетровська медична академія» (температура повітря 22 ± 2 °С, коливання світло / темрява – 12 / 12 годин). Упродовж експерименту тварин тричі зважували: на початку експерименту, після набуття АІМ та після закінчення лікування. Наприкінці експерименту оцінювали функціональний стан міокарда за даними електрокардіограми (ЕКГ) у другому стандартному відведенні за допомогою комп'ютерного електрокардіографічного комплексу CardioLab 2000 (ХАІ-Медика, Харків). Виведення тварин з експерименту проводили відповідно до Закону України № 3447-IV від 21.02.2006 р. «Про захист тварин від жорстокого поводження». Як знеболувальний препарат застосовували тіопентал натрію (40 мкг/кг).

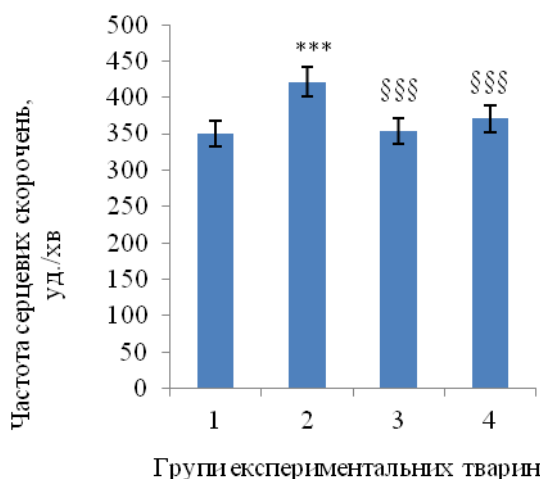
Для біохімічного аналізу використовували плазму та екстракт розчинних білків серцевого м'яза експериментальних тварин, який готували за схемою, описаною раніше (Pagonik et al., 2015). У дослідних зразках визначали активність матриксних металопротеїназ ММП2 та ММП9 методом желатин-зимографії в нашій модифікації, розраховуючи активність проформ і зрілих форм зазначених ензимів відносно кількості білка у досліджуваних зразках, яку визначали методом Бредфорд. Активність трипсиноподібних ензимів (ТПЕ) визначали за розщепленням синтетичного безбарвного субстрату N-бензоїл-DL-аргінин-4-паратітроанілідгідрохлориду з утворенням

п-нітроаніліну жовтого кольору, реєструючи ступінь забарвлення на фотометрі (Human, Німеччина) за довжини хвилі 410 нм. Концентрацію $\alpha 1$ -інгібітора протеїназ ($\alpha 1$ -ІП) та $\alpha 2$ -макроглобуліну ($\alpha 2$ -МГ) визначали за мікроваріантом методу Веремеєнко (Veremeenko et al., 1988).

Дані аналізували за допомогою програм Statistica та Sorbflil TLC. Враховуючи невелику кількість щурів у кожній групі, для статистичної обробки результатів дослідження застосовано непараметричний аналіз, в якому вірогідність різниці оцінювали за критерієм Манна – Уїтні. Відмінності між величинами в контрольній і дослідній групах визнавали достовірними за $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення

За результатами моделювання адреналін-індукованої ішемії міокарда встановлено, що після ін'єкцій препарату упродовж 10 діб у тварин спостерігали пригнічення поведінкових реакцій через погіршення фізичного стану (апатія, млявість, тахікардія, замінення кінцівок після ін'єкцій, дисфункція сечового міхура). Смертність в експеримен-



тальних групах тварин склала 18%. Електрофізіологічні параметри міокарда у тварин перевіряли наприкінці експерименту за допомогою ЕКГ у другому стандартному відведенні. У першій групі щурів показники ЕКГ відповідали значенням, наведеним у літературі (Karkishhenko, 2010): відсутній зубець Q, зубець P – позитивний, зубець S одразу переходив у T, формуючи інтервал S–T. Амплітуда зубця R складала в середньому $0,61 \pm 0,01$ мВ, а зубця T – $0,25 \pm 0,01$ мВ. Частота серцевих скорочень (ЧСС) становила $349,4 \pm 7,8$ удара за хвилину (уд./хв) (рис. а).

За даними ЕКГ, у 60% експериментальних тварин після закінчення ін'єкцій адреналіну зафіксовано набуту ішемію міокарда, про що свідчить елевація сегмента ST відносно ізолінії (рис. б). У другій групі тварин спостерігали підвищення ЧСС на 20% відносно групи контролю, зміни амплітуди зубця R та елевацію сегмента ST відносно ізолінії на $1,90 \pm 0,11$ мм. Зубець S зливається з позитивним зубцем T, розширюється сегмент ST, що говорить про формування зони трансмурального пошкодження м'язових волокон унаслідок гострого порушення коронарного кровоплину.



Рис. Частота серцевих скорочень (а) та електрокардіограми (б) експериментальних тварин:

1 – контрольна група, 2 – щури з адреналін-індукованою ішемією (АІМ), 3 – щури з АІМ після введення корвітіну, 4 – введення доксицикліну після набуття АІМ; *** – вірогідна різниця порівняно з показниками контрольної групи за $P < 0,001$, §§§ – вірогідна різниця відносно групи АІМ за $P < 0,001$

Після лікування у тварин III та IV груп показники ЧСС повернулись до значень контрольної групи (відповідно, 378 ± 13 та 398 ± 18 уд./хв). Отримані результати узгоджуються з даними інших авторів (Hushmatov et al., 2015), згідно з якими антиоксиданти дають двофазний іонотропний ефект на скорочувальну активність папілярного м'яза щурів, зменшуючи частоту тахікардії. Такий ефект може бути пов'язаний з активацією P-адренорецептора, збільшенням цАМФ і Ca^{2+} у кардіоміоцитах. Антиаритмічна дія може бути пов'язана з модуляцією функціональної активності натрієвих і кальцієвих каналів у кардіоміоцитах. Уведення корвітіну впродовж п'яти діб зумовлювала відновлення положення сегмента ST у третій групі, хоча амплітуда зубця R не поверталась до контрольних значень, а інтервал S-T був дещо розширеним. Отже, після застосування корвітіну показники електричної активності серця тварин поліпшились, прямі ознаки ішемії на ЕКГ були відсутні, але зазначені вище супутні зміни ЕКГ свідчать про залишкові наслідки гострого пошкодження міокарда.

У четвертій групі тварин, які приймали доксициклін, також була відсутня елевація сегмента ST, спостерігався розширений інтервал S-T, але амплітуда зубця T була нижчою за контрольні значення. Можливо, це пов'язано із частковою реполяризацією внаслідок залишкової дії адреналіну, тому й не відбувалося повного відновлення функціональної активності кардіоміоцитів. Слід зауважити також, що в нашому дослідженні використано дози доксицикліну, що відповідають його антимікробній дії, а, за даними літератури, саме низькі дози цього препарату здійснюють регульовальну дію на процеси ремоделювання лівого шлуночка після інфаркту міокарда (Cerisano, 2014).

За результатами визначення активності ММП2 та ММП9 встановлено, що за адреналінової ішемії міокарда у плазмі крові щурів достовірно підвищується відносна активність ММП9 та спостерігається тенденція до збільшення проформ ММП9/2, хоча активність ММП2 залишається незмінною. У фракції розчинних білків серцевого м'яза, навпаки, ММП9 не визначалась, а обидві форми ММП2 достовірно збільшувались (табл. 1). Засто-

сування корвітину спричинило зниження активності досліджуваних ММП у плазмі, особливо проММП9, значення якої були навіть нижчими за такі у контрольній групі. У серцевому м'язі зберігалась висока активність

проММП2 та визначено достовірне збільшення активності зрілої форми цього ензиму. Слід зауважити, що в нашому експерименті у розчинній фракції білків серця ММП9 не визначалась у жодній із досліджуваних груп.

Таблиця 1

Активність ММП2/9 (М ± m, ум. од./мг білка) у плазмі крові та фракції розчинних білків серцевого м'язу щурів

Показники	Групи тварин			
	контроль	АІМ	АІМ + К	АІМ + Д
Плазма крові				
проММП9	4,11 ± 0,87	5,60 ± 0,31	3,37 ± 0,06 ^{§§§}	–
ММП9	4,49 ± 0,81	7,41 ± 0,58**	5,81 ± 0,54	–
проММП2	4,81 ± 0,49	6,10 ± 0,79	5,56 ± 1,51	8,31 ± 1,34*
ММП2	4,90 ± 0,41	4,98 ± 0,51	5,10 ± 0,46	5,26 ± 0,35
Екстракт розчинних білків серцевого м'язу				
проММП2	7,81 ± 0,22	13,02 ± 1,17***	13,17 ± 1,09***	8,38 ± 1,05 ^{§§}
ММП2	9,31 ± 0,62	12,90 ± 0,68***	15,79 ± 1,16 ^{§§§§}	11,91 ± 0,76*

Примітки: * – P < 0,05, *** – P < 0,001 вірогідна різниця порівняно з показниками контрольної групи, § – P < 0,05, §§ – P < 0,001 вірогідна різниця відносно групи з адреналіновою ішемією міокарда (АІМ); АІМ + К – застосування корвітину після моделювання АІМ; АІМ + Д – застосування доксицикліну після моделювання АІМ.

Інша реакція спостерігалась за впливу доксицикліну: у плазмі крові ММП9 не визначалась, а рівень активності обох форм ММП2 був підвищений, у той час як у серцевому м'язі активність ММП2 знижувалась порівняно з II групою, а активність проформи цього ензиму зменшувалась практично до нормальних значень (табл. 1). Отримані дані підтверджують гіпотезу про регульовальний вплив досліджуваних препаратів на експресію та активність матриксних металопротеїназ. За літературними даними, доксициклін знижує активність ММП2 і блокує апоптоз клітин, активуючи протеїназу В – продукт генів Akt. Ця кінза інгібує апоптоз, бере участь у регулюванні клітинного циклу, індукує синтез білків і є ключовим білком у регуляції процесів росту тканин і розвитку м'язової дистрофії (Ozcinar, 2014). Як було вказано вище, наслідки дії доксицикліну залежать від дози та тривалості його застосування. У дозі 100–200 мг/добу у

людей він проявляє антимікробну, протизапальну дію, а за нижчих доз інгібує ММП2 (Schulze, 2013; Horwitz, 2014). Вірогідно, протиріччя отриманих нами даних із літературними пов'язане з перевищенням дози цього препарату в наших дослідженнях. Цікаво, що на тлі збільшення ММП2 активність іншої желатинази (ММП9) у групі щурів, які вживали доксициклін, зовсім не визначалась. Отже, за великих доз цей антибіотик інгібує ММП9, а за низьких – ММП2, але для остаточного висновку слід провести додаткові дослідження.

Результати визначення активності трипсиноподібних ензимів і неспецифічних інгібіторів протеолізу наведено у таблиці 2. У плазмі крові щурів з АІМ ці показники не змінюються, за винятком α2-макроглобуліну, кількість якого достовірно знижується у цій групі тварин. У тканині серця, навпаки, кількість цього інгібітора не змінюється, а кількість α1-інгібітора протеїназ була збільшеною удвічі.

Таблиця 2

Активність трипсиноподібних ензимів (ТПЕ), альфа-1-інгібітора протеїназ (ІП1) та альфа-2-макроглобуліну (α2-МГ) в експериментальних тварин (М ± m)

Показники	Групи тварин			
	контроль	АІМ	АІМ + К	АІМ + Д
ТПЕ у плазмі щурів, МЕ/мл	0,455 ± 0,044	0,439 ± 0,067	0,611 ± 0,063*	0,500 ± 0,065
ТПЕ у гомогенаті серця щурів, МЕ/мг білка	0,015 ± 0,005	0,020 ± 0,005	0,024 ± 0,005	0,030 ± 0,008
ІП1 у плазмі щурів, мкмоль/л	339,1 ± 14,7	332,9 ± 15,9	322,1 ± 12,7	326,7 ± 12,3
ІП1 у гомогенаті серця щурів, мкмоль/л/мг білка	9,8 ± 0,7	20,3 ± 1,4***	18,1 ± 2,1***	16,4 ± 2,6***
α2-МГ у плазмі щурів, мкмоль/л	9,4 ± 0,4	7,4 ± 0,2***	–	1,4 ± 0,1***
α2-МГ у гомогенаті серця щурів, мкмоль/л/мг білка	0,207 ± 0,039	0,311 ± 0,029	0,312 ± 0,049	0,287 ± 0,049

Примітки: див. табл. 1.

За умов застосування кардіопротекторів основні зміни стосувались α2-макроглобуліну: його кількість у плазмі крові різко знижувалась за впливу доксицикліну, а за умов застосування корвітину взагалі не визначалась. Отримані дані свідчать, що за адреналінової ішемії міокарда порушується протеазно-інгібіторний потенціал серцевого м'язу, в першу чергу, за рахунок зміни співвідношення основних інгібіторів серинових протеїназ (ІП1 та α2-МГ). Обидва інгібітори відіграють значну роль у підтриманні гемостазу, впливаючи на активність ферментів систем коагуляції та фібринолізу.

Нещодавно з'явилися публікації, в яких доводиться безпосередня участь α2-МГ у розвитку інфаркту міокарда (Vélez et al., 2014) і пропонується включення цього показника в панель біомаркерів ушкоджень серця та перелік фармакологічних мішеней (Yang et al, 2015). Наші результати також свідчать про перспективність визначення протеазно-антипротеазного балансу у плазмі крові хворих на ІХС як додаткового діагностичного комплексу та оцінки ефективності терапевтичних засобів.

Висновки

У хворих з адреналіновою ішемією міокарда порушується протеазно-інгібіторний потенціал крові та серцевого м'язу: якщо у плазмі підвищується активність ММП9, проММП9/2 та рівень α 1-інгібітора протеїназ на тлі незмінної активності ММП2, трипсиноподібних ензимів та зниження рівня α 2-макроглобуліну, то у серцевому м'язі, навпаки, збільшується активність ММП2 та рівень α 1-інгібітору протеїназ.

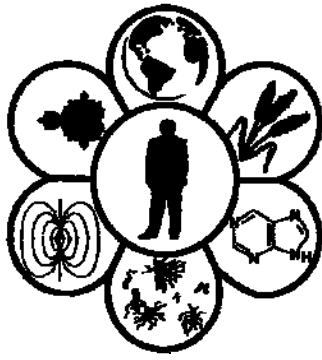
Застосування корвітину сприяє відновленню функціонального стану серця, рівня ММП, але порушує баланс у системі трипсиноподібних ензимів та їх інгібіторів.

За впливу доксицикліну блокується активність ММП9, значно знижується активність ММП2, що свідчить про інгібувальний вплив цього препарату на активність матриксних металопротеїназ.

Бібліографічні посилання

- Aljavi, A.L., Kenzhaev, M.L., Haitov, S.S., Kenzhaev, S.R., 2012. Profilaktika diastolicheskoy disfunkcii levogo zheludochka pri ostrom koronarom syndrome s jelevaciej segmenta ST [Prevention of left ventricular diastolic dysfunction in acute coronary syndrome with ST segment elevation]. *Ukr. Medicnij Chasopis* 88, (in Ukrainian).
- Baggen, V.J., Eindhoven, J.A., van den Bosch, A.E., Witsenburg, M., Cuypers, J.A., Langstraat, J.S., Boersma, E., Roos-Hesselink, J.W., 2016. Matrix metalloproteinases as candidate biomarkers in a adults with congenital heart disease. *Biomarkers* 17, 1–8.
- Cerisano, G., Buonamici, P., Valenti, R., Moschi, G., Taddeucci, E., Giurlani, L., Migliorini, A., Vergara, R., Parodi, G., Sciarra, R., Romito, R., Colonna, P., Antoniucci, D., 2014. Effects of a timely therapy with doxycycline on the left ventricular remodeling according to the pre-procedural TIMI flow grade in patients with ST-elevation acute myocardial infarction. *Basic. Res. Cardiol.* 109(4), 412.
- Deleon-Pennell, K.Y., Altara, R., Yabluchanskiy, A., Modesti, A., Lindsey, M.L. 2015. The circular relationship between matrix metalloproteinase-9 and inflammation following myocardial. *IUBMB Life* 67(8), 611–618.
- Hidirova, L.D., 2010. Izmenenie balansa mezhdru aktivnost'ju perekisnogo okislenija lipidov, antioksidantnoj zashhitoy i sodержaniem zheleza u kryss pri jeksperimental'nom infarkte miokarda [Change in balance between activity of lipid peroxidation, antioxidant system and ferrum content in rats with experimental myocardial infarction]. *Racional'naja Farmakoterapija v Kardiologii* 6(2), 216–219 (in Russian).
- Horwitz, V., Dachir, S., Cohen, M., Gutman, H., Cohen, L., Fishbine, E., Brandeis, R., Turetz, J., Amir, A., Gore, A., Kadar, T., 2014. The beneficial effects of doxycycline, an inhibitor of matrix metalloproteinases, on sulfur mustard-induced ocular pathologies depend on the injury stage. *Curr. Eye. Res.* 39(8), 803–812.
- Hushmatov, S.S., Mahmudov, R.R., Mavljanov, S.M., 2015. Sravnitel'noe izuchenie inotropnoj i antiaritmicheskoy aktivnosti flavonoidov – kvercetina, rutina i (+) – katehina [Comparison of inotropic and antiarrhythmic activity of flavonoids – quercetin, rutin and (+) – catechin]. *Rossijskij Kardiologicheskij Zhurnal* 11, 35–41 (in Russian).
- Karkischenko, N.N., Gracheva, S.V., 2010. Rukovodstvo po laboratornym zhivotnym i al'ternativnym modeljam v biomedicinskih tehnologijah [The guidance for laboratory animals and alternative models in biomedical technology]. *Alternatives of Biomedicine, Moscow* (in Russian).
- Lizotte-Waniewski, M., Brew, K., Hennekens, C.H., 2015. Hypothesis: Metalloproteinase inhibitors decrease risks of cardiovascular disease. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* pii: 1074248415615237.
- Malik, Y.S., Sheikh, M.A., Zhu, X., 2013. Doxycycline can stimulate cytoprotection in neural stem cells with oxygen-glucose deprivation-reoxygenation injury: A potential approach to enhance effectiveness of cell transplantation therapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 432(2), 355–358.
- Münch, J., Avanesov, M., Bannas, P., Säring, D., Krämer, E., Mearini, G., Carrier, L., Suling, A., Lund, G., Patten, M., 2016. Serum matrix metalloproteinases as quantitative biomarkers for myocardial fibrosis and sudden cardiac death risk stratification in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J. Card. Fail.* S1071-9164(16)00101-9.
- Oliveira, H.L., Tedesco, T.K., Rodrigues-Filho, L.E., Soares, F.Z., Rocha, R.O., 2016. Doxycycline as a matrix metalloproteinase inhibitor to prevent bond degradation: The effect of acid and neutral solutions on dentin bond strength. *Gen. Dent.* 64(2), 14–17.
- Ortiz-Vilchis, P., Yamazaki, K.G., Rubio-Gayosso, I., Ramirez-Sanchez, I., Calzada, C., Romero-Perez, D., Ortiz, A., Meaney, E., Taub, P., Villarreal, F., Ceballos, G., 2014. Co-administration of the flavanol (-)-epicatechin with doxycycline synergistically reduces infarct size in a model of ischemia reperfusion injury by inhibition of mitochondrial swelling. *Eur. J. Pharmacol.* 744, 76–82.
- Ozcinar, E., Okatan, E.N., Tuncay, E., Eryilmaz, S., Turan, B., 2014. Improvement of functional recovery of donor heart following cold static storage with doxycycline cardioplegia. *Cardiovasc. Toxicol.* 14(1), 64–73.
- Parhomenko, A.N., Kozhuhov, S.N., 2004. Kardioprotekcija pri ostrom infarkte miokarda: Teoreticheskie predposylki i vozmozhnye puti klinicheskogo reshenija problemy [Cardioprotection in acute myocardial infarction: Theoretical pre-requisites and possible ways of clinical solution of the problem]. *Kardiologija* 2, 6–11 (in Russian).
- Paronik, V.A., Shaul's'ka, O.E., Zhylyuk, V.I., Shevtsova, A.I., 2015. Aktivnist' antyoksydantnykh fermentiv ta zheltynaz za adrenalinovoy ishemijs'kiy miokarda u shchuriv [Activity of antioxidant enzymes and gelatinases in rats with epinephrine-induced myocardial ischemia]. *Medychna ta Klinichna Biokhimiya* 3, 71–75 (in Ukrainian).
- Rodriguez-Granillo, G.A., Rodriguez-Granillo, A., Milei, J., 2011. Effect of doxycycline on atherosclerosis: From bench to bedside. *Recent Pat. Cardiovasc. Drug Discov.* 6(1), 42–54.
- Schulze, C.J., Castro, M.M., Kandasamy, A.D., Cena, J., Bryden, C., Wang, S.H., Koshal, A., Tsuyuki, R.T., Finegan, B.A., Schulz, R., 2013. Doxycycline reduces cardiac matrix metalloproteinase-2 activity but does not ameliorate myocardial dysfunction during reperfusion in coronary artery bypass patients undergoing cardiopulmonary bypass. *Crit. Care Med.* 41(11), 2512–2520.
- Testai, L., 2015. Flavonoids and mitochondrial pharmacology: A new paradigm for cardioprotection. *Life Sci.* 135, 68–76.
- Vélez, P., Parguina, A.F., Ocaranza-Sánchez, R., Grigorian-Shamagian, L., Rosa, I., Alonso-Orgaz, S., dela Cuesta, F., Guitián, E., Moreu, J., Barderas, M.G., González-Juanatey, J.R., García, Á., 2014. Identification of a circulating microvesicle protein network in volvedin ST-elevation myocardial infarction. *Thromb. Haemost.* 112(4), 716–726.
- Veremeenko, K.N., Goloborod'ko, O.P., Kizim, A.I., 1988. Proteoliz v norme i pri patologii. *Zdorovja, Kiev* (in Russian).
- Yang, S., Chen, L., Sun, S., Shah, P., Yang, W., Zhang, B., Zhang, Z., Chan, D.W., Kass, D.A., van Eyk, J.E., Zhang, H., 2015. Glycoproteins identified from heart failure and treatment models. *Proteomics* 15, 567–579.

Надійшла до редколегії 29.01.2016



УДК 582.284.3:577.1

Вплив сульфатів та цитратів металів на вуглеводний склад біомаси лікарського гриба *Trametes versicolor* (Polyporales, Polyporaceae)

Г.А. Аль-Маалі¹, Н.А. Бісько¹, А.М. Остапчук²

¹Інститут ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України, Київ, Україна

²Інститут мікробіології та вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, Київ, Україна

Досліджено вплив цитратів і сульфатів міді, марганцю та цинку на вуглеводний склад біомаси цінного лікарського гриба *Trametes versicolor* (L.) Lloyd., що зростає на рідкому живильному середовищі в умовах глибинної культури. До складу фракції загальних вуглеводів міцелію *T. versicolor* 353, культивованому на контрольному середовищі без досліджених металів, входили глюкоза (91,5%), маноза (5,4%), галактоза (1,9%), ксилоза (0,7%), фукоза (0,6%). Єдиним моносахаридом, на процентну частку якого не впливав жоден із досліджених металів, була галактоза. Цитрат цинку стимулює накопичення глюкози у біомасі *T. versicolor* 353 за рахунок зменшення концентрації манози. Фукоза та ксилоза на середовищі із цитратом цинку не виявлені. У міцелії *T. versicolor* 353, культивованого на середовищі із цитратом або сульфатом марганцю, ідентифіковано рибозу. Цитрат марганцю діє протилежним чином, порівняно з цитратом цинку: стимулює синтез манози та зменшує процентну частку глюкози в міцелії *T. versicolor* 353. Додавання до живильного середовища цитрату міді індукує синтез манітолу, сорбітолу та рибози у *T. versicolor* 353. Наявність поліолів у міцелії *T. versicolor* 353, культивованому на середовищі із цитратом міді, вказує на залежність їх синтезу від присутності у живильному середовищі іонів міді. Результати експерименту свідчать про те, що сульфати цинку, міді та марганцю суттєво не впливають на вуглеводний склад біомаси *T. versicolor* 353, на відміну від цитратів аналогічних металів.

Ключові слова: марганець; мідь; цинк; моносахариди; манітол

The effect of citrate and sulfate of different metals on carbohydrates composition of medicinal mushroom *Trametes versicolor* (Polyporales, Polyporaceae)

G.A. Al-Maali¹, N.A. Bisko¹, A.M. Ostapchuk²

¹Kholodny Institute of Botany of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

²Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

The aim of our research was to study the influence of citrate and sulfate of copper, manganese and zinc on the carbohydrates composition of biomass of the medicinal mushroom *Trametes versicolor* (L.) Lloyd. cultivated in a liquid medium. The studied strain of *Trametes versicolor* 353 was obtained from the Culture Collection of Mushrooms (IBK) from the M. G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine. Citrates of copper, manganese and zinc were obtained from the Institute of Nanobiotechnologies and Resource Conservation of Ukraine, Kyiv. In this study we used glucose-peptone-yeast extract medium (GPY) with the following composition of (g/L): glucose – 25, peptone – 3, yeast extract – 3, K₂HPO₄ – 1, KH₂PO₄ – 1, MgSO₄ · 7H₂O – 0.25, distilled water – 1,000 ml; pH 6,5 (control medium). Cu²⁺ (sulfate form or citrate form) were added to control medium in concentration 4 mg/L, Zn²⁺ and Mn²⁺ (sulfate form or citrate form) were added to control medium in concentration 1 mg/L. Mycelium was grown in a submerged culture on a rotary shaker (120 rpm) at 26 °C in 250 ml Erlenmeyer flasks, containing 50 ml of liquid medium. The biomass was harvested after 9 days of cultivation in the liquid medium. Monosaccharides and sugar alcohols was analyzed by high-performance liquid chromatography Agilent

Інститут ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України, вул. Терещенківська, 2, Київ, 01601, Україна
Kholodny Institute of Botany of NAS of Ukraine, Tereshchenkivska Str., 2, Kyiv, 01601, Ukraine

Інститут мікробіології та вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03680, Україна
Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NAS of Ukraine, Acad. Zabolotny Str., 154, Kyiv, 03680, Ukraine
Tel.: +38-067-497-49-20. E-mail: galeb.almaali@gmail.com

1200 (Agilent technologies, USA). The results of our research demonstrated that the fraction of total carbohydrates from *T. versicolor* 353, which were cultivated on the control medium, consists of glucose (91.5%), galactose (1.9%), mannose (5.4%), fucose (0.6%) and xylose (0.7%). The adding of sulfate of zinc or copper to the liquid medium didn't change the content of monosaccharides of *T. versicolor* 353 biomass relative to the control medium. At the same time, in the medium with citrate of zinc the amount of glucose increased and the amount of mannose decreased relative to the control medium. Xylose and fucose were not detected in this case. In mycelium of *T. versicolor* 353 that was cultivated in the medium with manganese sulfate or manganese citrate we detected a small amount of ribose. But the content of other monosaccharides didn't change in the medium with sulfate of manganese. At the same time, the addition of citrate of manganese to the medium raised the amount of mannose and reduced the amount of glucose in the biomass of *T. versicolor* 353 relative to the control medium. Also copper citrate reduced the content of glucose in mycelium of *T. versicolor* 353 relative to the control medium. But in this case we detected mannitol and sorbitol in the biomass. This data indicates that synthesis of sugar alcohols in *T. versicolor* 353 depend on copper ions in bioactive forms of citrate.

Keywords: manganese; copper; zinc; monosaccharides; mannitol

Вступ

Біологічну активність більшості видів грибів здебільшого визначають сполуки вуглеводної природи, вміст яких у міцелії досягає 60% сухої біомаси грибів (Wasser and Wais, 1999). Вони представлені вільними та зв'язаними моносахаридами, полісахаридами та цукровими спиртами. Ці речовини виконують резервну, осморегуляторну, регуляторну, протекторну та інші функції (Bisko, 2012).

Після виявлення у 1970-х роках онкостатичних властивостей полісахаридних екстрактів із плодкових тіл та міцелію деяких базидієвих грибів почалося активне вивчення цих сполук, а також пошук продуцентів, дослідження процесів стимулювання їх синтезу (Wasser, 2014). Серед найперспективніших продуцентів біологічно активних речовин, у тому числі полісахаридів, треба згадати *Trametes versicolor* (L.) Lloyd. (Hobbs, 2004). Сучасні дослідження демонструють, що гриби роду *Trametes* мають численні лікувальні властивості, серед яких протипухлинні, гепатопротекторні, антибактеріальні та противірусні (Cai et al., 2010; Maehara et al., 2012; Patel, 2012). Ці лікарські властивості пов'язують насамперед із різними фракціями полісахаридів (Standish et al., 2008; Zong et al., 2012; Kuan et al., 2013).

Регулюючи склад живильних середовищ для культивування лікарських базидієвих грибів, можна збільшити вихід як біомаси, так і її окремих компонентів, у тому числі вуглеводної природи (Montoya et al., 2013; Wang et al., 2013; Zhang et al., 2015). Різні автори зазначають, що під час культивування деяких видів лікарських грибів додавання до живильного середовища мікроелементів позитивно впливає на біосинтез екзо- та ендополісахаридів (Zou et al., 2005; Xiao et al., 2006; Zhi-ling, 2009). Відмітимо особливу роль міді у фізіології живлення *T. versicolor*, пов'язану з тим що іони міді входять до активного центру лакази. Крім того, мідь входить до складу низки ферментів електронотранспортного ланцюга та супероксиддесмутази (Banci, 2013; Kroneck and Sosa Torres, 2015). Цинк – один із найбільш значущих мікроелементів у живленні грибів. Він залучений у більшість метаболічних шляхів, включаючи синтез амінокислот, метаболізм РНК і ДНК, а також експресію генів. Цинк – єдиний метал, який зустрічається в усіх класах ферментів (Broadley et al., 2007). Марганець не менш важливий для грибної фізіології. Він абсолютно необхідний для функціонування низки ферментів, включаючи оксидоредуктази, трансферази, гідролази, ліази, ізомерази та лігази (Low et al., 1998). Зазвичай під час культивування грибів використовують неорганічні солі

металів, які мають низьку хімічну чистоту та невисоку біологічно активність порівняно з органічними сполуками металів. Перспективні з цього погляду солі карбонових кислот, у тому числі цитрати металів, дозволені до використання у харчовій промисловості. Проте традиційні методи отримання карбоксилатів трудомісткі та енергозатратні. У попередньому дослідженні ми вивчали вплив різних концентрацій цитратів і сульфатів низки металів (залізо, марганець, мідь та цинк) на ріст міцелію *T. versicolor* 353 на рідкому живильному середовищі (Al-Maali, 2015). Отримані результати свідчать, що цитрати цинку, марганцю та міді ефективніше збільшували продуктивність біомаси *T. versicolor* 353 порівняно із сульфатами відповідних металів.

Це дослідження виконується в рамках комплексного аналізу впливу цитратів різних металів на метаболізм *T. versicolor*. Мета нашої статті – оцінити вплив цитратів і сульфатів міді, марганцю та цинку на моносахаридний склад біомаси лікарського гриба *T. versicolor*.

Матеріал і методи досліджень

Об'єкт дослідження – штам *T. versicolor* 353 з Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України (Buchalo et al., 2011). Штам обрано за результатом скринінгу біотехнологічно цінних штамів *T. versicolor*, проведених Л.О. Антоненко (Antonenko, 2013).

Міцелій вирощували 9 діб у глибинній культурі (120 об./хв) за температури 26 ± 1 °C у колбах Ерленмейєра об'ємом 250 мл, що містили 50 мл живильного середовища такого складу (контрольне середовище, г/л): глюкоза – 25, пептон – 3, дріжджовий екстракт – 3, K_2HPO_4 – 1, KH_2PO_4 – 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,25, дистильована вода – 1 дм³, рН 6,5 (ГПД). Інокулом отримували упродовж п'яти діб за тих самих умов. Інокулом додавали з розрахунку 10% від об'єму живильного середовища. У досліджуваних варіантах до середовища додавали цитрат або сульфат міді (у концентрації 4 мг/л Cu^{2+}), марганцю (1 мг/л Mn^{2+}) або цинку (1 мг/л Zn^{2+}). Концентрації досліджуваних металів, оптимальні для накопичення біомаси цього штаму, визначені у попередньому дослідженні (Al-Maali, 2015).

Цитрати міді, марганцю та цинку отримані методом авквананотехнології в Українському державному науковому дослідному інституті нанобіотехнології і ресурсозбереження при Державному агентстві резерву України (Patent of Ukraine for utility model number 39392). Моносахаридний склад визначали за допомогою високоефективної

рідинної хроматографії з мас-спектрометрією на Agilent 1200 (Agilent Technologies, USA).

Дослідження проводили у трьох повторностях. Дані виражені як середні значення \pm похибка. Статистичний аналіз проводили за допомогою програм OriginPro 8.5.1 (Origin-Lab Corporation, USA). Статистично достовірною порівняно з контролем вважали різницю $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Аналіз вуглеводного складу біомаси *T. versicolor* 353, культивованого на середовищі із солями міді, марганцю та цинку в органічній і неорганічній формі, свідчить про

те, що цитрати та сульфати досліджених металів різною мірою впливають на якісний та кількісний склад моносахаридів і поліолів міцелію (табл.). До складу фракції загальних вуглеводів міцелію *T. versicolor* 353, культивованого на контрольному середовищі, входили такі моносахариди: фукоза, ксилоза, маноза, глюкоза, галактоза (табл.). У разі додавання до живильного середовища сульфату цинку жодних змін у співвідношенні Моносахаридів не виявлено. Присутність цитрату цинку в середовищі суттєво впливала на моносахаридний склад міцелію *T. versicolor* 353. Зафіксовано достовірне зростання процентної частки глюкози, зменшення кількості манози та галактози. Ксилоза та фукоза не були виявлені зовсім (табл.).

Таблиця

Вуглеводний склад міцелію *T. versicolor* 353, культивованого в умовах глибинної культури на ГПД середовищі з додаванням цитратів або сульфатів різних металів

Вуглеводи, % від загальної кількості	Контроль	Сульфат марганцю	Цитрат марганцю	Сульфат цинку	Цитрат цинку	Сульфат міді	Цитрат міді
Рибоза	–	0,53 \pm 0,05 ^{ab}	0,28 \pm 0,04 ^{ab}	–	–	–	0,63 \pm 0,05 ^{ab}
Фукоза	0,56 \pm 0,10	0,58 \pm 0,05	0,74 \pm 0,05 ^a	0,64 \pm 0,05 ^b	–	0,76 \pm 0,06 ^a	0,66 \pm 0,05
Ксилоза	0,66 \pm 0,12	0,66 \pm 0,06	0,68 \pm 0,04	0,67 \pm 0,07 ^b	–	0,86 \pm 0,07 ^a	0,78 \pm 0,07
Маноза	5,39 \pm 0,59	5,94 \pm 0,51	7,59 \pm 0,61 ^{ab}	5,66 \pm 0,59 ^b	2,94 \pm 0,48 ^{ab}	6,02 \pm 0,58	6,18 \pm 0,51
Глюкоза	91,52 \pm 1,21	90,30 \pm 1,04	88,92 \pm 0,97 ^a	91,10 \pm 1,12 ^b	95,65 \pm 0,88 ^{ab}	90,40 \pm 0,99	89,00 \pm 1,00 ^a
Галактоза	1,87 \pm 0,40	1,98 \pm 0,37	1,79 \pm 0,23	1,93 \pm 0,41	1,42 \pm 0,40	1,97 \pm 0,28	1,91 \pm 0,26
Манітол	–	–	–	–	–	–	0,42 \pm 0,03 ^{ab}
Сорбітол	–	–	–	–	–	–	0,41 \pm 0,04 ^{ab}

Примітки: а – достовірна ($P < 0,05$) різниця порівняно з контролем; б – достовірна ($P < 0,05$) різниця порівняно з дослідом із сульфатом/цитратом відповідного металу; «–» – відповідний моносахарид чи поліол не виявлено в міцелії *T. versicolor* 353.

У міцелії *T. versicolor* 353, культивованому на середовищі із цитратом або сульфатом марганцю, крім вищезгаданих моносахаридів, виявлено рибозу. Але її вміст у міцелії *T. versicolor* 353, культивованому на середовищі із сульфатом марганцю, майже удвічі вищий, порівняно з біомасою, отриманою на середовищі із цитратом марганцю. Додавання сульфату марганцю у середовище достовірно не впливало на кількість інших виявлених моносахаридів. За умов культивування *T. versicolor* 353 на середовищі із цитратом марганцю відбувалось зменшення концентрації глюкози та збільшення кількості манози порівняно з контрольним середовищем (табл.).

Сульфат міді, як і сульфат цинку, суттєво не впливав на якісний моносахаридний склад міцелію *T. versicolor* 353. Натомість у міцелії, культивованому на середовищі із цитратом міді, зменшувалась частка глюкози та виявлено рибозу. Крім того, виявлено поліоли манітол і сорбітол, не відмічені ані в контрольному досліді, ані в досліді з іншими цитратами та сульфатами (табл.).

Отримані результати свідчать про те, що в усіх дослідних варіантах домінуючий моносахарид у складі загальних вуглеводів *T. versicolor* 353 – глюкоза. У праці Kazarski et al. (2012) відмічено, що глюкоза – домінуючий компонент полісахаридів *T. versicolor*. Наші дані підтверджують результати аналізу вуглеводного складу інших видів грибів, проведеного В.Г. Бабицькою зі співавторами (Bisko, 2012). У спирторозчинній фракції вільних вуглеводів цитозоллю *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst., *Lentinus edodes* (Berk.) Singer, *Crinipellis schevczenkovi* Buchalo глюкоза складає 61,4%, 70,4% та 54,8% відпо-

відно. У фракції водорозчинних ендополісахаридів міцелію тих самих видів вона складає 73,3–93,6%.

Зазначимо, що жоден із сульфатів досліджених металів не впливає на процентну частку глюкози в міцелії *T. versicolor* 353 (табл.). Цитрати цих металів змінювали її вміст у біомасі, що свідчить про активізацію внутрішньоклітинних енергетичних процесів. Це узгоджується із попередньо отриманими даними, які продемонстрували, що цитрати марганцю, міді та цинку ефективніше стимулюють синтез біомаси *T. versicolor* 353, ніж відповідні сульфати металів (Al-Maali, 2015).

Низка авторів відмічає наявність манози та галактози в різних фракціях вуглеводів деяких цінних лікарських макроміцетів, у тому числі *T. versicolor* (Bisko, 2012; Kazarski et al., 2012). Вміст манози та галактози, за цими даними, може коливатися у широкому інтервалі (від присутності у незначних кількостях до десятків процентів), що збігається з нашими даними (табл.).

Галактоза – єдиний моносахарид, на процентну частку якого в міцелії *T. versicolor* 353 не впливає жоден досліджений цитрат або сульфат. Цитрат марганцю збільшував вміст манози на 40%, а цитрат цинку зменшував кількість цього моносахариду майже удвічі. Гриби синтезують *de novo* манозу із глюкози (рис. 1) (Valentine and Bainbridge, 1978). Зменшення синтезу манози та збільшення концентрації глюкози в міцелії *T. versicolor* 353 за дії цитрату цинку можна пояснити впливом останнього на активність ферментів, залучених до шляху біосинтезу манози (рис. 1).

Ці дані узгоджуються також із тим, що у біомасі *T. versicolor* 353, культивованого на середовищі із цитра-

том цинку, не виявлено фукози, біосинтез якої пов'язаний із манозою (рис. 2) (Ren et al., 2010). Таким чином, цитрат цинку пригнічує синтез манози із глюкози, що зумовлює накопичення останньої та зниження концентрації як манози, так і фукози. Одночасно спостерігаємо протилежну картину у дослідях із цитратом марганцю: зменшення концентрації глюкози викликає накопичення манози та незначне збільшення концентрації фукози порівняно з контролем (табл.). Підкреслимо, що сульфат цинку та сульфат марганцю не викликали аналогічних змін, що свідчить про різну біологічну активність цитратної та сульфатної форми цих металів.

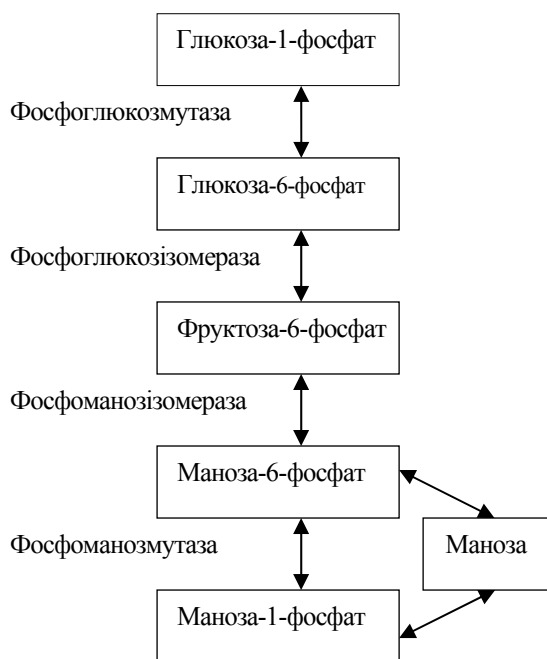


Рис. 1. Шлях біосинтезу манози у грибів (за Valentine and Bainbridge, 1978)

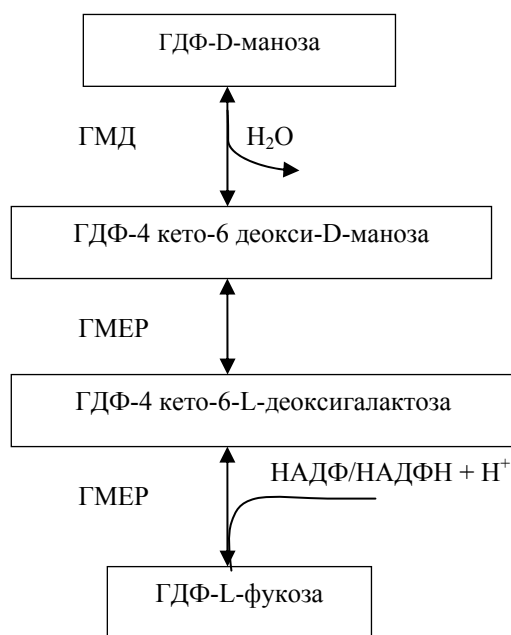


Рис. 2. Шлях біосинтезу фукози у грибів: ГМД – ГДФ-D-маноза 4,6-дегідротаза, ГМЕР – ГДФ-кетто-6-деоксиманоза 3,5-епімераза/4-редуктаза (за Ren et al., 2010)

Накопичення глюкози в міцелії *T. versicolor* 353, культивованому на середовищі із цитратом міді, корелює з появою цукрових спиртів манітолу та сорбітолу. За літературними даними, біосинтез манітолу у грибів відбувається у процесі відновлення фруктозо-6-фосфату (Song and Vieille, 2009). У свою чергу, фруктозо-6-фосфат утворюється із глюкози у процесі гліколізу шляхом Ембдена – Майєргофа – Парнаса (Kamzolkina and Dunaevskaya, 2015). У працях Lee et al. (2007) показано, що додавання до живильного середовища для культивування *Candida magnoliae* (Lodder and Kreger) S.A. Mey. and Yarrow іонів Cu^{2+} підвищує активність манітолдегідрогенази, яка бере участь у процесі синтезу манітолу. Гриби використовують манітол як осморегуляторний компонент в умовах абіотичного стресу (Jannings, 1984, Stoop et al., 1996), а також як енергетичне та вуглецеве депо (Smiley et al., 1967; Pharr et al., 1995). Це пов'язано з тим, що в умовах окиснення манітолу утворюється НАДФН, яка напряду конвертується в АТФ. Таким чином, манітол – ефективний ресурс для дихання, його метаболізм дозволяє ефективно регулювати внутрішньоклітинний баланс НАДФ/НАДФН (Stoop and Mooibroek, 1998). У попередньому дослідженні ми виявили, що цитрат міді стимулював приріст біомаси *T. versicolor* 353 на 70% порівняно з контролем, і це – найвищий показник стимулювання росту серед досліджених цитратів і сульфатів металів (Al-Maali, 2015). За умов додавання до живильного середовища сульфату міді біомаса збільшувалась тільки на 49%, і не відбувалось накопичення цукрових спиртів, що свідчить про іншу біологічну активність та вищу біодоступність цитрату міді порівняно із сульфатною формою.

Висновки

Уперше оцінено вплив цитратів і сульфатів марганцю, міді та цинку на моносахаридний склад міцелію *T. versicolor* 353. Показано, що цитрат цинку, на відміну від сульфату, стимулює накопичення глюкози у біомасі *T. versicolor* 353 за рахунок зменшення концентрації манози, фукози та ксилози. Цитрат марганцю, порівняно із сульфатом марганцю, стимулює синтез манози та зменшує частку глюкози в міцелії *T. versicolor* 353. Додавання до живильного середовища цитрату міді індукує синтез манітолу у *T. versicolor* 353. Уперше доведено, що вплив цитратів марганцю, цинку та міді на вуглеводний склад міцелію *T. versicolor* 353 суттєво відрізняється від впливу сульфатів відповідних металів.

Подяка

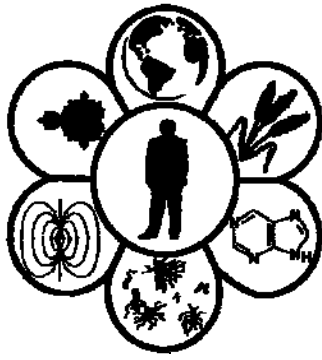
Ми дякуємо д-ру біол. наук професору В.Г. Каплуненку з Українського державного науково-дослідного інституту нанобіотехнологій і ресурсозбереження при Державному агентстві резерву України за надання цитратів міді, використаних у цьому дослідженні.

Бібліографічні посилання

Al-Maali, G.A., 2015. The influence of metal citrates obtained by aquanotechnology on growth of the strains of medical

- macromycetes *Ganoderma lucidum* 1900 and *Trametes versicolor* 353. Ukr. Bot. J. 72(4), 393–397.
- Antonenko, L.A., 2013. Biotehnolohiia otrymmannia biomasy vyshchykh bazydialnykh hrybiv rodu *Coriolus* [Biotechnology of biomass higher basidiomycetes of the genus *Coriolus*]. NUHT, Kyiv (in Ukrainian).
- Banci, L., 2013. Metallomics and the cell. Springer, Dordrecht.
- Bisko, N.A., Babickaya, V.G., Buchalo, A.S., Krupoderova, T.A., Lomberg, M.L., Mikhajlova, O.B., Puchkova, N.A., Solomko, E.F., Shcherba, V.V., 2012. Biologicheskie svoystva lekarstvennykh makromicetov v kul'ture [Biological properties of the medicinal macromycetes in the culture]. Laposhshenko LTD, Kyiv (in Russian).
- Broadley, M.R., White, P.J., Hammond, J.P., Zelko, I., Lux, A., 2007. Zinc in plants. New Phytol. 173(4), 677–702.
- Buchalo, A.S., Mytropolska, N.Y., Mykchaylova, O.B., 2011. Catalogue of the culture collection of mushrooms IBK. Al-terpress, Kiev.
- Cai, X., Pi, Y., Zhou, X., Tian, L., Qiao, S., Lin, J., 2010. Hepatoma cell growth inhibition by inducing apoptosis with polysaccharide isolated from Turkey tail medicinal mushroom, *Trametes versicolor* (L.: Fr.) Lloyd (Aphyllphoromycetidae). Int. J. Med. Mushr. 12(3), 257–263.
- Hobbs, C., 2004. Medicinal value of Turkey tail fungus *Trametes versicolor* (L.:Fr.) Pilát (Aphyllphoromycetidae). Int. J. Med. Mushr. 6(3), 195–218.
- Jannings, D.H., 1984. Polyol metabolism in fungi. Adv. Microbiol. Physiol. 25, 149–193.
- Kamzolkina, O.V., Dunaevskaya, J.A., 2015. Fungal cell biology [Biologiya gribnoj kletki]. KMK, Moscow (in Russian).
- Kozarski, M., Klaus, A., Nikšić, M., Vrvić, M.M., Todorović, N., Jakovljević, D., Van Griensven, L.J., 2012. Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. J. Food Compos. Anal. 26(1), 144–153.
- Kroneck, P.M.H., Sosa Torres, M.E. (eds.), 2015. Sustaining life on planet Earth: Metalloenzymes mastering dioxygen and other chewy gases. Springer International Publishing, Switzerland.
- Kuan, Y.C., Wu, Y.J., Hung, C.L., Sheu, F., 2013. *Trametes versicolor* protein YZP activates regulatory B lymphocytes – gene identification through de novo assembly and function analysis in a murine acute colitis model. PloS One, 8(9), e72422.
- Law, N., Caudle, M., Pecoraro, V., 1998. Manganese redox enzymes and model systems: Properties, structures, and reactivity. Adv. Inorg. Chem. 46, 305–440.
- Lee, J.K., Oh, D.K., Song, H.Y., Kim, I.W., 2007. Ca²⁺ and Cu²⁺ supplementation increases mannitol production by *Candida magnoliae*. Biotechnol. Lett. 19, 291–294.
- Maehara, Y., Tsujitani, S., Saeki, H., Oki, E., Yoshinaga, K., Emi, Y., Baba, H., 2012. Biological mechanism and clinical effect of protein-bound polysaccharide K (Krestin®): Review of development and future perspectives. Surgery Today 42(1), 8–28.
- Montoya, S., Sanchez, O.J., Levin, L., 2013. Polysaccharide production by submerged and solid-state cultures from several medicinal higher Basidiomycetes. Int. J. Med. Mushr. 15(1), 71–79.
- Patel, S., Goyal, A., 2012. Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: A review. 3 Biotech. 2(1), 1–15.
- Pharr, D.M., Stoop, J.M.H., Williamson, J.D., Feusi, M.E.S., Massel, M.O., Conkling, M.A., 1995. The dual role of mannitol as osmoprotectant and photoassimilate in celery. Hort Sci. 30, 1182–1188.
- Ren, Y., Perepelov, A.V., Wang, H., Zhang, H., Knirel, Y.A., Wang, L., Chen, W., 2010. Biochemical characterization of GDP-L-fucose *de novo* synthesis pathway in fungus *Mortierella alpina*. Biochem. Bioph. Res. Co. 391(4), 1663–1669.
- Smilley, K.L., Cadmus, M.C., Liepins, P., 1967. Biosynthesis of D-mannitol from D-glucose by *Aspergillus candidus*. Biotechnol. Bioeng. 9, 365–374.
- Song, H.S., Vieille, C., 2009. Recent advances in the biological production of mannitol. Appl. Microbiol. Biotechnol. 84, 55–62.
- Standish, L.J., Wenner, C.A., Sweet, E.S., Bridge, C., Nelson, A., Martzen, M., Torkelson, C., 2008. *Trametes versicolor* mushroom immune therapy in breast cancer. J. Soc. Integr. Oncol. 6(3), 122–128.
- Stoop, J.M., Mooibroek, H., 1998. Cloning and characterization of NADH-mannitol dehydrogenase cDNA from the button mushroom, *Agaricus bisporus*, and his expression in response to NaCl stress. Appl. Environ. Microbiol. 64, 4689–4696.
- Stoop, J.M.H., Williamson, J.D., Pharr, D.M., 1996. Mannitol metabolism in plants: Method for coping with stress. Trends Plant Sci. 1, 139–144.
- Valentine, B.P., Bainbridge, B.W., 1978. The relevance of a study of a temperature-sensitive ballooning mutant of *Aspergillus nidulans* defective in mannose metabolism to our understanding of mannose as a wall component and carbon/energy source. Microbiology 109(1), 155–168.
- Wang, F., Zhang, J., Hao, L., Jia, S., Ba, J., Niu, S., 2012. Optimization of submerged culture conditions for mycelial growth and extracellular polysaccharide production by *Coriolus versicolor*. J. Bioprocess Biotech. 2(4), 124–129.
- Wasser, S.P., 2014. Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges. Biomed. J. 37(6), 345–356.
- Wasser, S.P., Weis, A.L., 1999. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: A modern perspective. Crit. Rev. Immunol. 19(1), 65–96.
- Xiao, J.H., Chen, D.X., Wan, W.H., Hu, X.J., Qi, Y., Liang, Z.Q., 2006. Enhanced simultaneous production of mycelia and intracellular polysaccharide in submerged cultivation of *Cordyceps jiangxiensis* using desirability functions. Process Biochem. 41(8), 1887–1893.
- Zhang, H., Li, Q., He, P., Xu, C., 2015. Effect of carbon source on properties and antioxidant potential of exopolysaccharides produced by *Trametes robiniophila* (Higher Basidiomycetes). Int. J. Med. Mushrooms 17(2), 179–186.
- Zhi-ling, C., 2009. Effect of some trace elements and vitamins on contents of polysaccharide and acid of *Ganoderma lucidum*. Journal of Anhui Agricultural Sciences 5, 078.
- Zong, A., Cao, H., Wang, F., 2012. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. Carbohydr. Polym. 90(4), 1395–1410.
- Zou, X., 2005. Effects of Zn supplementation on the growth, amino acid composition, polysaccharide yields and anti-tumour activity of *Agaricus brasiliensis*. World J. Microb. Biot. 21(3), 261–264.

Надійшла до редколегії 09.03.2016



УДК 611.813.8(083.75):613/956

Морфологічні паралелі зв'язків між структурами циркумвентрикулярної системи в осіб юнацького віку

Т.С. Комшук

Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет», Чернівці, Україна

На прикладі морфометричного дослідження магнітно-резонансних томограм осіб різного віку дано комплексну прижиттєву характеристику лікворної системи головного мозку осіб юнацького віку. Вивчено гендерні особливості та міжпівкульну асиметрію проаналізованих показників. Обстеження проводили у стандартних анатомічних площинах (сагітальній, фронтальній та аксіальній). Вимірювання проводили у людей без візуальних ознак органічних уражень головного мозку та черепа. Проаналізовано 11 томограм (юнаки віком 17–21 рік – 6 осіб, дівчата 16–20 років – 5 осіб). Порівнюючи парні показники (бічних шлуночків), вираховували коефіцієнт асиметрії ($K_{асм}$), який дорівнює різниці між показниками правого та лівого бічних шлуночків, поділений на суму показників правого та лівого шлуночків (%). У даній віковій групі виявлене вірогідне збільшення таких показників у юнаків: довжини переднього рога бічного шлуночка справа, довжини тіла бічного шлуночка з обох боків та висоти III шлуночка. У дівчат вірогідно збільшувалися такі показники: ширина переднього рога бічного шлуночка справа та ширина заднього рога бічного шлуночка зліва. Отже, в осіб юнацького віку чоловічої статі прослідковується певний паралелізм у формуванні різних структур шлуночкової системи. Оскільки це єдина система, зберігаються морфологічні та функціональні зв'язки між різними компонентами. Кількість сильних кореляційних зв'язків у юнаків та дівчат у досліджуваній когорті майже однакова, проте в юнаків спостерігали більшу кількість зв'язків. У юнаків порівняно з дівчатами передньо-задній розмір бічного шлуночка справа та зліва має достовірно сильний прямий кореляційний зв'язок із довжиною заднього та нижнього рогів бічних шлуночків і довжиною бічного шлуночка. У дівчат, навпаки, передньо-задній розмір справа зворотно корелює з довжиною тіла бічного шлуночка та довжиною нижнього рога обох боків. Це може бути відображенням виражених стресових чинників, що мають місце у процесі морфогенезу мозку осіб чоловічої статі, порівняно з аналогічними чинниками, що діють на морфогенез мозку жінок. Наявність великої кількості сильних кореляційних зв'язків у системі свідчить про сильне напруження в ній. Чим більше кореляцій – тим ближче система до руйнування. Відомо, що жіночий організм на ранніх етапах розвитку виявляється стійкішим, ніж чоловічий. Про це свідчить досвід роботи неонатологічної служби, підвищена смертність хлопчиків першого року життя порівняно з дівчатками, а також низка інших показників. Математичний аналіз величин структур шлуночкової системи в осіб жіночої статі характеризує гормональний вплив на становлення цієї системи в осіб юнацького віку.

Ключові слова: юнаки; дівчата; кореляційні зв'язки; лікворна система головного мозку

Morphological parallels of communications between the circumventricular system in adolescents

T.S. Komshuk

Higher State Educational Establishment of Ukraine «Bukovinian State Medical University», Chernivtsi, Ukraine

This article presents, based on the example of morphometric study of magnetic resonance tomograms of persons of various ages, the complex of vital characteristics of the cerebrospinal system of the brain in adolescents. The study tested gender characteristics and inter hemispheric asymmetry of the analyzed indexes. An asymmetry of anatomical structures of the right and left hemispheres with the tendency to increase in their sizes in the right hemisphere was found both for males and for females. Females had some age differences in the longitudinal dimension of the III ventricle (this index was lower in older females), the width and index of the IV ventricle was significantly lower in the 18 and 20 year old girls. Objective and methods. The research was conducted on the base of the radiation diagnosis department of Rivne Regional Clinical Hospital on the CT scan General Electric Healthcare Signa MRI 1.5 T and in the office of magnetic resonance

imaging of Lutsk City Clinical Hospital on the CT scan Signa Profile Ce Medical System – 1,5 Tl in standard anatomic planes (sagittal, frontal and axial). Measurements were carried out in persons without visual signs of organic lesions of the brain and skull. Analysis was made of 11 tomograms (males 17–21 years old – 6 persons, females 16–20 years old – 5 persons). In comparing pairs of parameters (of lateral ventricles) the factor of asymmetry was calculated, which is equal to the difference between the right and left lateral ventricles divided by the sum of right and left ventricles indexes (%). The results were processed by methods of descriptive statistics. In young males of this age group a significant increase in the following indicators was identified: the length of the anterior horn of the lateral ventricle on the right side, the length of the body of the lateral ventricle on both sides and the height of the III ventricle. Females had significant increases in the following parameters: the width of the anterior horn of the lateral ventricle on the right side and the width of the posterior horn of the lateral ventricle on the left side. Consequently, in male adolescents a parallelism in the formation of various structures of the ventricular system was traced. Since this is a single system, morphological and functional connections between its different components are stored. Mathematical analysis of the values of the structures of ventricular system in females characterizes a hormonal influence on its development in adolescents. We can assume that organs which are the part of the circumventricular system (subcommissural organ, subfornical organ, median rise etc.), definitely have the character of anatomical connections between these components. Their functional unity in maintaining the homeostasis of the body is undeniable.

Keywords: boys; girls; asymmetry; correlation; liquor system of the brain

Вступ

Магнітно-резонансна томографія (МРТ) характеризується високою інформативністю у дослідженні органів із високим тканинним вмістом води. За допомогою МРТ вдається отримати уявлення практично про всі відділи головного мозку. Завдяки високій інтенсивності сигналу, що ініціюється спинномозковою рідиною, забезпечується чітке зображення шлуночкової системи головного мозку (Sánchez, 2014; Horsburgh, 2012).

Якщо враховувати органоспецифічні особливості головного мозку та пов'язану з ними складність візуалізації лікворної системи, високий рівень природженої та набутої патології центральної нервової системи, стає зрозумілим актуальність і пріоритетність дослідження структурно-функціональної організації циркумвентрикулярної системи в онтогенезі людини (Baev, 2000; Trofimova, 2005; Shemjakov, 2006).

Розвиток неврології та нейрохірургії дитячого віку неможливий без вивчення статево-вікових закономірностей будови та синтопії шлуночків головного та кінцевого шлуночка спинного мозку впродовж онтогенезу людини. Незважаючи на велике функціональне значення циркумвентрикулярної системи людини, вона не стала об'єктом усебічних морфологічних досліджень. У літературі трапляються фрагментарні дані щодо розвитку та становлення топографії бічних, III, IV шлуночків головного та кінцевого шлуночка спинного мозку в ембріонів і плодів людини (Johanson, 2011; Kurtcuoglu, 2005). Наявні відомості не дають повного уявлення про динаміку становлення топографо-анатомічних взаємовідношень шлуночків головного та кінцевого шлуночка спинного мозку впродовж пре- та постнатального періодів онтогенезу людини. Морфологічні аспекти становлення структур циркумвентрикулярної системи в онтогенезі людини вивчені недостатньо або не досліджені зовсім, а деякі з них залишаються дискусійними (Buckner, 2009; Alonso, 2011; Scholz, 2010).

Розміри окремих структур головного мозку та його шлуночків мають суттєві індивідуально-типологічні відмінності у представників різних соматотипів і краніотипів. Як у юнаків, так і в дівчат виявлено асиметрію анатомічних структур правої та лівої півкуль із тенденцією до збільшення їх розмірів у правій півкулі. У дівчат установлено певні вікові відмінності поздовжнього розміру III шлуночка (даний показник виявився меншим у старших дівчат), ширина та індекс IV шлуночка вірогідно

менші у 18- та 20-річних дівчат). Статевих відмінностей параметрів III шлуночка не визначено, ширина та індекс IV шлуночка мають достовірно більші значення в юнаків порівняно з дівчатами (Shevchuk, 2010; Shehtman, 2014). Даними дослідженнями визначені прижиттєві морфометричні показники шлуночків головного мозку, виявлені морфометричні критерії індивідуальної (гендерної та міжпівкульної) анатомічної мінливості шлуночкової системи мозку. Відповідно до рекомендацій VII Всесоюзної наукової конференції з питань вікової морфології, фізіології та біохімії АМН СРСР (1965) А.А. Маркосян рекомендував поділяти юнацький вік для юнаків 17–21 та дівчат 16–20 років (Torsten et al., 2013).

Мета цього дослідження – вивчити анатомічну мінливість і гендерні відмінності бічних шлуночків головного мозку юнаків та дівчат, а також проаналізувати кореляційні зв'язки між різними структурами лікворної системи.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження виконане відповідно до основного плану НДР Буковинського державного медичного університету як фрагмент комплексної міжкафедральної теми «Закономірності перинатальної анатомії та ембріотопографії. Визначення статево-вікових особливостей будови і топографо-анатомічних взаємовідношень органів та структур в онтогенезі людини» (номер державної реєстрації – 0110U003078). Обстеження проводили у відділенні променевої діагностики КЗ «Рівненська обласна клінічна лікарня» на комп'ютерному томографі General Electric Healthcare Signa MRI 1.5 T та у кабінеті магнітно-резонансної томографії КЗ «Луцька міська клінічна лікарня» на комп'ютерному томографі Signa Profile Ce Medical Sistem – 1,5 Tл у стандартних анатомічних площинах (сагітальній, фронтальній і аксіальній). Вимірювання проводили у людей без візуальних ознак органічних уражень головного мозку та черепа. Проаналізовано 11 томограм (юнаки – 6, дівчата – 5 осіб). Порівнюючи парні показники (бічних шлуночків) вираховували коефіцієнт асиметрії ($K_{асм}$), який дорівнює різниці між показниками правої та лівої бічних шлуночків, поділений на суму показників правої та лівої шлуночків (%).

Обраховували середню арифметичну та середньоквадратичне відхилення. Проводили визначення коефіцієнта кореляції Спірмена між різними морфометричними

показниками лікворної системи у представників обох статей юнацького віку. Для визначення статистичної значимості коефіцієнта рангової кореляції застосовували таблицю стандартних коефіцієнтів кореляції (за Л.С. Камінським) за кількості ступенів свободи ($n - 2$). Коефіцієнт рангової кореляції вважали достовірним за $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Боковий шлуночок складається з переднього рога, тіла, заднього та нижнього рогів. Спочатку вивчали морфометричні показники переднього рога бічного шлуночка: його довжину та ширину. В юнаків довжина переднього рога бічного шлуночка справа становила $26,5 \pm 1,3$, а зліва – $26,0 \pm 1,5$ мм ($K_{асм} = 1,0$), у дівчат – $23,5 \pm 0,9$ та $21,2 \pm 2,0$ мм ($K_{асм} = 5,2$) відповідно. Видно тенденцію до збільшення довжини переднього рога бічного шлуночка справа як у юнаків, так і в дівчат. Порівнюючи довжину переднього рога бічного шлуночка між статями, спостерігали достовірне збільшення показника справа та зліва в юнаків порівняно з особами протилежної статі. Ширина переднього рога бічного шлуночка в юнаків становила справа $5,9 \pm 0,6$, а зліва – $5,3 \pm 0,5$ мм, у дівчат – $6,0 \pm 0,5$ та $6,3 \pm 0,5$ мм відповідно. Міжпівкульна асиметрія даного показника спостерігалася в юнаків зі збільшенням ширини переднього рога справа ($K_{асм} = 5,4$), у дівчат – із збільшенням даного показника зліва ($K_{асм} = -2,4$). Порівнюючи ширину переднього рога бічного шлуночка між статями, спостерігали збільшення даного показника як справа, так і зліва у дівчат. Довжина тіла бічного шлуночка в юнаків становила справа $46,0 \pm 3,0$, а зліва – $44,9 \pm 3,0$ мм, у дівчат $37,2 \pm 3,0$ та $38,3 \pm 3,3$ мм відповідно. Спостерігали міжпівкульну асиметрію даного показника зі збільшенням його в юнаків справа ($K_{асм} = 1,5$), а у дівчат – зліва ($K_{асм} = 1,5$). Оцінювання гендерних відмінностей показало: довжина тіла бічного шлуночка як справа, так і зліва була більшою в юнаків. Довжина заднього рога бічного шлуночка в юнаків становила справа $37,3 \pm 4,6$, а зліва – $36,0 \pm 3,8$ мм, у дівчат справа – $36,6 \pm 3,3$, зліва – $34,8 \pm 3,5$ мм. Міжпівкульна

асиметрія даного показника спостерігалася у обох статей зі збільшенням справа на 3,5% в юнаків ($K_{асм} = 1,9$) та 4,9% у дівчат ($K_{асм} = 2,5$). Порівняння довжини заднього рога бічного шлуночка між статями довело збільшення показника в юнаків як справа, так і зліва. Також вивчено ширину заднього рога бічного шлуночка, яка становила справа в юнаків $8,4 \pm 1,1$, а зліва – $7,6 \pm 0,1$ мм, у дівчат справа $9,0 \pm 0,9$, зліва – $9,2 \pm 0,6$ мм. Міжпівкульна асиметрія даного показника спостерігалася справа в юнаків на 9,5% ($K_{асм} = 5,0$). Порівняння показника між статями показало збільшення його у дівчат з обох боків. Довжина нижнього рога бічного шлуночка в юнаків справа становила $38,0 \pm 3,8$, а зліва – $37,1 \pm 2,9$ мм, у дівчат справа $36,6 \pm 3,3$, зліва – $34,8 \pm 3,5$ мм. Міжпівкульна асиметрія траплялася в обох статей справа із збільшенням даного показника на 2,4% в юнаків ($K_{асм} = 1,2$) та 6,2% у дівчат ($K_{асм} = 1,0$). Порівняння показника між статями виявило збільшення його в юнаків як справа, так і зліва на 3,7% та 6,2% відповідно. Передньо-задній розмір бічного шлуночка становив в юнаків справа $89,7 \pm 8,8$, зліва – $86,6 \pm 6,7$ мм, у дівчат справа – $86,2 \pm 4,1$, зліва – $84,9 \pm 3,7$ мм. Даний показник був більшим справа як в юнаків, так і у дівчат на 3,5% ($K_{асм} = 1,8$) та 1,5% відповідно ($K_{асм} = 0,8$). Показник був більшим в юнаків як справа, так і зліва на 3,9% та 2,0% відповідно. Проаналізовано довжину та висоту III шлуночка, яка становила в юнаків $28,0 \pm 3,0$ та $27,4 \pm 2,6$ мм справа та зліва відповідно, а в дівчат $24,9 \pm 1,9$ та $19,8 \pm 1,7$ мм відповідно. Порівняння показника між статями виявило вірогідне збільшення висоти III шлуночка в юнаків на 27,7%.

Довжина водопроводу в юнаків становила $17,8 \pm 1,5$, а в дівчат – $16,7 \pm 4,0$ мм, що на 6,2% менше.

Проаналізовано довжину та висоту IV шлуночка, яка становила в юнаків $40,1 \pm 4,1$ та $11,1 \pm 0,6$ мм відповідно, а в дівчат $44,0 \pm 2,1$ та $11,5 \pm 1,8$ мм відповідно. Порівняння показника між статями виявило вірогідне переважання довжини IV шлуночка в дівчат на 8,9%.

Проведено аналіз корелятивних зв'язків між структурами циркувентрикулярної системи юнаків. В осіб чоловічої статі присутні як прямі, так і зворотні корелятивні зв'язки між різними структурами лікворної системи (табл. 1).

Таблиця 1

Кореляційні зв'язки між структурами циркувентрикулярної системи, розташованими справа, в юнаків ($n = 6$)

Характеристика	Ширина переднього рога	Довжина тіла бічного шлуночка	Ширина тіла бічного шлуночка	Довжина заднього рога	Ширина заднього рога	Довжина нижнього рога	Передньо-задній розмір бічного шлуночка
Довжина переднього рога	0,62*	-0,45	0,00	-0,47	0,29	0,00	-0,42
Ширина переднього рога	-	-0,90*	0,00	-0,85*	0,00	-0,51	0,80**
Довжина тіла бічного шлуночка	-	-	0,00	-0,94**	0,00	0,66*	0,91**
Ширина тіла бічного шлуночка	-	-	-	-0,25	-0,75**	-0,59	0,33
Довжина заднього рога	-	-	-	-	0,35	0,85**	0,99**
Ширина заднього рога	-	-	-	-	-	0,77*	0,43
Довжина нижнього рога	-	-	-	-	-	-	0,90**

Примітки: * – достовірність коефіцієнта рангової кореляції $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$.

Сильний прямий достовірний кореляційний зв'язок спостерігали справа між передньо-заднім розміром бічного шлуночка і такими показниками: шириною пе-

реднього рога, довжиною тіла бічного шлуночка, довжиною заднього та нижнього рогів бічного шлуночка, а також між довжиною нижнього рога та довжиною та

шириною заднього рога. Зворотний сильний кореляційний зв'язок виявлено між шириною переднього рога бічного шлуночка та довжиною тіла, довжиною заднього рога; між довжиною тіла та довжиною заднього рога бічного шлуночка; між шириною тіла та шириною заднього рога бічного шлуночка. Зліва кореляційні зв'язки дещо відрізнялися (табл. 2). Сильна пряма кореляційна залежність спостерігалася між довжиною переднього рога та шириною переднього та заднього рогів бічного шлуночка; між шириною переднього та шириною заднього рога бічного шлуночка, довжиною тіла та довжиною зад-

нього рога та передньо-заднім розміром бічного шлуночка; передньо-заднім розміром і довжиною заднього та нижнього рогів бічного шлуночка. Сильна зворотна кореляційна залежність виявлена між шириною тіла та довжиною заднього рога бічного шлуночка.

Структури, розташовані центрально, у більшості випадків мали пряму кореляційну залежність (табл. 3): сильний прямий кореляційний зв'язок спостерігався між довжиною III шлуночка, довжиною тіла та нижнього рога бічного шлуночка, передньо-заднім розміром бічного шлуночка.

Таблиця 2

Кореляційні зв'язки між окремими структурами бічних шлуночків у юнаків зліва (n = 6)

Характеристика	Ширина переднього рога	Довжина тіла бічного шлуночка	Ширина тіла бічного шлуночка	Довжина заднього рога	Ширина заднього рога	Довжина нижнього рога	Передньо-задній розмір бічного шлуночка
Довжина переднього рога	0,81**	-0,61*	-0,21	-0,17	0,94**	-0,43	-0,42
Ширина переднього рога	-	-0,68*	0,24	-0,37	0,74**	-0,36	-0,46
Довжина тіла бічного шлуночка	-	-	-0,53	0,88**	-0,42	0,66	0,81**
Ширина тіла бічного шлуночка	-	-	-	-0,81**	-0,38	-0,37	-0,55
Довжина заднього рога	-	-	-	-	0,00	0,63*	0,81**
Ширина заднього рога	-	-	-	-	-	-0,12	-0,12
Довжина нижнього рога	-	-	-	-	-	-	0,96**

Примітки: див. табл. 1.

Таблиця 3

Кореляційні зв'язки між структурами, розташованими центрально, циркумвентрикулярної системи в юнаків (n = 6)

Характеристика	Довжина III шлуночка	Ширина III шлуночка	Довжина водопроводу	Довжина IV шлуночка	Ширина IV шлуночка
Довжина переднього рога	0,00	-0,14	-0,18	0,00	-0,11
Ширина переднього рога	-0,66*	-0,54	-0,72**	-0,64*	-0,83**
Довжина тіла бічного шлуночка	0,84**	0,54	-0,87**	0,81**	0,86**
Ширина тіла бічного шлуночка	-0,18	0,57	-0,32	0,00	0,00
Довжина заднього рога	0,84**	0,25	0,95**	0,74**	0,84**
Ширина заднього рога	0,34	-0,65*	0,50	0,15	0,28
Довжина нижнього рога	0,82**	0,00	0,93**	0,67*	0,75**
Передньо-задній розмір бічного шлуночка	0,86**	0,21	0,97**	0,76**	0,84**
Довжина III шлуночка	-	0,47	0,95**	0,97**	0,90**
Ширина III шлуночка	-	-	0,25	0,65*	0,47
Довжина водопроводу	-	-	-	0,86**	0,90**
Довжина IV шлуночка	-	-	-	-	0,86**

Примітки: див. табл. 1.

Довжина водопроводу мала прямий кореляційний зв'язок із довжиною заднього та нижнього рогів бічного шлуночка, передньо-заднім розміром бічного шлуночка та довжиною III шлуночка. Між довжиною IV шлуночка та довжиною тіла, довжиною заднього рога, передньо-заднім розміром бічного шлуночка та довжиною III шлуночка теж знайдено сильний прямий кореляційний зв'язок. Сильну зворотну кореляційну залежність виявлено між шириною IV шлуночка та довжиною тіла, довжиною заднього та нижнього рогів, передньо-заднім розміром бічного шлуночка, довжиною III та IV шлуночків, довжиною водопроводу.

У дівчат виявлено як прямі, так і зворотні корелятивні зв'язки між різними структурами лікворної системи. Сильний прямий кореляційний зв'язок спостерігали спра-

ва між такими структурами: шириною переднього та заднього рогів бічного шлуночка; довжиною заднього рога та передньо-заднім розміром бічного шлуночка; між довжиною переднього рога та довжиною тіла бічного шлуночка (табл. 4).

Зворотний сильний кореляційний зв'язок виявлено між довжиною переднього та довжиною заднього рогів; довжиною тіла та довжиною заднього рога, передньо-заднім розміром бічного шлуночка; довжиною нижнього та довжиною заднього рогів; між передньо-заднім розміром бічного шлуночка та довжиною нижнього рога.

Зліва кореляційні зв'язки були дещо відмінними (табл. 5). Сильна пряма кореляційна залежність спостерігалася між довжиною переднього рога та довжиною тіла бічного шлуночка; між шириною переднього рога

та довжиною тіла бічного шлуночка; між шириною тіла та довжиною заднього рога бічного шлуночка; між шириною заднього та довжиною нижнього рога бічного шлуночка; між довжиною заднього рога та передньо-заднім розміром бічного шлуночка. Сильну зворотну

кореляційну залежність знайдено між шириною тіла та довжиною переднього рога та довжиною тіла бічного шлуночка, між довжиною заднього рога бічного шлуночка та довжиною переднього рога, довжиною тіла та довжиною нижнього рога бічного шлуночка.

Таблиця 4

Кореляційні зв'язки між структурами циркумвентрикулярної системи, розташованими справа, у дівчат (n = 5)

Характеристика	Ширина переднього рога	Довжина тіла бічного шлуночка	Ширина тіла бічного шлуночка	Довжина заднього рога	Ширина заднього рога	Довжина нижнього рога	Передньо-задній розмір бічного шлуночка
Довжина переднього рога	0,10	0,80**	-0,12	-0,73**	-0,21	0,39	-0,62*
Ширина переднього рога	-	0,62*	0,48	-0,61*	0,75**	0,42	-0,53
Довжина тіла бічного шлуночка	-	-	0,11	-0,90**	0,21	0,66*	-0,79**
Ширина тіла бічного шлуночка	-	-	-	0,19	0,00	-0,51	0,38
Довжина заднього рога	-	-	-	-	-0,49	-0,81**	0,97**
Ширина заднього рога	-	-	-	-	-	0,51	-0,57
Довжина нижнього рога	-	-	-	-	-	-	-0,90**

Примітки: див. табл. 1.

Таблиця 5

Кореляційні зв'язки між структурами циркумвентрикулярної системи, розташованими зліва, у дівчат (n = 5)

Характеристика	Ширина переднього рога	Довжина тіла бічного шлуночка	Ширина тіла бічного шлуночка	Довжина заднього рога	Ширина заднього рога	Довжина нижнього рога	Передньо-задній розмір бічного шлуночка
Довжина переднього рога	0,68*	0,97**	-0,92**	-0,86**	0,00	0,29	0,48
Ширина переднього рога	-	0,80**	-0,47	-0,39	0,00	0,00	0,00
Довжина тіла бічного шлуночка	-	-	-0,90**	-0,75**	0,00	0,12	-0,30
Ширина тіла бічного шлуночка	-	-	-	0,76**	0,21	-0,10	0,36
Довжина заднього рога	-	-	-	-	-0,46	-0,72**	0,86**
Ширина заднього рога	-	-	-	-	-	0,93**	-0,77**
Довжина нижнього рога	-	-	-	-	-	-	-0,95**

Примітки: див. табл. 1.

Структури, розташовані центрально, у більшості випадків мали пряму кореляційну залежність: сильний прямий кореляційний зв'язок спостерігали між шириною тіла та шириною III шлуночка; між довжиною водопроводу та довжиною заднього рога та передньо-заднім розміром бічного шлуночка. Між довжиною IV шлуночка та шириною тіла бічного шлуночка, довжиною заднього рога, передньо-заднім розміром бічного шлуночка, шириною III шлуночка та довжиною водопроводу. Між шириною IV шлуночка та шириною тіла бічного шлуночка, шириною III шлуночка, довжиною IV шлуночка (табл. 6).

Зворотна кореляційна залежність виявлена між шириною III шлуночка та довжиною нижнього рога бічного шлуночка; між довжиною водопроводу, довжиною тіла та довжиною нижнього рога бічного шлуночка; між довжиною IV шлуночка та довжиною нижнього рога. У той же час у юнаків та дівчат можна побачити наявність ще низки сильних кореляційних зв'язків між показниками, не пов'язаними з білатеральною симетрією.

Наявність великої кількості сильних кореляційних зв'язків у системі свідчить про сильне напруження в ній. Чим більше кореляцій – тим ближча система до руйну-

вання (Prygozhyn, 2006). Відомо, що жіночий організм на ранніх етапах розвитку виявляється стійкішим, ніж чоловічий. Про це свідчить досвід роботи неонатологічної служби, підвищена смертність хлопчиків першого року життя порівняно з дівчатками, а також низка інших показників. Поза сумнівом, що анатомічні структури, які існують на постнатальних етапах онтогенезу, – відображення морфогенетичних процесів, що відбуваються на ранніх етапах розвитку. Кількість сильних кореляційних зв'язків у юнаків і дівчат у досліджуваній когорті майже однакова (у юнаків дещо більша). У юнаків порівняно з дівчатами передньо-задній розмір бічного шлуночка справа та зліва має достовірно сильний прямий кореляційний зв'язок із довжиною заднього та нижнього рогів бічних шлуночків і довжиною тіла бічного шлуночка. У дівчат, навпаки, передньо-задній розмір справа зворотно достовірно корелює з довжиною тіла бічного шлуночка та довжиною нижнього рога обох боків. Це може бути відображенням виражених стресових чинників, що мають місце у процесі морфогенезу мозку осіб чоловічої статі порівняно з аналогічними чинниками, що діють на морфогенез мозку жінок.

Кореляційні зв'язки між структурами циркумвентрикулярної системи, розташованими центрально, у дівчат (n = 5)

Характеристика	Довжина III шлуночка	Ширина III шлуночка	Довжина водопроводу	Довжина IV шлуночка	Ширина IV шлуночка
Довжина переднього рога	-0,37	-0,52	-0,53	-0,46	-0,47
Ширина переднього рога	-0,69*	0,15	-0,56	-0,20	0,36
Довжина тіла бічного шлуночка	-0,47	-0,47	-0,73**	0,54	-0,31
Ширина тіла бічного шлуночка	-0,52	0,78**	0,39	0,72**	0,82**
Довжина заднього рога	0,50	0,58	0,95**	0,79**	0,40
Ширина заднього рога	-0,44	0,00	-0,66*	0,45	0,18
Довжина нижнього рога	0,00	-0,82**	-0,88**	-0,94**	-0,68*
Передньо-задній розмір бічного шлуночка	0,35	0,68*	0,99**	0,90	0,51
Довжина III шлуночка	–	-0,39	0,39	0,00	-0,54
Ширина III шлуночка	–	–	0,62*	0,88**	0,98**
Довжина водопроводу	–	–	–	0,89**	0,45
Довжина IV шлуночка	–	–	–	–	0,77**

Примітки: див. табл. 1.

Висновки

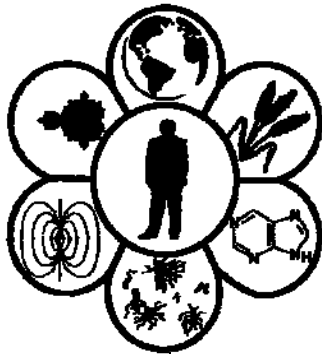
У даній віковій групі виявлено вірогідне збільшення таких показників у юнаків: довжини переднього рога бічного шлуночка справа, довжини тіла бічного шлуночка з обох боків та висоти III шлуночка. У дівчат вірогідно збільшувалися такі показники: ширина переднього рога бічного шлуночка справа та ширина заднього рога бічного шлуночка зліва. Отже, в осіб чоловічої статі прослідковується певний паралелізм формування різних структур шлуночкової системи. Оскільки це єдина система, зберігаються морфологічні та функціональні зв'язки між різними компонентами. Можна висловити припущення, що органи, які входять до складу циркумвентрикулярної системи (субкомісуральний орган, субфорнікальний орган, серединне підвищення тощо) певним чином забезпечують характер анатомічних зв'язків цих компонентів. Незаперечно одне: їх функціональна єдність у збереженні гомеостазу.

Бібліографічні посилання

- Alonso, M.I., Martin, C., Carnicero, E., 2011. Cerebrospinal fluid control of neurogenesis induced by retinoic acid during early brain development. *Dev. Dyn.* 240, 1650–1659.
- Baev, A.A., 2000. Magnitno-rezonansnaja tomografija golovnogogo mozga. Normal'naja anatomija golovnogogo mozga: Atlas [Magnetic resonance imaging of the brain. Normal Anatomy of the brain: Atlas]. Nauchno- proizvodstvennaja firma «A3», Moscow (in Russian).
- Buckner, R.L., Sepulcre, J., Talukdar, T., Krienen, F.M., Liu, H., Hedden, T., 2009. Cortical hubs revealed by intrinsic func-

- tional connectivity: Mapping, assessment of stability, and relation to Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 29, 1860–1873.
- Horsburgh, A., Massoud, T., 2013. The circumventricular organs of the brain: conspicuity on clinical 3T MRI and a review of functional anatomy. *Surg. Radiol. Anat.* 35(4), 343–349.
- Johanson, C.E., Stopa, E.G., McMillan, P.N., 2011. The blood-cerebrospinal fluid barrier: Structure and functional significance. *Methods Mol. Biol.* 686, 101–131.
- Kurtcuoglu, V., Poulikakos, D., Ventikos, Y., 2005. Computational modeling of the mechanical behavior of the cerebrospinal fluid system. *ASME J. Biomech. Eng.* 27, 264–269.
- Prygozhyn, Y., 2006. Ot sushhestvuyushhego k vozny'kayushhemu [From Being to Becoming]. *KomKnyga*, Moscow (in Russian).
- Sánchez, J.J., Rincon-Torroella, J., Prats-Galino, A., 2014. New endoscopic route to the temporal horn of the lateral ventricle: Surgical simulation and morphometric assessment. *J. Neurosurg.* 121(3), 751–759.
- Scholz, M., Pervin, R., Thissen, J., 2010. Skull base approaches in neurosurgery. *Head and Neck Oncology* 5, 5–16.
- Shehtman, A.G., Malygina, O.J., 2014. Primenenie metoda magnitno-rezonansnoj tomografii v klinicheskoy ocenke struktur golovnogogo mozga v norme i pri opuholevoj patologii [Application of magnetic resonance imaging in the clinical evaluation of brain structures in normal and tumor pathology]. *Medicinskij Almanah* 35, 174–178 (in Russian).
- Shemjakov, S.E., Sarkisjan, K.D., 2006. Vozrastnaja dinamika morfometricheskikh pokazatelej golovnogogo mozga cheloveka [Age dynamics of morphometric parameters of the human brain]. *Morfologija* 129, 143 (in Ukrainian).
- Torsten, B.M., Jemil', R., 2013. Norma pri KT- i MRT- issledovanijah [The rate at CT and MRI studies]. *MEDpress-inform*, Moscow (in Russian).
- Trofimova, T.N., Anan'eva, N.I., Nazinkina, J.V., 2005. Nejroradiologija [Neuroradiology]. SPbMAPO, Sankt Peterburg (in Russian).

Надійшла до редколегії 10.03.2016



УДК 612.741:611.728.4

Роль опорной функции нижних конечностей в премоторных изменениях Н-рефлекса камбаловидной мышцы

Е.З. Иванченко

Запорожский государственный медицинский университет, Запорожье, Украина

В исследованиях на здоровых людях изучали эффекты произвольного разгибания голеностопного сустава контралатеральной конечности, которое выполнялось в отсутствие или при наличии ее опорной функции, на Н-рефлекс камбаловидной мышцы. Изменения величины моносинаптических ответов возникали за 90 мс до начала произвольного движения и наблюдались в течение всего его премоторного периода. В отсутствие опорной функции контралатеральной конечности (положение лежа и стоя без опоры на стопу) происходило облегчение Н-рефлекса камбаловидной мышцы, которое не сопровождалось изменениями ее фоновой электромиограммы (ЭМГ), что свидетельствовало о пресинаптической локализации премоторных изменений состояния спинальных рефлекторных дуг, то есть их афферентной части. При выполнении конечностями опорной функции (положение стоя с опорой на обе ноги) Н-рефлекс и фоновая ЭМГ исследуемой мышцы в премоторном периоде разгибания контралатерального голеностопного сустава тормозились, что указывало на снижение рефлекторной возбудимости мотонейронного пула, имеющее постсинаптическую природу. Обсуждается ведущая роль опорной функции в формировании центральной нервной системой моторных команд, предвещающих произвольные движения нижних конечностей.

Ключевые слова: моносинаптический рефлекс; предвещающие перестройки; произвольные движения

The role of the supporting lower limb function in the premotor changes in the H-reflex of *m. soleus*

E.Z. Ivanchenko

Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine

In studies on healthy humans we examined changes in the H reflex amplitude and the intensity of background EMG of the soleus muscle within the premotor period of voluntary extension of the contralateral ankle joint. The tested persons were in the lying prone position with relaxed legs, or in the standing position with support on both feet or only on one foot with additional hand support. The soleus H reflex was induced using the standard technique by transcutaneous stimulation (1 ms long current pulses) of the tibial nerve afferents in the region of the popliteal dimple. Using superficial electrodes, we recorded the integral EMG reflex discharge from the *m. soleus*, amplified, and visualized it using a two-channel digital oscillograph, Handiscope HS3 (TiePieEngineering, Netherlands). In other tests, we also recorded tonic background EMG activity from the soleus muscle. After fullwave rectification and low-frequency filtration we estimated the area under the integral curve enveloping oscillations of the above mentioned EMG. In the lying position the extension of contralateral ankle joint evoked anticipatory facilitation of the testing soleus H-reflex. It manifested in 90–60 ms and reached the maximum 30 ms before the conditioning movement. Considerable changes of the soleus background EMG-activity did not occur during the premotor period. Consequently, it is supposed that the mechanism leading to the H-reflex facilitation is the decrease of presynaptic inhibition at 1a. In the standing position with support on both feet contralateral ankle joint extension caused anticipatory inhibition of the soleus H-reflex and simultaneous suppression of background EMG 90–60 ms before the conditioning movement. These results indicate the anticipatory changes of muscle tone and suggest participation of postsynaptic mechanism in the inhibition of the testing H-reflex. When the moving contralateral extremity had no support, the contralateral ankle joint extension did not cause anticipatory inhibition but facilitation of the soleus H-reflex. Its time course was similar to that observed in the lying position. The considerable changes of the soleus background EMG-activity did not arise. The results of the experiments indicate that the nature of premotor changes in the spinal neuron circuits, associated with the lower limb muscles, depends not

only on the type of upcoming voluntary movement. Being caused by the contralateral limb movements, they depend greatly on the fulfillment or nonfulfillment of the support function by the lower limbs.

Keywords: monosynaptic reflex; anticipatory adjustments; voluntary motion

Введение

Каждый произвольный двигательный акт сопряжен со сложными предваряющими функциональными изменениями в спинальных рефлекторных цепях. Такие изменения возникают непосредственно перед его началом под действием моторных команд, исходящих из головного мозга. Их роль заключается в оптимизации условий предстоящего произвольного движения. Изменения спинальных рефлекторных цепей проявляются, в частности, в предваряющих постуральных перестройках, которые выражаются в адаптивных изменениях тонуса мускулатуры и способствуют сохранению позы тела и равновесия (Horak, 2006; Bouisset, 2008; Latash, 2010; Saradjian, 2015). Описаны также предваряющие изменения потоков афферентных импульсов, которые влияют непосредственно на формирование центральных моторных команд (Ruget et al., 2010; Mouchnino et al., 2012).

Одним из основных методов исследования спинальных рефлекторных механизмов человека является Н-рефлексометрия (Pierrot-Deseilligny and Mazevet, 2000; Zehr, 2002; Misiaszek, 2003; Knikou, 2008). Н-рефлекс представляет собой рефлекторную реакцию мышцы на электрическое раздражение ее низкого порога афферентов, имеющих моносинаптическую связь с иннервирующими ее мотонейронами. Величина Н-рефлекса камбаловидной мышцы претерпевает определенные изменения в премоторном периоде произвольных движений ипсилатеральной (Kots, 1969; Schieppati et al., 1986; Riedo and Ruegg, 1988; Geertsen et al., 2010) и контралатеральной (Smetanin, 1974; Eichenberger and Ruegg, 1984) нижних конечностей. Характер сдвигов величины моносинаптических рефлексов на протяжении этого периода определяется видом предстоящего произвольного движения. Изучение предваряющих изменений Н-рефлексов и их происхождения способствует пониманию механизмов формирования произвольных движений человека.

Цель данной статьи – выяснить, какую роль имеет выполнение нижними конечностями их опорной функции в изменениях Н-рефлекса камбаловидной мышцы, предваряющих произвольные движения голеностопного сустава.

Материал и методы исследований

Исследования проведены на 27 добровольцах, которые дали информированное согласие на участие в опытах. Н-рефлекс камбаловидной мышцы вызывали путем чрескожной монополярной стимуляции афферентных волокон большеберцового нерва в области подколенной ямки электрическими импульсами длительностью 1 мс. Моносинаптический ответ исследуемой мышцы отводили с помощью поверхностных электродов, усиливали и регистрировали посредством двухканального цифрового электронного осциллографа Handiscop HS3.

Для исследования локализации изменений Н-рефлекса камбаловидной мышцы регистрировали ее фоновую ЭМГ, которую отводили поверхностными электродами и

после усиления также регистрировали посредством электронного осциллографа. Определение показателей интенсивности ЭМГ производили с помощью программы Origin 8.6. После двухполупериодного выпрямления и низкочастотной фильтрации определяли площадь подинтегральной кривой, огибающей осцилляции ЭМГ.

Изучали динамику величины Н-рефлекса и интенсивности фоновой ЭМГ камбаловидной мышцы на протяжении премоторного периода разгибания контралатеральной нижней конечности в голеностопном суставе (кондиционирующее движение). Во время исследований испытуемые находились в одном из трех положений: лежа на кушетке на животе с расслабленными нижними конечностями и свободно свисающими стопами, стоя с опорой на обе ноги или стоя с опорой на одну из них, используя дополнительную поддержку с помощью рук. По световому сигналу (вспышке светодиода) испытуемые производили по типу простой сенсомоторной реакции с максимальной скоростью кондиционирующее движение с немедленным возвратом стопы в исходное положение. Показателем начала указанного движения были первые осцилляции фазной ЭМГ камбаловидной мышцы контралатеральной конечности.

Тестируемый Н-рефлекс регистрировали через различные промежутки времени после светового сигнала с тем, чтобы получить рефлекторные ответы в течение всего латентного (премоторного) периода кондиционирующей двигательной реакции. С целью определения динамики величины Н-рефлекса указанный период был разделен на равные промежутки времени, предшествующие началу движения: 90–120, 60–90, 30–60 и 0–30 мс. Амплитуды всех полученных Н-рефлексов нормировали относительно контроля (в %). Фоновую ЭМГ камбаловидной мышцы регистрировали на всем протяжении латентного периода движения. Показатели ее интенсивности в различные премоторные интервалы сравнивали с интенсивностью ЭМГ этой же мышцы до подачи светового сигнала.

Определяли средние арифметические нормированной амплитуды Н-рефлексов и интенсивности фоновой ЭМГ и стандартные ошибки исследуемых показателей. Достоверность различий с контролем оценивали, используя непараметрический критерий Вилкоксона.

Результаты и их обсуждение

В первой и второй сериях опытов исследовали динамику изменений амплитуды тестируемого Н-рефлекса камбаловидной мышцы и интенсивности ее фоновой ЭМГ на протяжении премоторного периода разгибания контралатерального голеностопного сустава при положении испытуемых лежа на животе со свободно свисающими стопами (рис. 1). Приблизительно за 90 мс до начала кондиционирующего движения наступало увеличение амплитуды тестируемого Н-рефлекса. В интервале 90–120 мс премоторного периода усредненная величина моносинаптических ответов камбаловидной

мышцы составила $110 \pm 3\%$ от контроля, за 60–90 мс до начала движения – $114 \pm 8\%$, за 30–60 мс – $130 \pm 7\%$, за 0–30 мс – $143 \pm 9\%$, на фоне движения – $160 \pm 8\%$.

Нормированные показатели интенсивности фоновой ЭМГ тестируемой мышцы были таковы: в интервале за 90–120 мс до начала движения – $93 \pm 3\%$, за 60–90 мс – $90 \pm 3\%$, за 30–60 мс – $87 \pm 3\%$, за 0–30 мс – $89 \pm 4\%$, на фоне движения – $94 \pm 8\%$. Таким образом, величина Н-рефлекса камбаловидной мышцы существенно возрастала на протяжении премоторного периода произвольного разгибания контралатерального голеностопного сустава при

наличии тенденции к снижению фоновой ЭМГ-активности тестируемой мышцы.

В третьей и четвертой сериях опытов таким же образом регистрировали изменения Н-рефлекса камбаловидной мышцы и ее фоновую ЭМГ, предшествующие разгибанию контралатерального голеностопного сустава, но при этом испытуемые находились в положении стоя с опорой на обе ноги. При совершении кондиционирующего движения пятка не отрывалась от опоры, а стопа опускалась ниже ее уровня. Полученные данные существенно отличались от результатов первой и второй серий опытов (рис. 2).

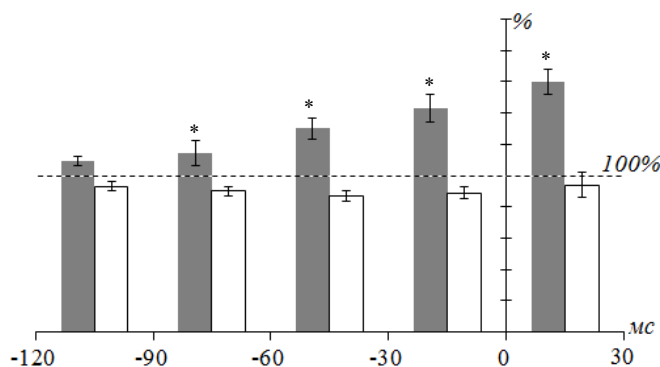


Рис. 1. Динамика величины Н-рефлекса ($n = 12$) и фоновой ЭМГ ($n = 5$) камбаловидной мышцы в премоторный период произвольного разгибания в контралатеральном голеностопном суставе (лежа с расслабленными конечностями): по оси абсцисс – интервалы времени (мс) до начала произвольного движения контралатеральной конечности; по оси ординат: темные столбики – усредненная нормированная величина Н-рефлекса камбаловидной мышцы (%), светлые столбики – усредненная нормированная интенсивность фоновой ЭМГ камбаловидной мышцы (%); звездочками обозначены достоверные изменения

За 90–120 мс до начала движения средняя нормированная величина Н-рефлекса камбаловидной мышцы составила $106 \pm 3\%$, за 60–90 мс – $68 \pm 5\%$, за 30–60 мс – $53 \pm 8\%$, за 0–30 мс – $73 \pm 12\%$, на фоне движения – $132 \pm 12\%$. Таким образом, тестируемый Н-рефлекс оказался в премоторный период заторможенным. Возникновение торможения отмечено за 90 мс до начала кондиционирующего движения. К концу его премоторного периода глубина торможения уменьшилась.

Динамика интенсивности фоновой ЭМГ камбаловидной мышцы в премоторном периоде разгибания контралатерального голеностопного сустава была следующей: в интервале за 90–120 мс до начала движения интенсивность ЭМГ составила в среднем $93 \pm 3\%$, за 60–90 мс – $73 \pm 8\%$, за 30–60 мс – $63 \pm 6\%$, за 0–30 мс – $80 \pm 13\%$, на фоне движения – $97 \pm 6\%$. Таким образом, изменения величины Н-рефлекса, предвещающие кондиционирующую двигательную реакцию, были однонаправленными с модулирующей фоновой ЭМГ исследуемой мышцы.

В пятой и шестой сериях опытов исследовали эффект разгибания контралатерального голеностопного сустава на величину Н-рефлекса камбаловидной мышцы и ее фоновую ЭМГ в условиях, когда испытуемые пользовались дополнительной поддержкой с помощью обеих рук и опирались лишь на тестируемую нижнюю конечность. Мышцы ноги, осуществляющей кондиционирующее движение, в исходном положении были расслабленными. Перед началом двигательной реакции наблюдалось увеличение амплитуды Н-рефлексов камбаловидной мышцы (рис. 3). В интервале за 90–120 мс до начала движения величина Н-рефлекса составила $104 \pm$

3% от контроля, за 60–90 мс – $131 \pm 6\%$, за 30–60 мс – $153 \pm 7\%$, а в промежутке времени, меньшем, чем 30 мс до начала движения – $159 \pm 7\%$.

Нормированные показатели интенсивности фоновой ЭМГ камбаловидной мышцы в шестой серии опытов изменялись мало. Они были такими в интервалах премоторного периода кондиционирующего движения: за 90–120 мс до его начала – $98 \pm 5\%$, за 60–90 мс – $102 \pm 4\%$, за 30–60 мс – $102 \pm 4\%$, за 0–30 мс – $99 \pm 4\%$, на фоне движения – $99 \pm 3\%$.

Динамика тестируемого Н-рефлекса в премоторном периоде произвольного разгибания контралатерального голеностопного сустава в значительной степени зависела от положения тела испытуемых. Одно и то же кондиционирующее движение вызывало в положении лежа предваряющее облегчение, а в положении стоя с опорой на обе ноги – торможение Н-рефлекса камбаловидной мышцы. Эти различия нельзя объяснить влияниями от рецепторов вестибулярного аппарата, поскольку сдвиги величины моносинаптического рефлекторного ответа при вертикальном положении в отсутствие опорной функции конечности, осуществляющей произвольное движение, были такими же, как и в положении лежа. Это указывает на то, что динамика Н-рефлекса в премоторном периоде разгибания контралатерального голеностопного сустава обусловлена наличием либо отсутствием опорной функции конечности. Можно полагать, что состояние спинальных рефлекторных дуг зависит от афферентных сигналов, поступающих в центральную нервную систему от рецепторов мышц голени (Refshauge and Fitzpatrick, 1995; Gobble and Coxon, 2011) и кож-

ных рецепторов стопы (Kavaonoudias and Roll, 1998). Очевидно, такие сигналы влияли на функциональное состояние супраспинальных структур, формирующих моторные команды в период, непосредственно предшествующий произвольным движениям конечности.

С помощью регистрации фоновой ЭМГ-активности камбаловидной мышцы в премоторном периоде разгибания голеностопного сустава контралатеральной конечности удалось выявить определенные отличия и в физиологических механизмах изменений исследуемых Н-рефлексов. Отсутствие модуляции интенсивности

ЭМГ в отсутствие опорной функции конечностей свидетельствовало о том, что облегчение моносинаптических ответов в данном случае имело пресинаптическую локализацию и, очевидно, касалось афферентной части соответствующих рефлекторных дуг. Оно могло быть связано с ослаблением пресинаптического 1а торможения. Функциональная роль этого явления могла заключаться в облегчении поступления афферентной информации в центральную нервную систему в условиях ее относительного дефицита в отсутствие опорной функции нижних конечностей.

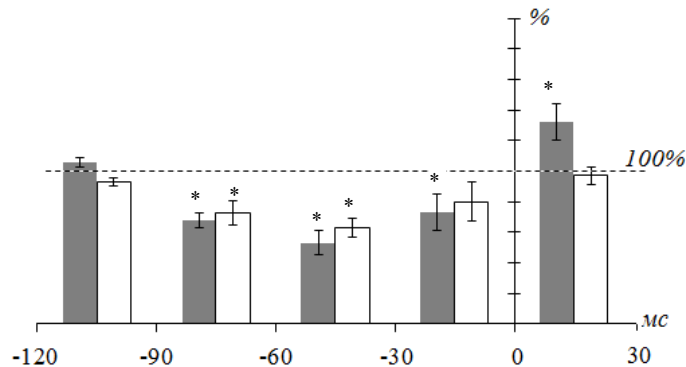


Рис. 2. Динамика величины Н-рефлекса (n = 5) и фоновой ЭМГ (n = 5) камбаловидной мышцы в премоторном периоде произвольного разгибания в контралатеральном голеностопном суставе (стоя с опорой на обе конечности): обозначения см. рис. 1

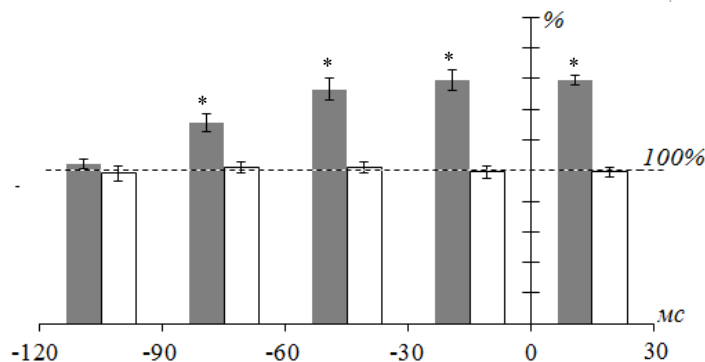


Рис. 3. Динамика величины Н-рефлекса (n = 5) и фоновой ЭМГ (n = 5) камбаловидной мышцы в премоторный период произвольного разгибания в контралатеральном голеностопном суставе (с поддержкой при помощи рук и опорой на тестируемую конечность): обозначения см. рис. 1

Напротив, однонаправленные изменения амплитуды Н-рефлексов и интенсивности фоновой ЭМГ камбаловидной мышцы при осуществлении разгибания контралатерального голеностопного сустава, которое испытуемые выполняли с опорой на обе ноги, свидетельствовали о снижении возбудимости мотонейронного пула, то есть о постсинаптической локализации модуляции состояния спинальных рефлекторных дуг. В данном случае реализовывались координационные взаимодействия между мышцами обеих конечностей, играющие важную роль в осуществлении шагового цикла.

Выводы

Результаты исследований показали, что произвольное разгибание контралатеральной нижней конечности в голеностопном суставе вызывает предваряющие изменения

Н-рефлекса камбаловидной мышцы, которые возникают за 60–90 мс до начала движения, а их характер зависит от того, находится ли нижние конечности в расслабленном состоянии или выполняют опорную функцию.

В отсутствие опорной функции контралатеральной конечности (положение лежа и стоя без опоры) разгибание ее голеностопного сустава вызывает облегчение Н-рефлекса камбаловидной мышцы, которое не сопровождается изменениями ее фоновой ЭМГ.

При выполнении контралатеральной конечностью опорной функции разгибание ее голеностопного сустава приводит к торможению Н-рефлекса камбаловидной мышцы и ее фоновой ЭМГ-активности.

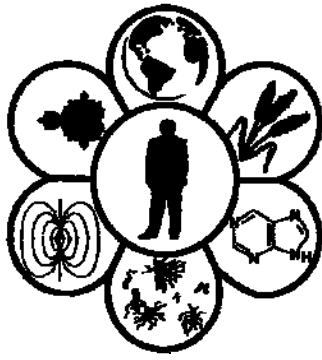
Изменения Н-рефлексов камбаловидной мышцы в премоторном периоде разгибания контралатерального голеностопного сустава при опоре на конечность, осуществляющую произвольное движение, и в отсутствие опоры локализованы соответственно в постсинаптической и

пресинаптической части спинальных рефлекторных дуг и могут иметь различное функциональное значение.

Библиографические ссылки

- Bouisset, S., Do, M.C., 2008. Posture, dynamic stability, and voluntary movement. *Neurophysiol. Clin.* 38(6), 345–362.
- Eichenberger, A., Rüegg, D.G., 1984. Relation between the specific H reflex facilitation preceding a voluntary movement and movement parameters in man. *J. Physiol.* 347, 545–559.
- Geertsen, S.S., Zuur, A.T., Nielsen, J.B., 2010. Voluntary activation of ankle muscles is accompanied by subcortical facilitation of their antagonists. *J. Physiol.* 588, 2391–2402.
- Goble, D.J., Coxon, J.P., Van Impe, A., Geurts, M., Doumas, M., Wenderoth, N., Swinnen, S.P., 2011. Brain activity during ankle proprioceptive stimulation predicts balance performance in young and older adults. *J. Neurosci.* 31, 16344–16352.
- Horak, F.B., 2010. Postural orientation and equilibrium: What do we need to know about neural control of balance to prevent falls? *Age Ageing.* 35(2), 7–11.
- Kavounoudias, A., Roll, R., Roll, J.P., 1998. The plantar sole is a 'dynamometric map' for human balance control. *Neuroreport* 9(14), 3247–3252.
- Knikou, M., 2008. The H-reflex as a probe: Pathways and pit falls. *J. Neurosci. Methods* 171(1), 1–12.
- Kots, Y.M., Zhukov, V.I., 1971. On the supraspinal control of antagonistic muscles by segmental centers in humans. 3. Adjustment of spinal apparatus of reciprocal inhibition within the period of formation of voluntary movements. *Biofizika* 16(6), 1085–1091.
- Latash, M.L., 2010. Motor synergies and the equilibrium-point hypothesis. *Motor Control.* 14(3), 294–322.
- Misiaszek, J.E., 2003. The H-reflex as a tool in neurophysiology: Its limitation and uses in understanding nervous system function. *Muscle Nerve* 28(2), 144–160.
- Mouchnino, L., Robert, G., Ruget, H., Blouin, J., Simoneau, M., 2012. Online control of anticipated postural adjustments in step initiation: Evidence from behavioral and computational approaches. *Gait Posture* 35(4), 616–620.
- Pierrot-Deseilligny, E., Mazevet, D., 2000. The monosynaptic reflex: A tool to investigate motor control in humans. Interest and limits. *Neurophysiol. Clin.* 30(2), 67–80.
- Refshauge, K.M., Fitzpatrick, R.C., 1995. Perception of movement at the human ankle: Effects of leg position. *J. Physiol.* 488, 243–248.
- Riedo, R., Rüegg, D.G., 1988. Origin of the specific H reflex facilitation preceding a voluntary movement in man. *J. Physiol.* 397, 371–388.
- Ruget, H., Blouin, J., Teasdale, N., Mouchnino, L., 2008. Can prepared anticipatory postural adjustments be updated by proprioception? *Neurosci.* 155(3), 640–648.
- Saradjian, A.H., 2015. Sensory modulation of movement, posture and locomotion. *Neurophysiol. Clin.* 45(4–5), 255–267.
- Smetanin, B.N., 1974. Contralateral spinal effects accompanying voluntary movements in the ankle joint. *Sechenov Fiziol. Zh. SSSR.* 3, 334–340.
- Zehr, P.E., 2002. Considerations for use of the Hoffmann reflex in exercise studies. *Eur. J. Appl. Physiol.* 86(6), 455–468.

Надійшла до редколегії 11.03.2016



УДК 577.3+796.072.2

Вплив помірних фізичних навантажень на показники імунної системи у мешканців радіаційно забруднених територій

В.Л. Соколенко, С.В. Соколенко

Черкаський національний університет імені Богдана Хмельницького, Черкаси, Україна

Вивчали вплив фізичних навантажень, зумовлених заняттям фізичною культурою, на показники імунної системи у мешканців територій, забруднених радіонуклідами. Встановили, що за умов відсутності фізичних навантажень в обстежених спостерігалася певна імуносупресія Т-клітинної ланки імунітету. Заняття фізичною культурою в основній групі зумовили достовірне зниження відносної кількості лімфоцитів та підвищення відносної кількості паличкоядерних нейтрофілів, що вважається типовою ознакою початкових стадій стресової реакції. Відмічено статистично достовірне зниження відносної та абсолютної кількості клітин із фенотипами CD3+, CD5+, CD4+ та імунорегуляторного індексу CD4+/CD8+. Відсутні вірогідні зміни рівня цитотоксичних Т-лімфоцитів із фенотипом CD8+ та природних кілерів із фенотипом CD16+. Спостерігалася підвищення відносної кількості В-лімфоцитів із фенотипом CD72+ та тенденція до зростання рівня сироваткового IgM. Відновний період тривав дві доби. В осіб із групи ЛФК заняття фізичною культурою не викликали статистично вірогідних змін показників. Таким чином, у мешканців радіаційно забруднених територій помірні фізичні навантаження викликають короточасні компенсаторні зміни показників клітинної ланки імунітету в межах гомеостатичної норми, із досить ефективним відновленням.

Ключові слова: малі дози радіації, фізичні навантаження, стрес, імунітет

Influence of moderate physical load on parameters of the immune system among residents of contaminated areas

V.L. Sokolenko, S.V. Sokolenko

Cherkasy National University named after Bogdan Khmelnytsky, Cherkasy, Ukraine

The aim of this research was to evaluate the effects of physical stress caused by physical activity on parameters of immune system among the residents of areas contaminated with radionuclides. In the 2000–2015 we examined 125 students of Cherkasy State University, including the control group of people from uncontaminated areas, persons working in a basic physical training group and those with symptoms of vegetative-vascular dystonia, who worked in a therapeutic physical training group. Immune system parameters were analyzed: a day before physical training, immediately after the training and two days after the training to assess the recovery period. Indicators of cellular immunity were determined by immunophenotyping and dyeing on Romanowsky-Giemsa. The level of immunoglobulins in blood serum was determined by radial immunodiffusion on Mancini. The level of cortisol in blood serum was determined by the immunoenzyme method. Here we established that even in the absence of physical activity, some immunosuppression of T-cell immunity was observed in residents of contaminated areas. Working in the basic physical training group resulted in a significant decrease in the relative number of lymphocytes and increasing in the relative number of band neutrophils, which is a typical feature of the early stages of stress response. A statistically significant reduction in relative and absolute number of cells with phenotypes CD3+, CD5+, CD4+ and immunoregulatory index CD4+/CD8+ was observed. There were no significant changes of cytotoxic T lymphocytes with phenotype CD8+ and natural killer cells with phenotype CD16+. Increase of the relative number of B cells, that express CD72 antigen, and growth trend in serum IgM were registered. All parameters analyzed were within the physiological homeostatic norm, however, some reached extreme recommended levels. Recovery period lasted 2 days. Individuals working in therapeutic physical training group did not show statistically significant changes in immune system parameters. Thus, therapeutic exercises don't reach the stress level and can be potentially safe for the natural resistance of the body. So, among residents of areas contaminated with radionuclides due to the Chernobyl accident, moderate load during physical training lessons causes short-term compensatory changes of cellular immunity within the homeostatic norm with effective and rapid recovery. Taking

into account the immunosuppression, caused by chronic exposure to low doses of ionizing radiation, it is important to choose exercises, their duration and intensity carefully, giving preference to therapeutic exercises.

Keywords: low doses of radiation; physical activity; stress; immunity

Вступ

Аварія на Чорнобильській АЕС стала одним із факторів, які вже протягом трьох десятиліть визначає стан здоров'я населення України. Дані літератури свідчать про підвищення частоти онкологічних захворювань, ендокринних порушень, серцево-судинних та психосоматичних дисфункцій, генетичних мутацій та імунодефіцитних станів у потерпілих внаслідок цієї радіаційної катастрофи. Така тенденція характерна не лише для ліквідаторів наслідків аварії та цивільного населення, котре зазнало гострого опромінення, а і мешканців територій, забруднених радіонуклідами (Telnov, 2002; Eheman, 2003; Baker, 2011; Bazyka, 2013; Gyuleva, 2015; Horban et al., 2015).

В окремих публікаціях сповіщається про зниження у ліквідаторів показників фізичної працездатності та про позитивний вплив на стан здоров'я мешканців радіаційно забруднених районів (зокрема, підлітків) фізичних навантажень. Такий ефект пояснюють зростанням неспецифічної стійкості до різноманітних стресорів, у тому числі й до радіаційного, за рахунок збільшення активності важливого антиоксидантного ферменту супероксиддисмутази у скелетних м'язах, а також зниження рівня активності перекисного окиснення ліпідів у випадку максимальних навантажень (Kryvytskyi, 2001; Chyzyk, 2008).

З іншого боку, фізичні навантаження також вважаються визнаним стресовим фактором (Pedersen, 2000). Фізичні навантаження, котрі досягли стресового рівня, впливають перш за все на імуноейроендокринну систему організму, викликаючи розвиток адаптаційного синдрому, а за тривалої хронічної дії чи значної потужності можуть зумовлювати порушення гомеостазу та, як наслідок, ініціацію низки патологічних станів (Khaïtov, 2001; Agadzhanian, 2005; Horban and Stanshevska, 2014). При цьому інтенсивні та тривалі навантаження спричинюють виражену імуносупресію, що неодноразово відмічалось для професійних спортсменів, особливо в період відповідальних змагань (Baj, 1994; Suzdalnitskiy, 2003). Надзвичайно потужним імунодепресантом вважається також вплив іонізуючого випромінювання (Telnov, 2002; Cohen, 2007).

Таким чином, з одного боку, у студентів традиційно наявний дефіцит рухової активності, який можна компенсувати дозованими навантаженнями на заняттях фізичною культурою (Pulnenkiy, 2006). Окремі дослідження свідчать, що оптимальне фізичне навантаження в сукупності з раціональним харчуванням і правильним способом життя варто рекомендувати як найефективніший засіб подолання різних відхилень стану здоров'я підлітків і молоді (Agadzhanian, 2005; Grabovskyi and Grabovska, 2015). З іншого боку, й іонізуюче випромінювання, і фізичні навантаження визнаються стресовими факторами та потенційними імунодепресантами. Тобто, у випадку студентів, які приїхали на навчання з території посиленого радіоекологічного контролю, можливі ефекти потенціювання, адитивності чи синергізму та, як наслідок, явища

дистресу, критичного для гомеостатичних систем організму, у тому числі імунної. Це зумовило актуальність наших досліджень та визначило мету.

Мета роботи – оцінити вплив фізичних навантажень, зумовлених заняттям фізичною культурою, на показники імунної системи у мешканців територій, забруднених радіонуклідами.

Матеріал і методи досліджень

Протягом 2000–2015 років обстежено 125 осіб, студентів ЧНУ, серед яких виділили три групи. Першу (контроль) склали 50 осіб, віднесених до групи практично здорових, – мешканці відносно екологічно чистих районів. Другу групу, чисельністю 50 осіб, сформували студенти ЧНУ, які приїхали на навчання з територій посиленого радіоекологічного контролю (IVa радіаційна зона, щільність забруднення ґрунтів ізотопами ^{137}Cs 1–5 Кі/км²), у яких не спостерігалось виражених морфофункціональних порушень, тому вони відвідували основну групу фізичного виховання. Ще 25 осіб із території посиленого радіоекологічного контролю мали ознаки вегето-судинної дистонії та відвідували групу лікувальної фізкультури (ЛФК). Вік обстежених – 18–24 роки, на час обстеження вони не мали гострих інфекційних захворювань. Проаналізовано показники 39 осіб чоловічої статі та 86 осіб жіночої (обстежених у фолікулярну стадію менструального циклу). Між показниками осіб різних статей не спостерігалось статистично вірогідної різниці, тому у подальшому їх розглядали як єдину сукупність.

Аналіз показників імунної системи проводили у вересні – жовтні, до та після занять фізичною культурою. Формою проведення навчально-тренувальних занять для основної групи був 90-хвилинний оздоровчо-тренувальний процес, побудований за традиційною структурою, що містив вправи, передбачені державною програмою. Комплекс лікувальної фізкультури (ЛФК) проводили для осіб з ознаками вегето-судинної дистонії, містив дозовані навантаження, зокрема, розтяжку, дихальні вправи, вправи на координацію рухів, вправи для вестибулярного апарату, короткочасні рухливі ігри.

Аналіз показників імунної системи проводили за добу до занять фізичною культурою, відразу після закінчення заняття (яке стояло першою парою) та через дві доби для оцінки відновного періоду. В обстежених відбирали 10 мл венозної крові. Для частини аналізів (оцінки лейкоцитарної формули та рівня лейкоцитів) використовували капілярну кров. Обстеження та забори крові проводили кваліфіковані медичні працівники на базі санаторію-профілакторію «Едем» при Черкаському національному університеті.

Загальну кількість лейкоцитів підраховували в камері Горяєва, лімфоцитів – на основі кров'яного мазка, фарбованого за Романовським – Гімзою).

Експресію поверхневих антигенів лімфоцитами периферичної крові визначали імунофлуоресцентним методом

із використанням моноклональних антитіл до поверхневих маркерів клітин імунної системи LT1 (для оцінки 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 оцінки експресії Т-клітинного маркера ефекторної або супресорної активності CD8), LNK16 (для оцінки експресії маркера природної кілерної активності CD16) та F(ab)2 – фрагментів овечих антитіл до IgG миші, мічених FITC (Сорбент, Росія).

Рівень імуноглобулінів у сироватці крові визначали методом радіальної імунодифузії за Манчині 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).

Статистичну обробку результатів проводили методами варіаційної статистики. Дані наведено у вигляді: середнє арифметичне \pm похибка середнього арифметичного ($M \pm m$). Достовірність різниці між показниками визначали за t-критерієм Стьюдента, попередньо перевірявши вибірки на нормальність розподілу.

Результати та їх обговорення

Навіть за відсутності фізичних навантажень рівень кортизолу в мешканців територій, забруднених радіонуклідами, був вірогідно підвищений порівняно з контролем. Після фізичних навантажень в основній групі рівень кортизолу вірогідно підвищився, у групі ЛФК показник не продемонстрував вірогідних змін (табл.).

Таблиця

Показники імунної системи в обстежених із територій посиленого радіоекологічного контролю за умов помірних фізичних навантажень, зумовлених заняттям фізичною культурою

Показники	Контроль (n = 50)	Обстежені з IV зони, основна група, до навантаження (n = 50)	Обстежені з IV зони, основна група, після навантаження (n = 50)	Обстежені з IV зони, ЛФК, до навантаження (n = 25)	Обстежені з IV зони, ЛФК, після навантаження (n = 25)
Кортизол, нмоль/л	349 \pm 10,1	627 \pm 21,1*	693 \pm 15,9**	620 \pm 24,3*	641 \pm 19,0*
Лейкоцити, $\times 10^9$ /л	6,59 \pm 0,074	7,01 \pm 0,121*	7,21 \pm 0,254*	7,42 \pm 0,099*	7,45 \pm 0,112*
Лімфоцити, %	26,9 \pm 0,26	22,9 \pm 0,29*	21,5 \pm 0,11**	24,1 \pm 0,31*	23,7 \pm 0,35*
Лімфоцити, $\times 10^9$ /л	1,85 \pm 0,035	1,60 \pm 0,041*	1,55 \pm 0,057*	1,74 \pm 0,041*	1,69 \pm 0,043*
Моноцити, %	5,69 \pm 0,291	6,06 \pm 0,251	5,87 \pm 0,242	6,15 \pm 0,250	6,10 \pm 0,210
Моноцити, $\times 10^9$ /л	0,39 \pm 0,031	0,42 \pm 0,021	0,40 \pm 0,037	0,41 \pm 0,028	0,38 \pm 0,031
Нейтрофіли паличкоядерні, %	3,61 \pm 0,287	4,55 \pm 0,075*	5,39 \pm 0,096**	4,98 \pm 0,085*	5,01 \pm 0,077*
Нейтрофіли паличкоядерні, $\times 10^9$ /л	0,24 \pm 0,019	0,32 \pm 0,027*	0,41 \pm 0,056*	0,35 \pm 0,040*	0,37 \pm 0,029*
Нейтрофіли сегментоядерні, %	62,8 \pm 0,48	65,3 \pm 0,49*	65,4 \pm 0,31*	64,4 \pm 0,50*	65,1 \pm 0,51*
Нейтрофіли сегментоядерні, 10^9 /л	4,18 \pm 0,051	4,51 \pm 0,050*	4,65 \pm 0,089*	4,49 \pm 0,065*	4,51 \pm 0,064*
Базофіли, %	0,13 \pm 0,068	0,32 \pm 0,099	0,35 \pm 0,087	0,32 \pm 0,099	0,33 \pm 0,084
Базофіли, $\times 10^9$ /л	0,01 \pm 0,006	0,02 \pm 0,009	0,02 \pm 0,011	0,02 \pm 0,009	0,03 \pm 0,011
Еозинофіли, %	1,00 \pm 0,245	2,37 \pm 0,201*	2,55 \pm 0,295*	2,47 \pm 0,194*	2,49 \pm 0,201*
Еозинофіли, 10^9 /л	0,05 \pm 0,017	0,10 \pm 0,015*	0,12 \pm 0,021*	0,12 \pm 0,019*	0,13 \pm 0,021*
CD3+, %	66,1 \pm 0,43	62,5 \pm 0,60*	60,0 \pm 0,72**	59,4 \pm 0,62*	58,9 \pm 0,71*
CD3+, $\times 10^9$ /л	1,21 \pm 0,022	1,00 \pm 0,026*	0,75 \pm 0,031**	0,96 \pm 0,024*	0,91 \pm 0,029*
CD5+, %	71,8 \pm 0,60	65,5 \pm 0,59*	62,1 \pm 0,59**	67,9 \pm 0,59*	67,1 \pm 0,51*
CD5+, $\times 10^9$ /л	1,36 \pm 0,015	1,08 \pm 0,028*	0,88 \pm 0,037*	1,08 \pm 0,029*	1,08 \pm 0,028*
CD4+, %	40,3 \pm 0,40	33,9 \pm 0,59*	31,1 \pm 0,60**	30,8 \pm 0,74*	30,0 \pm 0,61*
CD4+, $\times 10^9$ /л	0,82 \pm 0,012	0,62 \pm 0,026*	0,50 \pm 0,037**	0,55 \pm 0,038*	0,50 \pm 0,029*
CD8+, %	27,4 \pm 0,41	26,8 \pm 0,39	27,2 \pm 0,41	25,1 \pm 0,51*	25,2 \pm 0,41*
CD8+, $\times 10^9$ /л	0,49 \pm 0,025	0,48 \pm 0,021	0,52 \pm 0,045	0,43 \pm 0,021	0,45 \pm 0,019
CD4+/CD8+	1,65 \pm 0,031	1,35 \pm 0,031*	1,20 \pm 0,037**	1,33 \pm 0,039*	1,31 \pm 0,038*
CD16+, %	18,6 \pm 1,09	14,7 \pm 1,09*	13,1 \pm 1,12*	14,8 \pm 1,11*	14,4 \pm 0,98*
CD16+, $\times 10^9$ /л	0,35 \pm 0,031	0,22 \pm 0,015*	0,19 \pm 0,028*	0,22 \pm 0,020*	0,20 \pm 0,019*
CD72+, %	9,9 \pm 0,17	10,2 \pm 0,39	11,9 \pm 0,41**	10,3 \pm 0,40	10,4 \pm 0,31
CD72+, $\times 10^9$ /л	0,17 \pm 0,010	0,17 \pm 0,021	0,21 \pm 0,032	0,15 \pm 0,020	0,17 \pm 0,020
IgG, мг/мл	10,1 \pm 0,19	12,0 \pm 0,57*	11,0 \pm 0,63	11,1 \pm 0,53	11,1 \pm 0,41
IgM, мг/мл	1,70 \pm 0,121	1,85 \pm 0,187	2,15 \pm 0,110	1,87 \pm 0,201	1,90 \pm 0,101
IgA, мг/мл	1,80 \pm 0,097	1,70 \pm 0,092	1,67 \pm 0,099	1,69 \pm 0,099	1,71 \pm 0,088

Примітки: * – вірогідна різниця показника порівняно з контролем за $P < 0,05$; ** – вірогідна різниця показника після навантаження порівняно з показником до навантаження за $P < 0,05$.

Таким чином, підтверджується стресова дія хронічного впливу малих доз іонізуючого випромінювання, яка може посилюватися залежно від інтенсивності додатково-го фізичного навантаження. Аналіз показників клітинного

імунітету показав, що до занять фізичною культурою в обстежених із територій посиленого радіоекологічного контролю спостерігалось вірогідне підвищення (порівняно з контролем) відносної та абсолютної кількості па-

личкоядерних і сегментоядерних нейтрофілів, еозинофілів, зниження відносної та абсолютної кількості лімфоцитів (їх субпопуляцій, що експресують антигени CD3, CD5, CD4 та CD16). Також в обстежених знижений імунорегуляторний індекс CD4+/CD8+ та підвищена концентрація сироваткового IgG. Відмічені ефекти стосуються як основної групи, так і групи ЛФК з ознаками вегето-судинної дистонії (табл.). Отримані дані узгоджуються з повідомленнями про імносупресію Т-клітинного імунітету за умов хронічного опромінення малими дозами радіації (Godekmerdan, 2004; Sajjadieh, 2009; Jahns, 2011; Balogh, 2013; Gyuleva, 2015).

Заняття фізичною культурою в основній групі зумовило достовірне зниження відносної кількості лімфоцитів та підвищення відносної кількості паличкоядерних нейтрофілів (табл.). Тобто посилилися тенденції, відмічені для періоду без навантаження. Згідно з даними літератури (McDowell, 1992; Khaitov, 2001; Hodes, 2014), зниження рівня лімфоцитів на фоні підвищення концентрації гранулоцитарних фракцій вважається типовою ознакою початкових стадій стресової реакції. У нашому випадку компенсація реалізувалася за рахунок молодих паличкоядерних форм, що підтверджує зміни диференціальних процесів у кістковому мозку. При цьому аналізовані показники перебували у межах фізіологічної гомеостатичної норми.

Аналіз показників Т-клітинної ланки імунітету показав, що після занять фізичною культурою в основній групі спостерігається статистично достовірне зниження відносної та абсолютної кількості клітин із фенотипами CD3+, CD5+ та CD4+ на фоні відсутності змін кількості лімфоцитів із фенотипом CD8+. Відсутні також зміни рівня природних кілерів із фенотипом CD16+. Відмічено зниження імунорегуляторного індексу CD4+/CD8+ (табл.). Кластери диференціювання CD3 та CD5 належать до пан-Т-клітинних маркерів, із провідною роллю молекули CD3 у передачі сигналу від Т-клітинного рецептора (ТКР) всередину лімфоцита, що зумовлює стимуляцію процесу його активації та проліферації. Антигени CD4 та CD8 маркують основні регуляторні субпопуляції Т-лімфоцитів: співвідношення хелперних Т-лімфоцитів із фенотипом CD4+ та ефекторних або супресорних Т-лімфоцитів із фенотипом CD8+ визначає силу та напрямок імунної відповіді. Кілерні лімфоцити із фенотипом CD16+ знищують малігнізовані та інфіковані вірусами клітини (Drannik, 1999; Yarilin, 1999; Paul, 2013). Таким чином, хоча клітини із цитотоксичним потенціалом не демонструють вірогідного зниження кількості під час фізичних навантажень, активність імунної відповіді може бути пригніченою за рахунок певного дефіциту Т-хелперів.

Аналіз гуморальної ланки специфічного імунітету виявив, що помірні фізичні навантаження викликають в обстежених з основної групи занять фізичною культурою підвищення відносної кількості В-лімфоцитів, що експресують антиген CD72 та тенденцію до зростання рівня сироваткового IgM (табл.). Молекула CD72 виконує роль ліганду для молекул CD5 на Т-лімфоцитах і забезпечує ефективний контакт В-клітин із хелперними Т-лімфоцитами. Функціонально зрілі В-лімфоцити після активації формують клони антитілопродукувальних плазматичних клітин, тобто класифікуються як клітинні фактори гуморального специфічного імунітету. IgM

вважається одним із перших бар'єрів на шляху інфекції, виконуючи, у той же час, функцію типового антиген-специфічного рецептора В-лімфоцитів. Оскільки у стимуляції синтезу IgM не беруть участі Т-лімфоцити, він вважається резистентним до дії імундепресантів, у тому числі опромінення (Drannik, 1999; Paul, 2013; McMahon, 2014).

Отримані результати узгоджуються з даними літератури, де вказується, що фізичні навантаження пригнічують переважно Т-клітинну ланку імунітету (особливо субпопуляцію Т-хелперів), практично не впливаючи (або навіть розгальмовуючи) гуморальну відповідь на початковому етапі адаптаційного процесу. Це проявляється зниженням кількості Т-лімфоцитів, їх метаболічної та функціональної активності, порушеннями взаємозв'язків між різними субпопуляціями імункомпетентних клітин (Bell, 1998; Tvede, 1989; Pedersen, 2000). Досить суперечливі дані щодо впливу фізичних навантажень на рівень природних кілерів. Наявні сповіщення про відсутність виражених змін, як у нашому випадку, про підвищення чи зниження їх кількості після спортивних змагань (Mackinnon, 1989; Pedersen, 1990; Tvede, 1993).

Хоча ми не відмітили виходу аналізованих показників за межі норми, деякі з них досягали граничних гомеостатичних значень (відносне число лімфоцитів, паличкоядерних і сегментоядерних нейтрофілів, Т-лімфоцитів із фенотипом CD4+ та імунорегуляторний індекс CD4+/CD8+). Виявлені тенденції свідчать: фізичні навантаження для осіб, які зазнали хронічного впливу малих доз іонізуючого випромінювання, потрібно ретельно дозувати із періодичною перевіркою імунного статусу.

Аналіз показників імунної системи через дві доби після занять фізичною культурою показав їх повернення до вихідних значень, що свідчить про задовільну ефективність відновних процесів природної резистентності організму за умов помірних фізичних навантажень.

Вивчення впливу фізичних навантажень на імунну систему осіб із групи ЛФК не виявило статистично вірогідних змін показників (табл.). Спостерігаються лише слабковиражені тенденції закономірностей, відмічених для основної групи мешканців радіаційно забруднених територій. Тобто вправи лікувальної фізичної культури не досягають за інтенсивністю стресового рівня і можуть вважатися потенційно безпечними для природної резистентності організму. У той же час, ми не виявили стимулювального чи модулювального ефекту таких вправ щодо імунної системи.

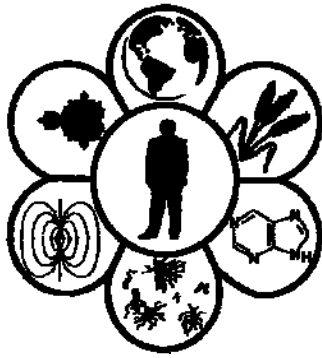
Висновки

У мешканців територій, забруднених радіонуклідами внаслідок аварії на ЧАЕС, помірні навантаження, зумовлені заняттям фізичною культурою, викликають короточасні компенсаторні зміни показників клітинної ланки імунітету у межах гомеостатичної норми, з ефективним та швидким відновленням. Враховуючи наявність імносупресії, зумовленої хронічним впливом малих доз іонізуючого випромінювання, необхідно ретельно підбирати вправи за їх тривалістю та інтенсивністю, віддаючи перевагу комплексам ЛФК.

Бібліографічні посилання

- Agadzhanian, N.A., Dvoenosov, V.G., Ermakov, N.V., 2005. Dvigatel'naya aktivnost i zdorovie [Moving activity and health]. Kazan State University, Kazan (in Russian).
- Baj, Z., Kantorski, J., Majewska, E., Zeman, K., Pokoca, L., Fornalczyk, E., Tchorzewski, H., Sulowska, Z., Lewicki, R., 1994. Immunological status of competitive cyclists before and after the training season. *Int. J. Sports Med.* 15, 319–324.
- Baker, J.E., Moulder, J.E., Hopewell, J.W., 2011. Radiation as a risk factor for cardiovascular disease. *Antioxid. Redox Signal.* 15(7), 1945–1956.
- Balogh, A., Persa, E., Bogdarndi, E.N., Benedek, A., Hegyesi, H., Sarfrarny, 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.
- Bazyka, D.A., Loganovsky, K.N., Ilyenko, I.N., Chumak, S.A., Marazziti, D., Maznichenko, O.L., Kubashko, A.V., 2013. Cellular immunity and telomere length correlate with cognitive dysfunction in clean-up workers of the chernobyl accident. *Clinical Neuropsychiatry* 106, 280–281.
- Bell, E.B., Spartshott, S., Bunce, C., 1998. CD4+ T cell memory, CD45R subsets and the persistence of antigen: A unifying concept. *Immunol. Today* 19, 60–64.
- Chyzyk, V.V., Makarenko, M.V., Romaniuk, V.P., Pedyk, L.A., Fuks, L.P., 2008. Obruntuvannia systemy fazychnykh navantazhen, spriamovanykh na ozdorovlennia y pidvyshchennia pratsezdatsnosti v umovakh prozhyvannia na zabrudnennykh radionuklidamy terytoriiakh [Justification of the exercise system, aimed at health improving and efficiency increasing in terms of living in the contaminated areas]. *Visnyk Volynskogo Natsionalnogo Universytetu imeni Lesi Ukrainky* 17, 51–55 (in Ukrainian).
- Cohen, S., Janicki-Deverts, D., Miller, G.E., 2007. Psychological stress and disease. *J. Am. Med. Assoc.* 298(14), 1685–1687.
- Drannik, G.N., 1999. Klinicheskaja immunologija i allergologija [Clinical immunology and allergology]. Astroprint, Odessa (in Russian).
- Eheman, C.R., Garbe, P., Tuttle, R.M., 2003. Autoimmune thyroid disease associated with environmental thyroidal irradiation. *Thyroid* 13, 453–464.
- 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.
- Grabovskiy, S.S., Grabovska, O.S., 2015. Vplyv imunomoduljatoriv pryrodnoho pochodzennja na koncentraciju protejinykh frakcij ta riven' kortyzolu u plazmi krovi krolykiv za umov stresu [Influence of natural immunomodulators on protein fractions and cortisol content in rabbit blood under stress]. *Biological Bulletin of Bogdan Chmelnytsky Melitopol State Pedagogical University* 5(2), 93–102 (in Ukrainian).
- Gyuleva, I.M., Penkova, K.I., Rupova, I.T., Panova, D.Y., Djounova, J.N., 2015. Assessment of some immune parameters in occupationally exposed nuclear power plants workers: Flowcytometry measurements of T, B, NK and NKT cells. *Dose Response* 13(1), 1–15.
- Hodes, G.A., Pfau, M.L., Leboeuf, M., Golden, S.A., Christoffel, D.J., Bregman, D., 2014. Individual differences in the peripheral immune system promote resilience versus susceptibility to social stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111(45), 16136–16141.
- Horban, D.D., Stanshevska, T.I., 2014. Indyvidual'notypolohichni osoblyvosti reaktyvnosti tkanynnoho krovotoku u divchat-studentok [Individual-typological features of blood flow and vascular reactivity in female students]. *Biological Bulletin of Bogdan Chmelnytsky Melitopol State Pedagogical University* 4(3), 125–131 (in Ukrainian).
- Horban, D.D., Yusupova, O.V., Sobischanska, M.I., Chorna, V.G., 2015. Osoblyvosti mikrocyrkuljacji' krovi u studentiv [Features of students' blood microcirculation]. *Biological Bulletin of Bogdan Chmelnytsky Melitopol State Pedagogical University* 5(3), 122–129 (in Ukrainian).
- 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]. *Rus. Physiol. J.* 87(8), 1060–1072 (in Russian).
- Kryvytskyi, S.Y., Potashniuk, R.Z., 2001. Fyzychi stan studentiv-pershokursnykiv vuziv riznogo profilu, yaki prozhyvaly na terytoriiakh radiatsiinogo zabrudnennia [Physical condition of freshmen in different universities, who lived in areas of radioactive contamination]. *Pedagogika, Psykhologija ta Medyko-Biologichni Problemy Fyzychnogo Vykhovannia i Sportu* 13, 16–21 (in Ukrainian).
- Mackinnon, L.T., 1989. Exercise and natural killer cells: What is the relationship? *Sports Med.* 7, 141–149.
- 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.
- McDowell, S.L., Hughes, R.A., Hughes, R.J., Housh, D.J., Housh, T.J., Johnson, G.O., 1992. The effect of exhaustive exercise on salivary immunoglobulin A. *J. Sports. Med. Physical. Fitness.* 32, 412–415.
- Paul, W., 2013. *Fundamental immunology*. 7th ed. Wolters Kluwer Health / Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Pedersen, B.K., Hoffman-Goetz, L., 2000. Exercise and the immune system: Regulation, integration, and adaptation. *Physiol. Rev.* 80(3), 1055–1081.
- Pedersen, B.K., Tvede, N., Klarlund, K., Christensen, L.D., Hansen, F.R., Galbo, H., Kharazmi, A., Halkjaerkristensen, J., 1990. Indomethacin *in vitro* and *in vivo* abolishes post-exercise suppression of natural killer cell activity in peripheral blood. *Int. J. Sports Med.* 11, 127–131.
- Pylnenkiy, V.V., 2006. Organizatsiyno-metodychni osnovy ozdorovchogo trenuvannia studentiv z nyzkym rivnem somatychnogo zdorovia [Organizational and methodological foundations of health training of students with low level of physical health]. Lviv (in Ukrainian).
- 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.
- Suzdalnitskiy, R.S., Levando, V.A., 2003. New approaches for understanding of sport stress immunodeficiency [Novye podkhody k ponimaniyu sportivnykh stressovykh immunodefitsitov]. *Teoriya i Praktika Fizicheskoy Kultury* 1, 26–31 (in Russian).
- Telnov, V.I., Zhuntova, G.V., 2002. Genotipicheskij analiz biokhimicheskogo statusa u ljudej, obluchennyh v znachitel'nyh dozah [Genotypic analysis of biochemical status of people received radioactive irradiation]. *Voprosy Medicinskoj Himii.* 44(5), 56–60 (in Russian).
- Tvede, N., Heilmann, C., Halkjaer Kristensen, J., Pedersen, B.K., 1989. Mechanisms of B-lymphocyte suppression induced by acute physical exercise. *J. Clin. Lab. Immunol.* 30, 169–173.
- Tvede, N., Kappel, M., Halkjaer Kristensen, J., Galbo, H., Pedersen, B.K., 1993. The effect of light, moderate and severe bicycle exercise on lymphocyte subsets, natural and lymphokine activated killer cells, lymphocyte proliferative response and interleukin-2 production. *Int. J. Sports Med.* 14, 275–282.
- Yarilin, A.A., 1999. *Osnovy immunologii* [Immunology fundamentals]. Medicine, Moscow (in Russian).

Надійшла до редколегії 23.03.2016



УДК 636.034:616.61-089

Біотехнологічна характеристика катетеризованих сечовивідних шляхів як проточної системи

В.П. Жалко-Титаренко¹, Е.О. Синетар¹, С.І. Савощенко²

¹ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л.В. Громашевського НАМН України», Київ, Україна
²Київська міська клінічна лікарня № 6, Київ, Україна

Виникнення катетер-асоційованих інфекцій сечовивідних шляхів відбувається згідно із закономірностями, притаманними проточним системам. На моделі *Candida albicans* (С.Р. Robin) Berkhout, 1923 доведено, що в сечі бактерії розмножуються швидше, ніж на середовищі Сабуро. Один із факторів виникнення катетер-асоційованих інфекцій сечовивідних шляхів – наявність сталого залишку сечі навколо голівки катетера в сечовому міхурі, де мікроорганізми отримують достатні умови для розмноження та не можуть бути еліміновані протоком сечі. У випадку потрапляння та розмноження збудника у сечовий міхур, останній стає резервуаром інфекції на зразок «маточної культури», із поступовим оброшенням катетера дріжджоподібними грибами *C. albicans*. Отримані дані свідчать, що механізм зміцнення катетер-асоційованих інфекцій сечовивідних шляхів – утворення біоплівки мікроорганізмами навколо голівки катетера та на його поверхнях. Пропонується подальше удосконалення конструкції катетерів та сечоприймача у такий спосіб, щоб випорожнення сечового міхура було повним, а уретральний рефлюкс був унеможливлений.

Ключові слова: *Candida albicans*; катетер-асоційовані інфекції; силіконовий катетер; адгезія; біоплівка

Biotechnological characteristic of catheterized urinary tract as flow system

V.P. Zhalko-Tytarenko¹, E.A. Synetar¹, S.I. Savoschenko²

¹State Institution “L.V. Gromashevsky Institute of Epidemiology and Infectious Diseases of NAMS of Ukraine”, Kyiv, Ukraine
²Kyiv City Clinical Hospital N 6, Kyiv, Ukraine

It is well known that the ureter of mammals and man works as a flow system that normally remains uninfected. In biotechnology flow systems are used to produce microbial mass on orders greater than when grown in laboratory and industrial periodic cultures. Therefore, these systems are used in the microbiological industry. But there in a flow systems one can observe a growth in microbial populations, the patterns of which can be fruitful in studying the process of catheter-associated urinary tract infections. The main factors are the speed of propagation and speed of flow, and their variation in conditions of the catheterized urinary tract, which determines the magnification factor of microbial infection. In this lies the general biological need to study them from a biotechnology perspective. Hence the question arises – why are there changes in the flow system of the urinary tract during catheterization, which contribute to the reproduction of opportunistic microorganisms, as a factor of infection? In the study of the biological properties of agents of catheter-associated infections this issue has not attracted sufficient attention from researchers. In view of the above, the purpose of our study was to establish patterns of population growth of agents of urinary tract infections on the model of the yeast fungus species *Candida albicans* (C.P. Robin) Berkhout, 1923 in the catheterized human urinary tract, treated as a flow system. The results of the research show that the emergence of catheter-associated urinary tract infections is a regularity inherent throughout the flow system. It was proved that with the model *C. albicans*, bacteria in urine multiply faster than in the medium Saburo. The study established that one of the factors leading to catheter-associated urinary tract infections is the persistent presence of urine deposits around the head of the catheter in the bladder, which provides bacteria with sufficient conditions for reproduction and where bacteria cannot be eliminated by urine flow. When the pathogen enters and reproduces in the bladder, the latter is a

ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л.В. Громашевського НАМН України», вул. 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

Київська міська клінічна лікарня № 6, пр. К. Комарова, 3, Київ, 03680, Україна
Kyiv City Clinical Hospital N 6, Komarov Ave., 3, Kyiv, 03680, Ukraine

reservoir of infection like a "royal culture", with a gradual overgrowth in the catheter of yeast fungi of the species *C. albicans*. These data suggest that the mechanism of strengthening catheter-associated urinary tract infections are the formation of biofilms by microorganisms around the catheter head and on its surfaces. It is recommended to further improve the design of urinal catheters in such a way that ensures the complete emptying of the bladder and avoidance of urethral reflux.

Keywords: *Candida albicans*; catheter-associated infections; silicone catheter; adhesion; biofilms

Вступ

За даними світової літератури (Kondratjuk, 2009; Sernjak et al., 2005; Jayasukhbhai et al., 2015), катетер-асоційовані інфекції сечовивідних шляхів (КАІСВШ) належать до найпоширеніших нозокоміальних інфекцій. Щоденний ризик розвитку катетер-асоційованої інфекції складає 3–6%. Дослідники різних країн світу (Thomas et al., 2010; Lo et al., 2014) провели глобальні дослідження частоти та ролі сечових катетерів у розвитку нозокоміальних катетер-асоційованих інфекцій сечовивідних шляхів, а також розробки методів їх профілактики та ефективного лікування. Однак використання різних заходів профілактики та лікування КАІСВШ не сприяє запобіганню інфекцій сечовивідних шляхів. Оскільки патогенез КАІСВШ відбувається двома шляхами: екстралюмінарий (під час уведення катетера, або за рахунок власної мікрофлори шкіри хворого) та інтралюмінарий (використання негерметичної дренажної системи, Sernjak et al. (2005)). Екстралюмінарий шлях контамінації катетерів має більше значення у жінок у зв'язку з такими анатомічними особливостями, як коротка уретра та близькість анального отвору. У чоловіків основний шлях проникнення бактерій – просвіт катетера. Бактерії проникають у сечоприймач, мігрують у дренажну трубку, катетер і сечовий міхур. У 20% пацієнтів сечові шляхи колонізуються відразу після катетеризації сечового міхура. Бактеріурія спостерігається у жінок значно частіше (70–80%), ніж у чоловіків (20–30%) (Thomas et al., 2010). Доведено (Al-Hazmi, 2015; Mladenovic et al., 2015) значущий зв'язок між швидкістю розвитку інфекцій сечовивідних шляхів та тривалістю катетеризації.

Етіологічними чинниками у розвитку КАІСВШ є *Escherichia coli*, *Enterococcus sp.*, *Candida sp.*, *Klebsiella sp.* і *Pseudomonas aeruginosa*. Останніми роками дріжджоподібні гриби роду *Candida* досить часто беруть участь у різних мікробних асоціаціях, є «маркерами» запальних захворювань сечостатевого тракту (Douglas, 2003; Coogan et al., 2006; Zacheslavskij, 2006; Ketten et al., 2014).

Ми не торкатимемося медичних аспектів проблеми, а залишимо за собою лише мікробіологічний аспект питання, оскільки він відіграє роль етіологічного фактора. Як свідчить наведений огляд літератури, мікробіологічні підходи переважно скеровані на дослідження біологічних властивостей і видового складу мікроорганізмів при КАІСВШ. Залишається невизначеним головне: що змінюється у такій досконалій системі як сечовідільна, завдяки чому в ній набуває розвитку КАІСВШ?

Нашу увагу привернуло те, що сечовід ссавців і людини працює як проточна система, яка в нормі залишається неінфікованою. Як відомо, проточні системи у біотехнології використовуються для одержання мікробної маси, на порядок більшої, ніж за умов вирощування в лабораторних і промислових періодичних культурах. Тому такі системи використовуються у мікробіологічній промисловості (Pert, 1978).

Як усі технічні засоби, вони забезпечені сталими конструкціями та контрольним обладнанням, технологічний процес у них підтримується на відпрацьованих сталих критеріях і процесах. Тому механічне перенесення їх на живі організми може викликати заперечення. Але у проточних системах відбувається ріст мікробних популяцій, закономірності якого можуть бути плідними під час вивчення процесу КАІСВШ. Основні з них, на нашу думку, – швидкість розмноження та швидкість потоку, їх варіювання в умовах людського організму. У цьому покладена загальнобіологічна необхідність вивчення їх із біотехнологічного погляду. У вивченні біологічних властивостей збудників КАІСВШ у світовій літературі не враховано провідні характеристики: здатність і швидкість розмноження мікроорганізмів у сечі, конфігурація сечовивідної системи, те, що сеча перебуває у русі (безперервно протікає).

У зв'язку з вищевикладеним, мета нашої статті – встановити закономірності росту популяції збудника КАІСВШ на моделі дріжджоподібних грибів *Candida albicans* (С.Р. Robin) Berkhout, 1923 у катетеризованих сечовивідних шляхах людини як проточної системи. Поставлена мета вимагає відповіді на три питання:

- 1) чи може бути сеча поживним середовищем для дріжджоподібних грибів роду *Candida* як моделі;
- 2) які біотехнологічні параметри характеризують катетеризовану проточну сечовивідну систему людини;
- 3) яке місце та яку функцію можуть відігравати процеси біоплівкоутворення у разі виникнення КАІСВШ у катетеризованій сечовивідній системі?

Матеріал і методи досліджень

Завись культури *C. albicans* 11 готували у 5 мл бульйонного середовища Сабуро і в 5 мл стерильної сечі (рН = 6,5) у концентрації 10^3 кл/мл в обох випадках. Пробірки із суспензіями інкубували у термостаті за 37 °С та через кожні дві години відбирали по 0,1 мл суспензії, із подальшим засіванням на агаризоване середовище Сабуро. Через одну-дві доби підраховували кількість колоній, які виростили на середовищі. Для обрахунку швидкості розмноження мікроорганізмів та часу генерації (Egorov, 1989; Pechurkin, 1978; Zhdan-Pushkina, 1983) використано формулу:

$$g = \frac{t \lg 2}{\lg n_t - \lg n_0},$$

де n_0 – кількість КВО на початку розмноження, n_t – кількість КВО у процесі розмноження на момент часу t , g – час генерації. Для визначення логарифмічного показника швидкості розмноження використано співвідношення:

$$\mu_{\max} = \frac{\lg 2}{g},$$

де μ_{\max} – логарифмічний показник швидкості розмноження.

Вивчення динаміки утворення біоплівки проводили з використанням клінічного штаму *C. albicans* 11, який

виділено із сечі хворого відділення реанімації та інтенсивної терапії (ВРІТ) та ідентифіковано загальноприйнятими методами в ДУ «Інститут нейрохірургії ім. А.П. Ромоданова НАМН України». Штам *C. albicans*, за даними проведених нами досліджень, характеризувався високою адгезивністю за значенням показника індексу адгезивності мікроорганізмів (ІАМ складав $8,3 \pm 3,0$). За результатами дослідження чутливості штаму до чотирьох протигрибкових препаратів із використанням автоматичного аналізатора Vitek 2TM – Compact 15 та карт AST-YSO1 (виробництва bioMérieux, Франція) встановлено, що штам чутливий до флюконазолу, амфотерицину В, вариконазолу та стійкий до флуцитозину.

Для дослідження біоплівкоутворення *C. albicans* фрагменти силіконового катетера (виробник Jiangsu Suyun Medical Materials Co., КНР) занурювали у вертикальному положенні у попередньо приготовану на бульйоні Сабуро завись *C. albicans* за концентрації $1,5 \cdot 10^8$ кл./мл, яку встановлювали за допомогою денситометра Densimat (bioMérieux, Франція) і набору стандартів оптичної густини бактеріальних зависей McFarland. Після інкубації зазначених вище фрагментів у термостаті за 37°C через 24, 48, 72 години їх фіксували за модифікованою нами методикою (Galkin, 2013). Досліджувані зразки промивали дистильованою водою, фарбували генціанвіолетом, тричі промивали у дистильованій воді та фіксували протягом 30 хвилин 96% етиловим спиртом. Перед вміщенням у камеру сканувального електронного мікроскопа із високим вакуумом ($6 \cdot 10^{-2}$ Па) зразки висушували для фіксування мікроорганізмів на поверхні фрагментів досліджуваного катетера.

Результати та їх обговорення

Для порівняння ростових якостей сечі та середовища відтворено початкову стадію росту *C. albicans*, яка охоплювала латентний період і початок логарифмічної фази, щоб можна було визначити максимальний показник швидкості розмноження. Результати порівняння швидкості росту в сечі та у середовищі Сабуро показали, що сеча – більш сприятливе середовище для розмноження дріжджоподібних грибів роду *Candida*, ніж середовище Сабуро. Адже на сечі латентна фаза триває лише одну годину, у той час як на середовищі Сабуро – чотири години. Також і швидкість розмноження грибів роду *Candida*, у сечі вища (0,4771 проти 0,4064 на Сабуро), а час генерації на сечі коротший (37,8 проти 44,4 хв на середовищі Сабуро). Отримані результати показують, що сеча – середовище швидкого розмноження дріжджоподібних грибів, вона може зумовлювати розвиток кандидозної інфекції. Звідси впливає необхідність установлення характеристик сечовивідного тракту як проточної системи.

Сечовід складається із тонких трубок (сечоводів і уретри) з двома розширеннями – лоханок і сечового міхура. У лоханки потрапляє стерильна сеча з нирок. У випадку катетеризації місце уретри займає катетер і додається третє розширення – сечоприймач. Зрозуміло, що у розширеннях швидкість потоку зменшується, а у трубках підвищується.

Кожний із двох людських сечоводів являє собою трубку з максимальним внутрішнім діаметром у 0,3–0,4 см за довжини 25–30 см (Abrams, 2006; Blaivas, 2007). Таким

чином, максимальний об'єм сечовода не перевищує $3,8 \text{ см}^3$. Якщо за добу через кожний із двох сечоводів проходить по 750 см^3 сечі (сумарно – 1 500 мл), то швидкість потоку, як показує розрахунок, має становити 199,0 сечоводних об'ємів на добу, або 8,29 на годину (0,1382 об'ємів за хвилину).

Насамперед з'ясуємо, чи може стати сечовід осередком розмноження та спричинити розвиток КАІСВШ. Для цього визначимо, який об'єм сечі пройде через сечовід за час генерації *C. albicans*. Розрахунок показує, що добуток часу генерації (37,8 хв) на число об'ємів потоку за хвилину (0,1382 мл/хв) становить 5,22 мл, що значно перевищує максимальний об'єм сечоводу. Із цього випливає, що клітина, яка поділяється, не має шансів затриматись у сечоводі та спричинити розвиток КАІСВШ. Але далі сеча потрапляє до другого розширення – сечового міхура, в якому рух сечі уповільнюється. У нормі сечовий міхур накопичує в інтервалах сечовипорожнення понад 100–200 мл сечі. Через зупинку витоку, у випадку потрапляння мікроорганізмів, у ньому може розпочинатись інтенсивне розмноження мікроорганізмів і за 2–3 години їх концентрація здатна підвищитись у 4–6 разів (кожну годину більше ніж удвічі). Проте в нормі це не відбувається через те, що уретра вислана слизовою оболонкою та має досконалу систему закриття витоку.

Катетеризація уретри зменшує кількість сечі у сечовому міхурі, але не здатна зупинити розмноження мікроорганізмів через недосконалу конструкцію сучасних катетерів. Особливість її полягає в тому, що на відстані 2–3 см від голівки вони мають наливну «помпу», яка фіксує катетер у сечовому міхурі та не дає йому вислизнути. У порожнині сечового міхура голівка катетера височить на відстані 5 см.

Під час випорожнення сечового міхура через катетер стінки його облягають голівку з бічним отвором, але при цьому навколо неї неодмінно утворюється паразитна конусоподібна порожнина, яка, за нашими підрахунками, складає щонайменше $4,1 \text{ см}^3$. На жаль, ця величина не може врахувати складчастості внутрішньої поверхні сечового міхура, від чого зазначена порожнина насправді більша. Певне збільшення додатково виникає за рахунок того, що катетер має внутрішній діаметр, такий як у сечовода, але сечоводів два. Отже, у катетеризованому сечовому міхурі завжди існує невеличкий підпір сечі. Цей підпір може зрівноважуватись лише за рахунок додаткового розширення конусоподібної порожнини сечового міхура, справжній обсяг якої важко визначити. За всіх обставин це забезпечує залишок достатньої кількості сечі (приблизно 5–10 мл), яка може стати осередком розмноження мікроорганізмів у разі їх потрапляння туди. Особливість конусоподібної порожнини полягає у тому, що немає іншого шляху для витоку сечі, крім як угору до однобічного отвору на голівці катетера. Цей отвір не спроможний до кінця випорожнити залишок сечі, оцінений нами у 5–10 мл. Свіжі порції сечі потрапляють до паразитної конусоподібної порожнини збоку та низу. Цих умов достатньо, щоб у разі контамінації за декілька годин у конусоподібній порожнині розмножилась достатня кількість мікроорганізмів, здатна інфікувати сечу, яка протікає в катетер, контамінувати його внутрішню поверхню та сечоприймач. Із біотехнологічного погляду кологоловковий

залишок сечі в конусоподібній порожнині відіграє функцію «маточної культури» для розмноження мікроорганізмів. При цьому колололівкова «маточна культура» постійно отримує надлишок стерильної сечі, й у тій же кількості через бічний отвір у голівці випускає вже інфіковану. У таких випадках катетеризована сечовивідна система перетворюється на реальну проточну систему, тому що стабільно підживлюється сечею та «маточною культурою» з конусоподібної порожнини. Вихід із цієї проблеми полягає лише у створенні іншої конструкції голівки катетера, яка б повністю елімінувала наявність залишкової кількості сечі. Тривале протікання інфікованої сечі спричинює адгезію мікроорганізмів, із подальшим утворенням біоплівки. Про це свідчать проведені нами досліді.

Третє розширення – сечоприймач, який поєднано з катетером додатковим патрубком. Ємність сечоприймача може сягати добової норми сечовиділення. У нижній частині сечоприймача вмонтоване зливне пристосування, яке дозволяє видалити сечу, не порушуючи стерильності системи. Хоча за різних нештатних обставин порушення стерильності може відбутися через неохайність хворих, помилки асептичної процедури випорожнення сечоприймача. В обох випадках контамінація викликає розмноження мікроорганізмів у сечоприймачі. Це не загрожувало б хворому, якби існував додатковий пристрій, який виключав би рефлюкс (зворотний потік) у напрямку другого розширення – колололівкового простору. На жаль, такий пристрій у катетері не передбачений, що є другим конструктивним недоліком сучасних катетерних систем.

Проведені нами дослідження показали, що культура *C. albicans*, через високий рівень адгезивності, сприяє утворенню біоплівки також у разі вирощування на середовищі Сабура (рис. 1). Оскільки адгезія, як правило, відбувається за рахунок екзополімерних субстанцій, вона достатньо міцна, витримує домікроскопічну обробку.

На поверхнях силіконового катетера через 24 години інкубації бульйонної культури дріжджоподібних грибів *C. albicans* на середовищі Сабура мікроорганізми адгезу-

вались у вигляді поодиноких клітин (рис. 1), а також спостерігався їх подальший поділ у вигляді різних за кількістю щільно розташованих клітинних скупчень, названих нами «мікроколоніями». Через те, що експозиція культури та фрагментів катетера тривала 24 години, на фотографії спостерігаються різні за кількістю клітин мікроколонії *C. albicans*, що відбивають різні стадії їх походження. Таким чином, на поверхні силіконового катетера вже через 24 години *in vitro* формуються основні структурні одиниці біоплівки – мікроколонії *C. albicans*, які складаються із щільно об'єднаних дріжджоподібних клітин.

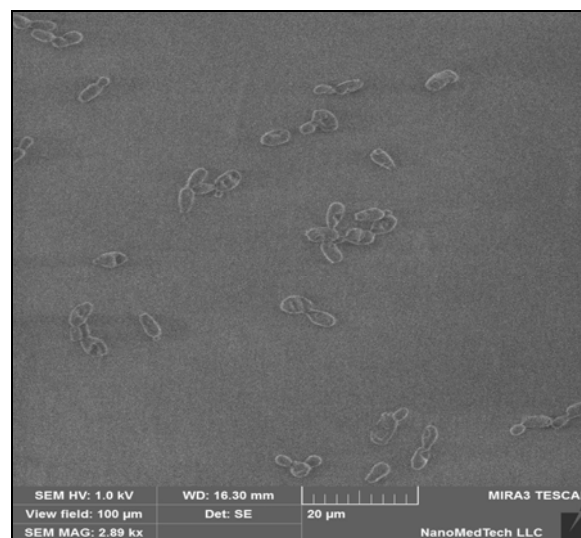


Рис. 1. Формування мікроколоній *C. albicans* на поверхні силіконового катетера *in vitro* протягом 24 годин: помітні адгезовані клітин *C. albicans*, поряд з якими угруповання клітин – мікроколонії

Подальша інкубація фрагментів силіконового катетера протягом 48 годин зумовлювала об'єднання мікроколоній *C. albicans* і нарощування їх у висоту, тобто утворення нашарувань (рис. 2).

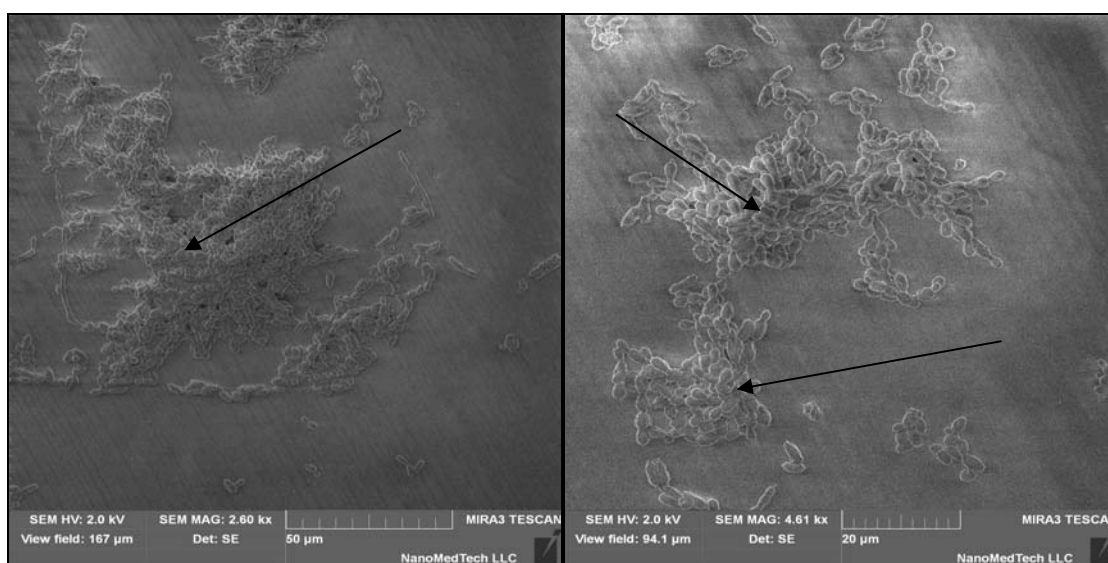


Рис. 2. Формування агломератів *C. albicans* на поверхні силіконового катетера *in vitro* протягом 48 годин: стрілками помічені агломерати

Такі структури ми назвали агломератами. У деяких ділянках між агломератами залишалися окремі мікроколонії *C. albicans*, що свідчить про тривалість процесів, які споглядалися на першу добу. Таким чином, агломерати характеризувались поділом клітин *C. albicans* з утворенням мікроколоній, що передувало йому (рис. 2). На 72-гу годину інкубації фрагментів силіконового катетера ми спостерігали аутоліз клітин *C. albicans* (рис. 3).

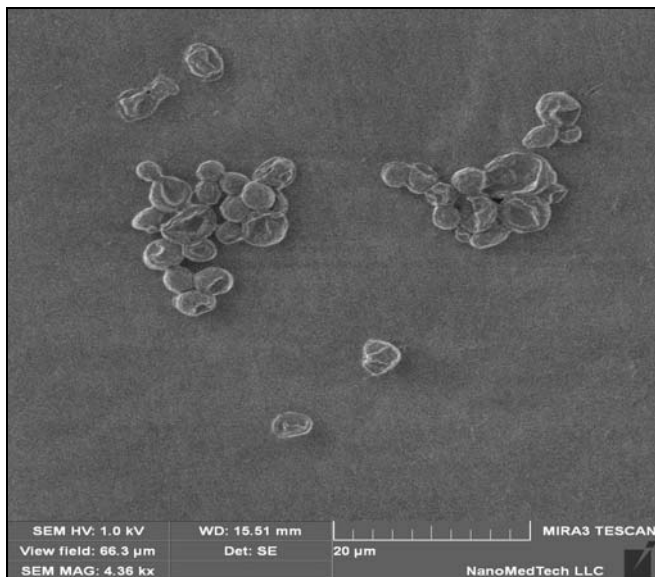


Рис. 3. Аутоліз клітин *C. albicans* на поверхні силіконового катетера *in vitro* протягом 72 годин

Це свідчить, що біоплівкоутворення дріжджоподібних грибів *C. albicans* проходить усі відомі стадії росту популяцій мікроорганізмів. Отже, за допомогою сканувальної електронної мікроскопії встановлено послідовні фази формування біоплівки дріжджоподібними грибами *C. albicans* на поверхнях фрагментів медичних катетерів. Цей процес характеризується чотирма етапами: адгезія клітин до поверхні, утворення мікроколоній клітин – колонізація поверхні, формування агломератів, аутоліз клітин *C. albicans*. Якщо відбулася контамінація системи під час катетеризації сечового міхура, провідною ланкою розмноження мікроорганізмів стає сечовий залишок у паразитній конусоподібній порожнині. Тільки за цієї умови може розпочатися біоплівковий ріст, на зовнішній поверхні голівки катетера та «помпи», а також на його внутрішній поверхні. Ці два чинники (біоплівка та паразитна конусоподібна порожнина), на нашу думку, зумовлюють прогресуючий ріст популяції мікробного чинника, чим власне і є КАІСВІШ.

У медичній літературі причину КАІСВІШ вбачають в утриманні у сечовивідних шляхах чужорідного тіла – катетера. Будь-яка катетеризація навіть із дотриманням усіх правил асептики та антисептики небезпечна, оскільки це вторгнення у внутрішнє середовище. Вважається, що за рахунок контакту чужорідного тіла із тканинами, перш за все, відбувається активна адгезія бактеріальних клітин на поверхні катетера. Крім того, може виникнути дефект слизової оболонки у вигляді ерозії та можлива бактеріальна інвазія, яка у подальшому спричинює розвиток інфекції сечовивідних шляхів. У літературі наводяться інші клінічно важливі наслідки катетеризації. Із цим

важко не погодитись, але виток та динаміка розвитку розмноження контамінувальних мікроорганізмів, на нашу думку, відбуваються саме через те, що катетеризований сечовід перетворюється на проточну систему, яка вперше розглянута та змодельована у наведених матеріалах.

Висновки

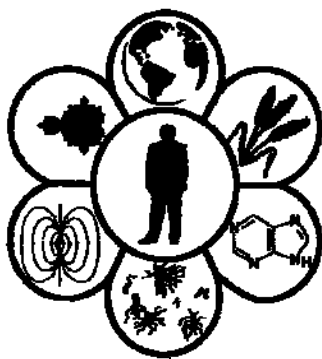
Уперше доведено, що виникнення катетер-асоційованих інфекцій сечовивідних шляхів (КАІСВІШ) відбувається згідно із закономірностями, притаманними проточним системам. Установлено, що одна із причин розвитку КАІСВІШ – це потрапляння збудників у сечовивідну систему за рахунок уретрального рефлюксу з контамінованого мікроорганізмами сечоприймача. Катетер-асоційовані інфекції сечовивідних шляхів підтримуються за рахунок того, що у сталому залишку сечі довкола голівки катетера в сечовому міхурі мікроорганізми отримують достатні умови для розмноження та не можуть бути еліміновані протоком сечі. Механізм зміцнення катетер-асоційованих інфекцій сечовивідних шляхів – утворення біоплівок мікроорганізмами навколо голівки катетера та на його поверхнях. Ростовий субстрат за умов контамінації сечовивідних шляхів – сеча, яка за своїми ростовими параметрами перевершує загальноживане штучне живильне середовище Сабуро. Конструкція сучасних катетерів має бути вдосконалена таким чином, щоб випороження сечового міхура було повним, а уретральний рефлюкс був унеможливлений.

Бібліографічні посилання

- Abrams, P. (ed.), 2006. Urodynamics. 3rd ed. Springer Verlag, London.
- Al-Hazmi, H., 2015. Role of duration of catheterization and length of hospital stay on the rate of catheter-related hospital-acquired urinary tract infections. Res. Rep. Urol. 7, 41–47.
- Blaivas, G.J., Chancellor, M.B., Verhaaren, M.R., Weiss, J. (eds.), 2007. Atlas of urodynamics. Wiley-Blackwell.
- Coogan, M.M., Fidel, P.L., Komesu, M.C., 2006. Candida and mycotic infections. Adv. Dent. Res. 19, 130–138.
- Douglas, L.J., 2003. Candida biofilms and their role in infection. Trends Microbiol. 11(1), 30–36.
- Egorov, N.S., 1989. Promyshlennaja mikrobiologija [Industrial microbiology]. Vysshaja Shkola, Moscow (in Russian).
- Galkin, M.B., 2013. Formuvannya bioplivky *Pseudomonas aeruginosa* za prysutnosti vismutovyh 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).
- Golovko, S.V., 2003. Prichyny vznikonvenija uretral'nih refljuksov [Causes of ureteral reflux]. Suchasni Aspekti Vijs'kovoyi Medicyny 8, 98–101 (in Russian).
- Hooton, T.M., Bradley, S.F., Cardenas, D.D., Colgan, R., Geerlings, S.E., Rice, J.C., 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.
- Huang, W.C., Wann, S.R., Lin, S.L., Kunin, C.M., Kung, M.H., Lin, C.H., Hsu, C.W., Liu, C.P., Lee, S.S., Liu, Y.C., Lai, K.H., Lin, T.W., 2004. Catheter-associated urinary tract infections in intensive care units can be reduced by prompting

- physicians to remove unnecessary catheters. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 25(11), 974–978.
- Jayasukhbhai, D.M., Komal, D.P., Vegad, M.M., 2015. Study of incidence and risk factors of urinary tract infection in catheterised patients admitted at tertiary care hospital. *Int. J. Res. Med. Sci.* 3(12), 3808–3811.
- Keten, D., Aktas, F., Guzel, T.O., Dizbay, M., Kalkanci, A., Biter, G., Keten, H.S., 2014. Catheter-associated urinary tract infections in intensive care units at a university hospital in Turkey. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* 14(4), 227–233.
- Kondratjuk, V.M., 2009. Mikrobiologichne obgruntuvannja dejakih sposobiv profilaktiki gnijno-zapal'nih uskladnen', pov'jazanih z vikoristannjam kateteriv [Microbiological justify some ways to prevent inflammatory complications associated with the use of catheters]. *Institut Mikrobiologiji ta Imunologiji im. I.I. Mechnikova AMN Ukrainy, Kharkiv* (in Ukrainian).
- Lo, J., Lange, D., Chew, H.B., 2014. Ureteral stents and foley catheters-associated urinary tract infections: The role of coatings and materials in infection prevention. *Antibiotics* 3(1), 87–97.
- Mladenovic, J., Veljovic, M., Udovicic, I., Lazic, S., Jadranin, Z., Segrt, Z., Ristic, P., Šuljagic, V., 2015. Catheter-associated urinary tract infection in a surgical intensive care unit. *Vojnosanitetski Pregled* 72(10), 883–888.
- Pechurkin, N.S., 1978. Populjacionnaja mikrobiologija [Population microbiology]. Nauka, Novosibirsk (in Russian).
- Pert, S.D., 1978. Osnovy kul'tivirovanija mikroorganizmov i kletok [Basics of microorganisms and cells cultivation]. Mir, Moscow (in Russian).
- Sernjak, J.P., Fukszon, A.S., Roshhyn, J.V., Kryshtopa, M.V., 2005. Problema kateter-assocyyovannyh infekcyj 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 (Men's Health)* 2, 40–44 (in Russian).
- Su-Pen, Y., Yin-Yin, C., Han-Shui, H., Fu-Der, W., Liang-Yu, C., Chang-Phone, F., 2013. A risk factor analysis of health-care-associated fungal infections in an intensive care unit: A retrospective cohort study. *BMC Infect. Dis.* 13(1), 10.
- Zacheslavs'kij, O.M., 2006. Urazhennja organiv sechostatevoji sistemy gribami rodu *Candida* u cholovikiv i racional'nij vibir antimikotikiv [The defeat of the genitourinary *Candida* in men and rational choice antimycotics]. *Odes'kij Medichnij Zhurnal* 6, 34–37 (in Ukrainian).
- Zhdan-Pushkina, S.M., 1983. Osnovy rosta kul'tur mikroorganizmov [Fundamentals of microorganisms crop growth]. Leningrad (in Russian).

Надійшла до редколегії 28.02.2016



УДК 543.635.24:616.15-006

Молекулярно-клеточные механизмы изменения спектра заряженной фракции свободных олигосахаридов плазмы крови при миелопролиферативных заболеваниях

И.Ю. Письменецкая¹, Т.Д. Баттерс²

¹ГУ «Днепропетровская государственная медицинская академия МОЗ Украины», Днепропетровск, Украина

²Институт гликобиологии Оксфордского университета, Оксфорд, Великобритания

Свободные олигосахариды, не связанные с белками или липидами аналоги гликанов гликопротеинов и гликолипидов, появляются как побочные продукты эндоплазматического синтеза, клеточного контроля фолдинга и лизосомально-эндосомального распада гликоконъюгатов. В зависимости от процесса образования они могут быть нейтральными или отрицательно заряженными. Заряженные олигосахариды появляются при распаде гликоконъюгатов в лизосомно-эндосомной системе и являются естественными субстратами лизосомальной сиалидазы-1. Образуясь внутри клеток, часть из них попадает в межклеточное пространство, а затем в кровь и мочу. Ранее авторами было установлено, что ВЭЖХ-спектр заряженных свободных олигосахаридов плазмы крови специфически изменяется при хронических и острых миелопролиферативных заболеваниях. Задачей данной работы стал анализ молекулярно-клеточных механизмов этих изменений. Показано, что они связаны с изменением активности лизосомальной нейраминидазы-1 и интенсивности экзоцитоза секретирующих лизосом. Анализ заряженной (кислой) фракции свободных олигосахаридов плазмы крови может стать чувствительным и надежным инструментом изучения состояния лизосом пациентов при внедрении персонализированного лечения и инновационной терапии.

Ключевые слова: свободные олигосахариды; ВЭЖХ-спектры; плазма крови человека; нейраминидаза-1

Molecular and cellular mechanisms of profile changes of charged blood plasma free oligosaccharides in myeloproliferative disorders

I.U. Pismenetskaya¹, T.D. Butters²

¹SI Dnipropetrovsk Medical Academy, Dnipropetrovsk, Ukraine

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

Free oligosaccharides (FOS) are unbound to proteins or lipids structural analogs of their glycans. FOS appear as by-products of endoplasmic reticulum synthesis, cell control folding with endoplasmic reticulum-associated degradation and lysosomal/endosomal breakdown of glycoconjugates. They may be either neutral or negatively charged depending on the way of their formation. Charged FOS appear during degradation of glycoconjugates in the lysosomal/endosomal system and are natural substrates for lysosomal sialidase-1. FOS are formed inside the cell but some of them can get into the extracellular space, and then into the blood and urine, where both neutral and charged structures were found. Secretion of charged FOS outside of the cell is most likely to be caused by the lysosomal exocytosis. The activity of neuraminidase-1 is known to be connected with the intensity of the lysosomal exocytosis. In our previous studies, it was found that HPLC-profiles of charged FOS were specifically changed in acute and chronic myeloproliferative blood disorders. The objective of this work was to analyze the molecular and cellular mechanisms of these changes and to test the hypothesis of their association with the activity change of lysosomal neuraminidase-1. Plasma samples of patients with acute and chronic leukaemia – polycythaemia vera, chronic idiopathic myelofibrosis, hypoplastic anaemia, myelodysplastic syndrome with transformation, acute lymphatic and acute myelomonocytic

ГУ «Днепропетровская государственная медицинская академия МОЗ Украины», пл. Дзержинского, 9, Днепропетровск, 49044, Украина
SE "Dnipropetrovsk Medical Academy of Health Ministry of Ukraine", Dzerzhinsky str., 9, Dnipropetrovsk, 49044, Ukraine
Tel.: +38-050-046-82-87. E-mail: ip01589@gmail.com

Институт гликобиологии Оксфордского университета, Оксфорд, Великобритания
Oxford Glycobiology Institute, University of Oxford, Oxford, OX13QU, UK

leukaemia – were collected for investigation. Plasma samples of practically healthy volunteers were obtained and used for comparison. After plasma deproteinization and FOS purification the oligosaccharides were labelled with anthranilic acid (2-AA), separated into the neutral and charged fractions with QAE Sephadex (Q25-120) chromatography and analysed using high-performance liquid chromatography (HPLC). Glucose unit values were determined following comparison with a 2-AA-labelled glucose oligomer ladder derived from a partial hydrolysate of dextran as an external standard. The data were collected and processed using Empower software. The charged FOS were digested with the sialidase from *Arthrobacter ureafaciens*. 2-AA – labelled free oligosaccharides from transferrin were used as an external standard for the structure decoding. In this paper, the changes in neuraminidase-1 activity was first demonstrated on natural substrates, free oligosaccharides, *in vivo*. Chromatographic profiles of charged plasma FOS of patients with acute and chronic hematological malignancies revealed decreasing of neuraminidase-1 activity and increasing of the lysosomal exocytosis. Thus, chromatographic profiles of charged plasma FOS appeared to be a sensitive parameter of the lysosomal/endosomal status in normal or pathological states and to open up new prospects for their applications to the development of anti-cancer drugs designed to block the work of the lysosomal/endosomal system and monitoring of their action.

Keywords: free oligosaccharides; HPLC- profiles; human plasma; neuraminidase-1

Введение

Свободные олигосахариды, не связанные с белками или липидами аналоги гликанов, гликопротеинов и гликолипидов, появляются как побочные продукты эндоплазматического синтеза, клеточного контроля фолдинга и лизосомально-эндосомального распада гликоконъюгатов. На каждом этапе образуются свободные олигосахариды со строго определенными структурами, характеризующими эти этапы. Все разнообразие гликановых структур можно объединить в две большие группы: нейтральные и отрицательно заряженные (Suzuki and Harada, 2014; Hirayama et al., 2010; Winchester, 2005). Свободные заряженные олигосахариды появляются при распаде гликоконъюгатов в лизосомно-эндосомной системе и являются естественными субстратами лизосомальной сиалидазы-1.

Лизосомальная сиалидаза или нейраминидаза 1 (ЕС 3.2.1.18) входит в состав мультиферментного комплекса с β -галактозидазой (ЕС 3.2.1.23) и так называемым защитным белком – сериновой карбоксипептидазой катепсином А (ЕС 3.4.16.5). Катепсин А обеспечивает молекулярный каркас, без которого комплекс не образуется, и защищает сиалидазу и β -галактозидазу от расщепления лизосомальными протеазами и, таким образом, играет роль шаперона по отношению к гликозидазам комплекса. Нейраминидаза активна в гетероолигомерной конфигурации, которую тоже обеспечивает катепсин А. β -Галактозидаза принимает участие в отщеплении остатков галактозы преимущественно от ганглиозидов и кератансульфатов. Мультиферментный комплекс имеет высокую нейраминидазную активность. Пептидазная и галактолидазная активности комплекса очень низкие (Bonten et al., 2014).

Свободные олигосахариды образуются внутри клеток, однако часть из них попадает в межклеточное пространство, а затем в кровь и мочу, где также обнаруживаются как нейтральные, так и заряженные структуры (Alonzi et al., 2008; Iwatsuka et al., 2013). Секреция заряженной фракции свободных олигосахаридов в кровь вероятнее всего обусловлена лизосомальным экзоцитозом.

Экзоцитоз секретирующих лизосом – сложный процесс, включающий несколько этапов: взаимодействие определенного пула лизосом с сетью микротрубочек цитоскелета, транспортировку их к плазматической мембране, освобождение от протеинов цитоскелета, стыковку, а затем слияние мембраны лизосомы с плазматической мембраной, что приводит к высвобождению лизосомального содержимого в межклеточное пространство (Stinchcombe and Griffiths, 2001). Лизосомы разных клеток содержат

секреторные белки, которые могут быть освобождены путем экзоцитоза в ответ на внешние стимулы, обеспечивая различные типы клеток широким диапазоном функциональных эффекторов (Stinchcombe et al., 2004). Кроме того, этот процесс играет фундаментальную роль как в физиологических, так и патологических процессах, включая восстановление и пополнение поврежденных плазматических мембран и ремоделирование внеклеточного матрикса (Bonten et al., 2014). Усиленный экзоцитоз обуславливает инвазию раковых клеток и их устойчивость к химиотерапии (Machado et al., 2015).

В предыдущих работах авторов (Pismenetska, 2012; Pismenetska and Butters, 2014a, 2014b) установлено, что ВЭЖХ-спектр заряженных свободных олигосахаридов специфически изменяется при хронических и острых миелопролиферативных заболеваниях крови. Задачей данной работы стал анализ молекулярно-клеточных механизмов этих изменений и проверка гипотезы о том, что они связаны с изменением активности лизосомальной нейраминидазы.

Материал и методы исследований

Плазма крови пациентов с диагностированными хроническими (истинная полицитемия, $n = 10$; идиопатический миелофиброз, $n = 10$) и острыми (острый лимфобластный лейкоз, $n = 2$; острый миеломонолейкоз, $n = 2$; острая фаза предлейкемического синдрома, $n = 2$) миелопролиферативными заболеваниями, а также практически здоровых доноров была отобрана с согласия всех групп в соответствии с требованиями приказа МОЗ Украины от 23.09.2009 г. № 690 о порядке проведения клинических испытаний в КП Днепропетровская городская многопрофильная клиническая больница № 4 и любезно предоставлена для исследований врачом Т.П. Николаенко-Камышовой. Средний возраст практически здоровых доноров ($n = 15$) соответствовал возрастной категории больных исследуемых групп и составлял $59,1 \pm 2,8$ года.

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

Удаление белков плазмы. Депротеинизацию нативной плазмы крови проводили путем осаждения белков 10% трихлоруксусной кислотой с последующим центрифугированием в течение 10 мин. при 3 000 об./мин. (Pismenetska, 2012). Остатки белков удаляли с помощью фильтра с гидрофильной полифлуороэтиленовой мем-

браной (Millex-LH, 0.45 μm , Millipore Corp., США), в соответствии с методикой Alonzi et al. (2008).

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

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

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

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

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

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

Результаты и их обсуждение

Исследовали олигосахариды, состоящие из четырех и более остатков моносахаридов, поэтому анализу подвергались хроматограммы на временном отрезке от 20 до 44 мин. (нижняя шкала на рисунках), что соответствует характеристикам пиков от 4 до 12 глюкозных единиц (верхняя шкала в ГЕ). ВЭЖХ-спектры заряженных свободных олигосахаридов в норме и при миелолиферативных процессах представлены на рисунке 1. В качестве контроля использовали спектр заряженной фракции свободных олигосахаридов плазмы крови практически здоровых доноров. Нумерация пиков на рисунках указана в соответствии с нумерацией общего пула свободных олигосахаридов. В состав заряженной фракции входит только часть пиков общего пула, поэтому нумерация на рисунках не сплошная.

В составе спектра заряженной фракции свободных олигосахаридов плазмы крови практически здоровых доноров (рис. 1, IA) выявлены семь пиков и подпиков: 1, 1a – 4,08 \pm 0,02 ГЕ, 2 – 4,28 \pm 0,02 ГЕ, 3 – 4,40 \pm 0,02 ГЕ, 5 – 5,17 \pm 0,03 ГЕ, 6b – 5,69 \pm 0,03 ГЕ, 10a – 8,62 \pm 0,04 ГЕ. Для более детального анализа гликаны фракции обрабатывали сиалидазой (рис. 1, IB). Оказалось, что остатки сиаловых кислот имели олигосахариды 3- и 10-го а пиков, так как после десилирования пик 10a полностью исчез, а площадь пика 3 уменьшилась, что позволило четче проявиться пикам 1a и 2. Вместо пика 10a появился пик 8. Для определения структуры пиков 10a и 8 полученные хроматограммы гликанов плазмы крови сравнивали с хроматограммами углеводов трансферрина до (рис. 1, IC) и после (рис. 1, ID) такой же обработки сиалидазой. Углеводы трансферрина представлены двумя главными структурами – двухантенными комплексными N-гликанами с одним и двумя остатками сиаловых кислот. После десилирования оба гликана превращаются в одну и ту же структуру – незаряженный двухантенный комплексный N-гликан. Полное совпадение позиций соответствующих пиков на хроматограммах гликанов сыворотки крови с реперными пиками внешнего стандарта позволило выяснить, что пик 10a представлен двухантенным комплексным N-гликаном с двумя остатками сиаловых кислот, а пик 8 – продукт его десилирования, представляющий собой двухантенный комплексный N-гликан без сиаловых кислот.

ВЭЖХ-спектры заряженной фракции гликанов плазмы крови больных хроническими миелолиферативными заболеваниями (истинной полицитемией – рис. 1, ПА и идиопатическим миелофиброзом – рис. 1, ПБ) включали те же семь пиков и подпиков, что и спектры в норме, но, кроме того, к ним добавились два дополнительных пика – подпик 7b и ярко выраженный пик 9. Этот пик обнаруживался во всех без исключения изученных образцах. В случае острых лейкозов (рис. 1, ПС) заряженная фракция представлена исключительно пиками 9 и 10a. Десилирование сиалидазой (рис. 1, ПА, В) и сравнение с гликанами трансферрина (рис. 1, ПС, D) подтвердило, что в случае хронических и острых миелолиферативных заболеваний пик 9 – это двухантенный комплексный N-гликан с одним остатком сиаловой кислоты, а 10a, как и в норме, представляет собой такой же тип гликана, но с двумя остатками сиаловых кислот.

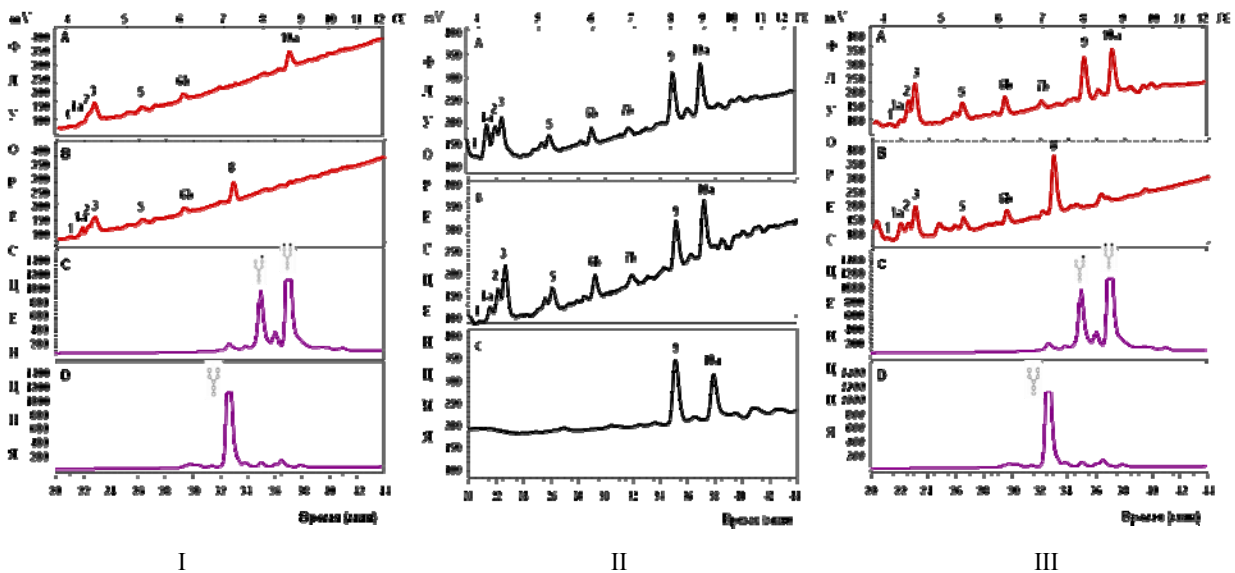


Рис. 1. ВЭЖХ-спектры заряженных свободных олигосахаридов плазмы крови: относительно здоровых доноров (I), больных истинной полицитемией (IIА), идиопатическим миелофиброзом (IIВ), острым лимфобластным лейкозом (IIС) и результат деградации сиалидазой заряженной фракции гликанов при идиопатическом миелофиброзе (III)

Таким образом, при хронических и острых лейкозах в заряженной фракции свободных олигосахаридов появляется промежуточный продукт дегликозилирования комплексных гликанов – двухантенный комплексный N-гликан с одним остатком сиаловой кислоты. В норме лизосомальная нейраминидаза-1 обеспечивает полное десиалирование и промежуточный продукт не образуется. Это говорит о снижении аффинности фермента к промежуточному субстрату и понижении активности сиалидазы.

Лизосомальная сиалидаза стабильна и каталитически активна исключительно в составе мультиферментного комплекса (Bonten, 2014). Такой комплекс может динамически собираться и разбираться с целью эффективной адаптации к соответствующим субстратам и условиям катализа. Этот механизм добавляет дополнительные уровни для регуляции активности отдельных белковых компонентов комплекса. Поэтому причины снижения каталитической активности следует искать в изменении структуры данного комплекса.

Активность сиалидазы-1 связана с интенсивностью лизосомального эндоцитоза. Далеко не все детали процесса лизосомального эндоцитоза изучены, но известно, что одним из его ключевых участников является ассоциированный с мембраной лизосом протеин 1 (lysosomal associated membrane protein 1, LAMP1). LAMP1 – трансмембранный белок, состоящий из люменальной N-концевой части, трансмембранного домена и короткой цитоплазматической C-последовательности из 12 аминокислот. Он отвечает за взаимодействие лизосом с цитоскелетом и стыковку лизосомальной мембраны с плазматической. Люменальная часть ассоциированного с мембраной лизосом протеина 1 сильно гликозилирована и содержит большое количество остатков сиаловых кислот. LAMP1 является субстратом лизосомальной нейраминидазы 1, которая отщепляет остатки сиаловых кислот и, таким образом, изменяет свойства ассоциированного с мембраной лизосом протеина 1, который в результате десиалирования теряет способность к участию в эндоцитозе. При низкой активности сиалидазы и гиперсиалиро-

вании LAMP1 эндоцитоз лизосом усиливается, а при повышении активности фермента и десиалировании LAMP1 эффективность эндоцитоза снижается. Таким образом, сиалидаза-1 является негативным регулятором лизосомального экзоцитоза за счет влияния на структуру углеводного компонента LAMP1 (Yogalingam et al., 2008).

Для оценки интенсивности экзоцитоза секретирующих лизосом проанализирован вклад заряженной фракции гликанов в общий пул свободных олигосахаридов плазмы крови и его изменение при миелопролиферативных заболеваниях.

Общая концентрация свободных олигосахаридов плазмы крови очень мала, составляла в норме 1909 ± 426 пкмоль/мл, в группе больных с истинной полицитемией – 2545 ± 292 пкмоль/мл, при идиопатическом миелофиброзе – 3219 ± 264 пкмоль/мл.

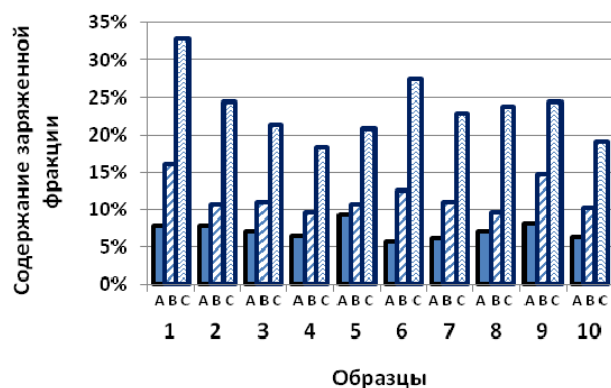


Рис. 2. Вклад (%) основных пиков заряженной фракции в общий пул свободных олигосахаридов плазмы крови практически здоровых доноров (А) и больных миелопролиферативными заболеваниями (В, С) по образцам: А – пик 10а в хроматограммах контрольной группы, В – пик 10а в хроматограммах группы больных миелопролиферативными заболеваниями, С – сумма пиков 9 и 10а в хроматограммах группы больных миелопролиферативными заболеваниями

В пике 10a сосредоточены почти все сиалирированные гликаны в норме. При миелолипролиферативных заболеваниях они распределены в основном в двух пиках: 9 и 10a. Поэтому измерялся вклад в общий пул свободных олигосахаридов именно этих пиков (рис. 2). Сравнение доли пика 10a в общем пуле свободных олигосахаридов сыворотки крови в контрольной группе и в группе больных миелолипролиферативными заболеваниями с высокой степенью достоверности ($P < 0,0001$) указывает на увеличение доли двухантенного комплексного N-гликана с двумя

остатками сиаловых кислот в плазме больных, т. е. на активацию лизосомального эндоцитоза. Так как в контроле 9-й пик в хроматограмме заряженных гликанов отсутствует, то различия в совокупном вкладе пиков 9 и 10a еще выше ($P < 1 \cdot 10^{-7}$).

Степень увеличения фракции заряженных свободных олигосахаридов плазмы крови у больных с лейкомиями более наглядно отражается в изменении показателя средних значений вклада главных пиков (рис. 3).

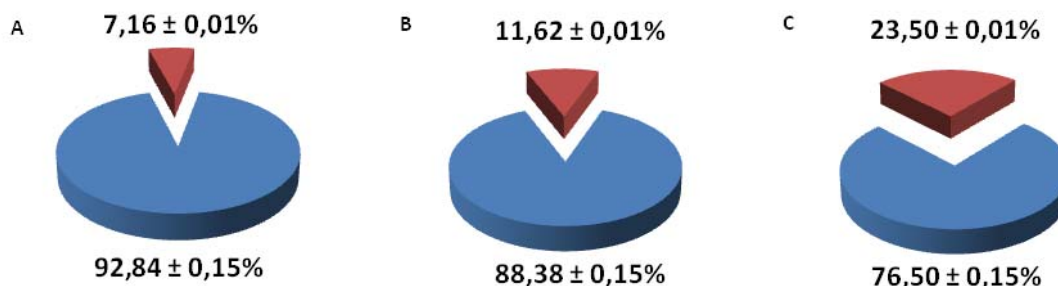


Рис. 3. Средние значения вклада основных пиков заряженной фракции в общий пул свободных олигосахаридов плазмы крови практически здоровых доноров (А) и больных миелолипролиферативными заболеваниями (В, С):

А – пик 10a в хроматограммах контрольной группы, В – пик 10a в хроматограммах группы больных,

С – сумма пиков 9 и 10a в хроматограммах группы больных

Полученные и представленные на диаграммах результаты указывают на то, что вне зависимости от общей концентрации свободных олигосахаридов плазмы крови секреция основных компонентов заряженной фракции – двухантенных N-гликанов комплексного типа – при лейкомиях достоверно повышается. При этом усиление секреции хорошо прослеживается не только на сумме моно- и дисиалирированных компонентов (рис. 3С, пики 9 и 10a вместе), но и только на дисиалирированных углеводах (рис. 3В, пик 10a).

Таким образом, изменение спектра заряженной фракции свободных олигосахаридов плазмы крови больных миелолипролиферативными заболеваниями происходит за счет понижения активности лизосомальной сиалидазы-1 и активации лизосомального эндоцитоза.

Исследования влияния нейраминидазы-1 на экзоцитоз секретирующих лизосом проводили на культурах клеток и нокаутированных животных. При этом использовали искусственные субстраты для определения активности фермента и искусственную модель (лизосомальная секреция частично гидролизованного декстрана) для измерения интенсивности экзоцитоза (Machado et al., 2015). Однако такие подходы не позволяют изучать реальные процессы *in vivo*. Для этого нужны естественные маркеры, которые отражают работу нейраминидазы-1 и одновременно вовлечены в процесс лизосомального экзоцитоза. В данной работе изменение активности фермента было впервые продемонстрировано на естественных субстратах *in vivo*.

Понимание физиологических процессов в биохимических и молекулярных деталях не только расширяет представление о патогенезе заболевания, но также позволяет выявить мишени для развития новых диагностических и прогностических инструментов, а также для создания новых терапевтических средств. Лизосомы являются ключевыми компонентами многих клеточных процессов,

которые делают их привлекательными в терапевтических целях. Современные экспериментальные стратегии воздействия на функции лизосом в ближайшее время позволят предложить практические протоколы мониторинга течения и лечения распространенных заболеваний, в том числе и онкологических (Appelqvist et al., 2013). Анализ заряженной (кислой) фракции свободных олигосахаридов плазмы крови может стать чувствительным и надежным инструментом изучения состояния лизосом пациентов при внедрении персонализированного лечения и инновационной терапии.

Выводы

В данной работе впервые получены доказательства изменения действия лизосомальной нейраминидазы-1 на группу естественных субстратов – свободных олигосахаридов – *in vivo* при острых и хронических миелолипролиферативных заболеваниях крови. Хроматографические спектры заряженных свободных олигосахаридов плазмы крови пациентов с острыми и хроническими онкогематологическими заболеваниями выявили понижение активности лизосомальной фракции нейраминидазы-1 и усиление лизосомального экзоцитоза. Хроматографические спектры заряженной фракции плазмы крови являются чувствительным параметром состояния лизосом в норме и при патологиях, что открывает новые перспективы их использования при разработке и мониторинге действия антираковых препаратов, направленных на блокирование работы лизосомно-эндосомной системы.

Благодарности

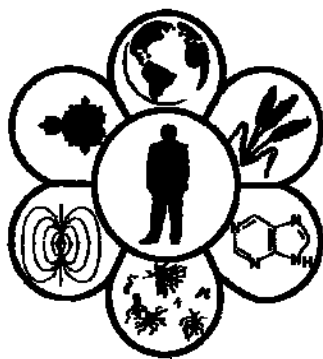
Работа выполнена при поддержке международных грантов International Union Against Cancer ICREET

(ICR/09/044), EMBO (ASTF201-2010) и Института гликобиологии Оксфордского университета (Оксфорд, Великобритания) в лаборатории доктора Терри Д. Баттерса (Terry D. Butters).

Библиографические ссылки

- Alonzi, D.S., Neville, D.C., Lachman, R.H., Dwek, R.A., Butters, T.D., 2008. Glucosylated free oligosaccharides are biomarkers of endoplasmic-reticulum alpha-glucosidase inhibition. *Biochem J.* 409(2), 571–580.
- Appelqvist, H., Wäster, P., Kagedal, K., Öllinger, K., 2013. The lysosome: From waste bag to potential therapeutic target. *J. Mol. Cell Biol.* 5(4), 214–226.
- Bonten, E.J., Annunziata, I., d'Azzo, A., 2014. Lysosomal multienzyme complex: Pros and cons of working together. *Cell Mol. Life Sci.* 71(11), 2017–2032.
- Hirayama, H., Seino, J., Kitajima, T., Jigami, Y., Suzuki, T., 2010. Free oligosaccharides to monitor glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 285(16), 12390–12404.
- Machado, E., White-Gilbertson, S., van de Vlekkert, D., Janke, L., Moshiah, S., Campos, Y., Finkelstein, D., Gomero, E., Mosca, R., Qiu, X., Morton, C.L., Annunziata, I., d'Azzo, A., 2015. Regulated lysosomal exocytosis mediates cancer progression. *Sci. Adv.* 1(11), e1500603.
- Neville, D.C., Coquard, V., Priestman, D.A., te Vruchte, D.J., Sillence, D.J., Dwek, R.A., Platt, F.M., Butters, T.D., 2004. Analysis of fluorescently labelled glycosphingolipid-derived oligosaccharides following ceramide glycanase digestion and anthranilic acid labelling. *Anal. Biochem.* 331, 275–282.
- Neville, D.C., Dwek, R.A., Butters, T.D., 2009. Development of a single column method for the separation of lipid- and protein-derived oligosaccharides. *J. Proteome Res.* 8, 681–687.
- Pismenetska, I.U., 2012. Vplyv immobilizatsii ta deproteinizatsii plazmy krovi na spectr vilnykh oligosakharydiv [Influence of blood plasma immobilization and deproteinization on the spectrum of free oligosaccharides]. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Series Biology* 60, 27–29 (in Ukrainian).
- Pismenetska, I.U., Butters, T.D., 2012. Analiz zariadzhenoї fraktsii vilnykh olihosakharydiv plazmy krovi praktychno zdorovykh donoriv [A structure prediction of blood plasma free oligosaccharides of practically healthy donors]. *Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University, Series Biology, Chemistry* 25, 159–165 (in Ukrainian).
- Pismenetska, I.U., Butters, T.D., 2014a. HPLC-spektry svobodnykh oligosaharidov plazmy krovi pri ostrykh onkogematologicheskikh zabolevaniyah [HPLC-profiles of plasma free oligosaccharides in acute hematologic malignancies]. *Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University, Series Biology, Chemistry* 27, 102–111 (in Russian).
- Pismenetska, I.U., Butters, T.D., 2014b. Dekodirovanie struktur svobodnykh oligosaharidov plazmy krovi bol'nykh hronicheskimi mieloproliferativnymi zabolevaniyami [Decoding the structures of plasma free oligosaccharides from patients with chronic myeloproliferative diseases]. *Laboratory Diagnostics. Eastern Europe* 27(3), 69–78 (in Russian).
- Stinchcombe, J., Bossi, G., Griffiths, G.M., 2004. Linking albinism and immunity: The secrets of secretory lysosome. *Science* 305(5680), 55–59.
- Stinchcombe, J.C., Griffiths, G.M., 2001. Normal and abnormal secretion by haemopoietic cells. *Immunology* 103(1), 10–16.
- Suzuki, T., Harada, Y., 2014. Non-lysosomal degradation pathway for N-linked glycans and dolichol-linked oligosaccharides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 453(2), 213–219.
- Winchester, B., 2005. Lysosomal metabolism of glycoproteins. *Glycobiology* 15(6), 1R–15R.
- Yogalingam, G., Bonten, E.J., van de Vlekkert, D., Hu, H., Moshiah, S., Connell, S.A., d'Azzo, A., 2008. Neuraminidase 1 is a negative regulator of lysosomal exocytosis. *Dev. Cell.* 15(1), 74–86.

Надійшла до редколегії 12.03.2016



UDC 612.821.35

Bioelectrical activity of the brain during performance of manipulative movements in women with different modal alpha-frequencies

A.G. Morenko

Lesia Ukrainka Eastern European National University, Lutsk, Ukraine

An important component of the general biological problem of coordinated activity of the brain's motor systems and of the executive apparatus during the implementation of motor functions is the question of the interconnection of electroencephalogram (EEG) rhythm characteristics, above all α -rhythm, with control peculiarities of manipulative movements (MM). A test group consisting of 113 healthy right-handed women from the ages of 19 to 21 was divided into two groups according to the average magnitude of their individual modal α -frequency – groups with high and low values of individual modal α -frequency (I α F). The ideal time of a simple sensorimotor reaction and choice-point behavior as well as speed capabilities of nervous processes during the finger tapping test, and measures of the power spectrum of EEG spectral components individually determined for each testee in quiescent intervals and while performing alternating movements by the fingers of the right hand were evaluated. Alternate female finger movements were accompanied by a decrease in the EEG α 2- and α 3-activities in the posterior cortical areas, and β 1- and γ -activities in the frontal, temporal and central areas of the cortex compared with the same in the immobile state; they were also characterized by the generalized growth of θ -oscillations and local (in the frontal leads) – α 1- and β 2-activities. Thus, in both groups of women surveyed the increase in activity of those cortical structures that ensure its implementation – sensory perception, motor start and motor programming commands and sense-motor coordination, was found. When MM are performed by women with a higher output α -frequency, they were characterized by more local changes in the electrical activity of the cerebral cortex. People with a lower modal α -frequency were characterized by somewhat less specific and differentiated features of the cortex activation. Alternating movements of fingers performed by women with low I α F were associated with higher EEG θ -, α 1-, α 2-activities, generally in the cortex, and α 3-, β - and γ -oscillations – in the posterior areas than in those with high I α F. Instead of this, a relatively lower power spectral EEG was recorded in the frontal leads of the range consisting of α 3-, β - and γ -oscillations. Intergroup differences found by us may indicate a higher status regarding a specific cortical tone, its readiness for activity and control of information processes in people with high I α F in comparison with those who had low I α F. It is natural that different levels of features of such activation systems achieve specific outcomes in testees with a different starting I α F. Women with a higher I α F had better speed characteristics of nervous processes.

Keywords: electroencephalogram; individual mode of the α -rhythm; female testees; finger movements

Біоелектрична активність мозку під час виконання маніпулятивної моторики у жінок із різною модальною альфа-частотою

A.G. Morenko

Східноєвропейський національний університет імені Лесі Українки, Луцьк, Україна

Обстежено 113 правопрофільних жінок віком 19–21 років, яких поділили на дві групи: з високими та низькими значеннями модальної альфа-частоти, визначеної індивідуально у стані спокою. Оцінювали час простої сенсомоторної реакції та реакції вибору, швидкісні можливості нервових процесів під час тепінг-тестування, показники спектральної потужності частотних компонентів електроенцефалограми обстежуваних у стані спокою, під час почергових рухів пальців правої руки. Жінки з високою модальною α -частотою мали кращі швидкісні характеристики нервових процесів. Почергові рухи пальців у жінок супроводжувалися зниженням потужності α 2- і α 3-активності задніх кортикальних ділянок, β 1- і γ -активності – лобових, скроневих і центральних ділянок порівняно зі спокоєм; характеризувалися генералізованим зростанням θ -коливань і локальним (у лобових відведеннях) – α 1- і β 2-активності. Для осіб із низькою модальною α частотою притаманні менш специфічні та диференційовані особливості активації кори. У жінок із низькою α частотою виконання почергових рухів пальцями пов'язане з вищою потужністю θ -, α 1-,

α_2 -активності загалом у корі, α_3 -, β - і γ -коливань – у задніх ділянках, ніж в осіб із високою α -частотою. Натомість у лобових відведеннях у діапазоні α_3 -, β - і γ -коливань реєстрували порівняно нижчу спектральну потужність електроенцефалограми.

Ключові слова: електроенцефалограма; індивідуальна мода альфа-частоти; тестовані жіночої статі; рухи пальців

Introduction

Movements by the upper extremities, particularly but not exclusively, by human fingers, form the basis of the manual movements in any labor activities. This or that person's individual functional capacities of the motor system acquire a critical score for successful learning of a wide range of trades in present-day society. For this purpose, the academic community places greater emphasis on issues dealing with the personality traits of the cerebral processes guaranteeing the motorial programming of manipulation movements (MM). Various aspects of the abovementioned problem were studied in the area of neurophysiology concerning motor activities (Sheth and Shimojo, 2002; Ioffe, 2003; Rhodes et al., 2004; Hatfield et al., 2005; Wise and Willingham, 2009; Grigal and Kurganskiy, 2010; Pavlovych et al., 2012; Cavallo et al., 2014). MM are obviously associated with significant alterations of the brain's activities ensuring the formation of the appropriate motor programs and orders. However, specific information concerning these processes in the cerebral cortex is still very limited. It is not improbable that certain performance measures of the cerebration correlated with MM – their amplitude, speed and accuracy, exist.

Scientists (Kristeva et al., 2005; Bazanova and Aftanas, 2007; Grandy et al., 2013; Morenko et al., 2014) found out that individual values of the amplitude-frequency characteristics of any α -rhythm, including the modal frequency of such a rhythm, demonstrate a significant informational content in determining the state of the main physiological functions of a person. According to the data of Kristeva et al. (2005), Bazanova and Aftanas (2007), the ideal coordination of processes organizing movements and capacity for censorship are positively correlated to the power of the individual EEG α -range and negatively to the tension of the muscles of the facial expression (forehead) being inactive during the MM autocinesia. These statements are study specific of the authors (Kaplan and Borisov, 2003; Angelakis et al., 2004; Anokhin et al., 2006; Begleiter and Porjesz, 2006; Klimesch et al., 2007) who consider the modal EEG α -frequency as rigidly determinate by a genetic trait inasmuch it reflects the essential innate peculiarities of the structural organization of any thalamic and cortical neurons (Page et al., 2006; Ng and Raveendran, 2007; Spergel, 2007).

Estimating the crucial importance of results obtained by different scientists, it is worth mentioning that such information is clearly inadequate for a thorough understanding of personality traits of the neurophysiological maintenance of the goal directed movements of any individual. Records are critically limited as to the way in which such an innate aspect of the mental functioning as a modal frequency of EEG α -rhythm deals with the activities regulating distal hand muscles during the execution of MM. The prognostic value of an individual's cerebral activities dealing with MM is marginally studied today. At the same time, the question of the interconnection of certain EEG rhythms characteristics, above all α -rhythm, with control peculiarities of distal movements of the upper limbs is an essential component of

the important general biological problems of coordinated activity of the brain's motor systems and of the activity of the executive apparatus during the implementation of motor functions.

With the aim of shedding light on such issues, we conducted a study of changes in the power spectrum of the EEG frequency components during the time of execution of alternating movements by fingers in men having some different modal alpha-frequencies (Morenko et al., 2014). According to the results obtained, all the men had the power reduction of θ -, α - and β_1 -waves, especially in the posterior cortical areas as well as some power growth of the EEG (θ - and α_1 -) low-frequency vibrations in the frontal area. However, men with a low mode of α -frequency had a lower power of the EEG α_1 -, β - and γ -activities in the frontal areas whilst the higher power of the EEG frequency components and generalization of such changes were found to be greater in the parietal, occipital, central and temporal lobes than in men with a higher modal α -frequency. Peculiarities of the cortical electrical activity determined in the flow of the regulation of the manipulation movements in men with a high mode of α -frequency were associated with relatively higher rates of the speed and accuracy of the sensorimotor responses. Taking into consideration the obtained results concerning men and the general scientific relevance of the gender flow phenomena of the cerebral activities particularly but not exclusively during MM, it is appropriate to carry out the relevant studies with the involvement of women as testees.

The goal of our research is to find out the specifics of the EEG power spectrum during the execution of alternating movements by fingers of women with higher and lower modal frequencies of the EEG α -rhythm, taking into account the prognostic value of the relevant data in the area of the speed capabilities of nervous processes.

Materials and Methods

The object of the study. The participants in our study were 136 female volunteers from the ages of 19 to 21, each of whom had given written consent. Biomedical ethics rules in accordance with the Helsinki Declaration of the World Medical Association on the Ethical Principles of Scientific and Medical Research involving Human Subjects were adhered to during the experiment. All the testees were judged by medical professionals to be healthy and have normal hearing. The survey of the women was conducted during the secretory phase of the menstrual cycle.

Psychophysiological examination. As part of the psychophysiological testing the profile of manual and auditory asymmetry was determined for each subject. It was determined by the nature of responses in the survey, execution of the motor and psychoacoustic tests and counting the individual ratio of the manual and auditory asymmetries (K skew) (form. 1) (Zhavoronkova, 2009):

$$K_{\text{skew}} = \frac{\sum_{\text{right}} - \sum_{\text{left}}}{\sum_{\text{right}} + \sum_{\text{left}}} \times 100\%$$

where Σ_{right} – the number of tasks where the right hand (right ear) is dominating during their execution, Σ_{left} – the number of tasks under which the left hand (left ear) is dominant.

Further studies involved dextral testees whose coefficients of manual and auditory asymmetries were positive and were above 50%. The total number of women was 113.

The level of speed properties of the testees' nervous processes was surveyed with a simple sensorimotor reaction taking into consideration time period and sensorimotor responses in the choice of one of three objects as signals (triangles, circles, squares). See the program "Diagnostician-1", Ukraine. All testees had to respond to the certain stimuli as quickly as possible by pressing a button with the right hand.

All examinations were performed in the morning. The profile of the asymmetry and time of simple and complicated sensory-motor reactions was evaluated 30 minutes before the EEG recording registration. It made it impossible to influence the experiment, particularly, on EEG results.

EEG testing procedures. The testees were in a quiescent state with their eyes closed and in a reclining position with their limbs relaxed and not crossed during the EEG testing. The experiment was carried out in a room which was sound-proof and light-proof. The whole experimental procedure consistently included the following steps for each testee:

Step 1. The EEG recording in the functional balance (background);

Step 2. The EEG recording while performing the alternate movements by fingers of the right hand.

Each step lasted 40 s. To exclude edge effects, the EEG recording registration was started 15 s after the beginning and had been stopped 5 s after its completion.

The testees performed finger movements one by one in the following order: forefinger – fourth finger – third finger – little finger. The sequence of movements was reported to the testees just before the test to minimise stereotyping of the task.

Movements of each finger involved its bending and unbending. Each finger flexion or extension was performed by the testees in response to the sound. The electronic version of a drum battle (the software of Finale 2006) was used for this purpose. Binaural stimuli were produced by four speakers placed in different corners of the room at the distance of 1.2 m from the testee's right or left ear. The stimulus duration was 130 ms; the playback sound volume did not exceed 55–60 dB at the outlet from the speakers under the measurements carried out by the sound level meter of the 'DE-3301' type (certificate of attestation # 025-2009, valid until 21.12.2014). Additionally, the sound loudness was individually regulated to ensure that each testee achieved the necessary level. The rate of the sound stimuli delivery was 2 c^{-1} . The choice of the relatively low acoustic stimulation was based on the fact that such frequency corresponds to the frequency range of the MM execution. Such a range is essentially determined by biomechanical movements implemented by the distal parts of the hand.

Registration and primary analysis of EEG data.

Active electrodes were placed in accordance with the international system 10/20 at nineteen points on the scalp of the head during the electroencephalogram (EEG "Neurocom", and the Certificate of State Registration # 6038/2007, valid until 18.04.2014) recording. The performance of the EEG recording was monopolar, with the

use of ear electrodes as a reference. The Fourier analysis era was 4 s with a 50% overlap. Duration of sample was 40 s. ICA-procedure analysis was used for the rejection of EEG anomalies.

The spectral power (μV^2) of the brain electrical activity in the θ -, α -, β - and γ -frequency intervals were also evaluated. Taking into consideration the functional heterogeneity of different sub-bands of the EEG α - and β -rhythms, the changes in the spectral power of each of them were considered.

The mode of the EEG α -rhythm spectral power was determined for each testee at each EEG lead and when they (testees) were motionless and had their eyes closed. Its value was averaged for all the leads; the value obtained was considered as an individual α -frequency for each testee ($I\alpha F$, Hz) (Klimesch et al., 2007; Angelakis et al., 2004). Any average value of the index was calculated for all the men and women.

Conditional distribution of the sample was taken into account. The testees, having the value of $I\alpha F$ less than average, belonged to the group of testees with a low $I\alpha F$. The testees, having value of $I\alpha F$ higher than average, joined the group of testees with a high $I\alpha F$, and additionally, the level of the value sustainability of the EEG individual α -frequency was identified for ten testees in quiescent intervals and according to the indicators of human memory registered in different days.

The EEG frequency interval limits were determined individually, relying on the value of the testee's $I\alpha F$. The following algorithm (Angelakis et al., 2004; Klimesch et al., 2007) was used and the truth of which was that the upper limit of $\alpha 3$ -subband was set to the right side of the $I\alpha F$ in increments of 2 Hz. It corresponded to the lower limit of the $\beta 1$ -band. The upper limit of the $\beta 1$ -sub-band was defined according to the standard concepts as 25 Hz. The lower limit of the $\alpha 2$ -band was determined in steps of 2 Hz to the left of the peak, and the $\alpha 1$ -band in 4 Hz steps, as well as θ -frequencies – in 6 Hz. Limits of $\beta 2$ - and γ -bands were recognized as standard, properly, 26–35 Hz and 36–45 Hz.

Statistical analyses. A statistical data analysis was performed by using the package Statistica 6.0 (Stat-Soft, 2001). Any normalcy of the data distribution in testees' subgroups was evaluated by means of the Shapiro-Wilks test (indicator SW). Since the distributions of our data were usually normal, we calculated the average values (M), standard deviation (σ) and error of average value ($\pm m$). $M \pm m$ is specified in the text and tables. To estimate the significance of differences existing in testees' subgroups, the Student's t -test was used between steps of testing both for independent equal samples and for dependent samples. Differences between testees' subgroups and among steps of testing were statistically considered significant at $P < 0.05$ and $P < 0.01$.

Results

The individual modal frequency evaluation of the α -EEG activity and individual limits of the frequency content of the EEG sub-range in the findings for female testees. The average value of the modal frequency of any α -activity in samples of female testees was 10.25 ± 0.03 Hz. Considering the leveled

nature of the individual α -frequency value histogram (Fig.1) in the female testees, the conditional distribution of samples was made under the average mean of the modal frequency of α -

activity. Two groups were formed, in particular, groups having a high value of $I\alpha F$ ($n = 59$, $I\alpha F \geq 10.25$ Hz) and groups with a low value of $I\alpha F$ ($n = 54$, $I\alpha F < 10.25$ Hz).

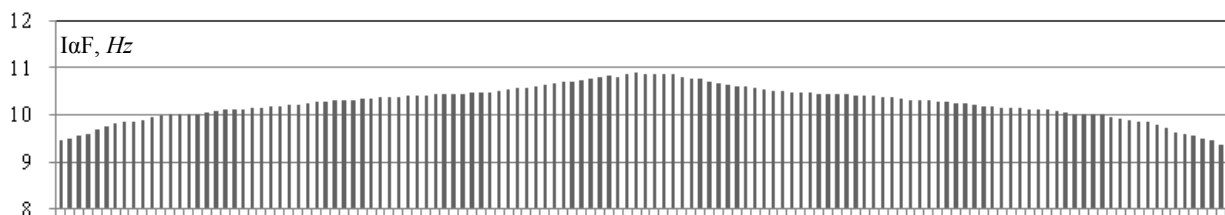


Fig. 1. Histogram of values of α -frequency mode in female testees:
vertical columns – individual values of the EEG α -frequency mode in samples involving female testees

Features of the output speed characteristics of the nervous processes in women with high and low $I\alpha F$. Women with a high $I\alpha F$ showed a shorter time for simple and complex reactions (Table).

Changes in spectral power while performing alternate finger movements in the testees' groups. Some decrease in the spectral power of the EEG especially in the posterior cortical areas, in $\alpha 2$ - ($P < 0.05$) and $\alpha 3$ -subranges ($P < 0.05 - < 0.01$) in comparison with the state of immobility (Fig. 2) was recorded in both female groups.

Table
Results of psycho-physiological tests characterizing time of simple and complex sensor and motor reactions in women

Value	Women	
	with high $I\alpha F$	with low $I\alpha F$
Simple Reaction Time, <i>ms</i>	253.4 ± 6.5	$322.5 \pm 6.6^{**}$
Selection Reaction Time, <i>ms</i>	378.3 ± 8.7	$435.7 \pm 9.4^{**}$

Note: ** – indicators of significant differences between the groups of the testees with a high and low $I\alpha F$, $P < 0.01$.

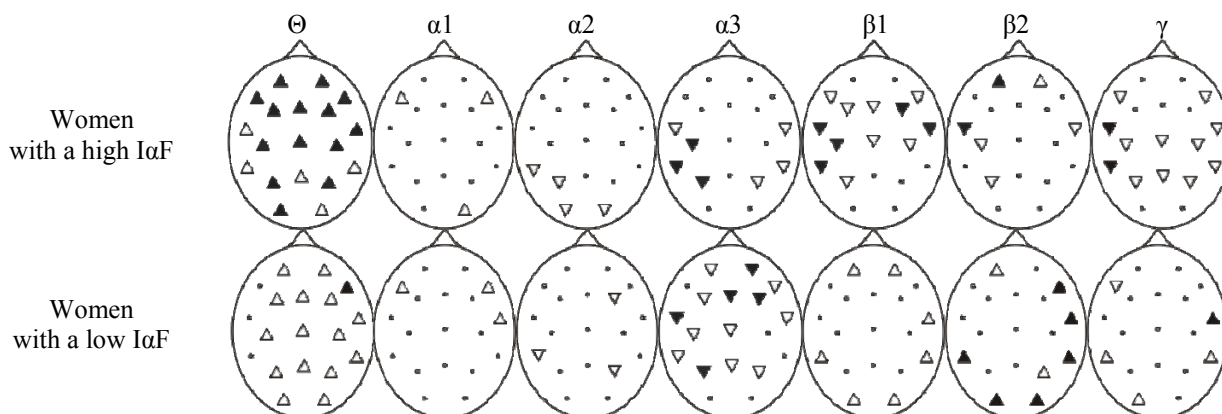


Fig. 2. Topo maps of changes in EEG spectral power fluctuations while performing alternate finger movements by female subgroups: Δ , \blacktriangle , ∇ , \blacktriangledown – increase (decrease) of power compared to power in a quiescent state, $P < 0.05$ (white triangle), $P < 0.01$ (black triangle)

Furthermore, women with higher $I\alpha F$ had the reduced spectral power of the $\beta 1$ - and γ -activities in the frontal, temporal and central areas of the cortex ($P < 0.05 - < 0.01$) compared to the state of immobility. Against the background of such changes in both female groups, there was found a generalized growth of spectral power of the EEG θ -oscillations ($P < 0.05 - < 0.01$). Such changes of the PS of the θ -activity were less significant ($P < 0.05$) in women with lower $I\alpha F$. The increase in spectral power of the $\alpha 1$ - and $\beta 2$ -activities ($P < 0.05$) was registered in the frontal areas (Fig. 2). Women with lower $I\alpha F$ had more generalized growth of β - and γ -activities and their power in the cortex ($P < 0.05 - < 0.01$).

Intergroup Differences. Women with lower $I\alpha F$ performing alternating movements with their right hand fingers had a higher θ -, $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - PS ($P < 0.01$) generally in the cortex, and $\alpha 3$ -, β - and γ -activities ($P < 0.05$) – in the posterior areas than women with higher $I\alpha F$. Instead of it, relatively low

EEG spectral power (Fig. 3) was registered in the frontal leads of the $\alpha 3$ -, β - and γ -oscillations ($P < 0.05 - < 0.01$).

Discussion

The aim of our study was to determine the characteristics of the EEG spectral power during the performance of successive movements by fingers of women with higher and lower modal frequencies of the EEG α -rhythm while taking into account the prognostic value of the relevant information in the speed of nervous processes.

Features of the output speed characteristics of the nervous processes in women indicate the higher speed capabilities of nervous processes in women with higher $I\alpha F$ compared with those with lower $I\alpha F$.

The implementation of the alternating movements by the right (dominant) hand was accompanied by a decrease of the

EEG spectral power in both groups of women, especially in the posterior cortical areas, in $\alpha 2$ - and $\alpha 3$ -subranges compared to the state of immobility. In our opinion and according to Buzsáki et al. (2006) Tebenova (2009), these effects may reflect the increase of activity in the cortical areas involved in the processes of sensory analysis, sensory-spatial attention, and the motor programming. At the same time, women with higher I α F had a reduction of the spectral power of the $\beta 1$ - and γ -activity in the frontal, temporal and central areas of the

cortex compared to the state of immobility. According to some authors, high-frequency electrical activity is modulated by the brain stem structures of the cortex, particularly the reticular formation (Revest et al., 1994; Boldyreva et al., 2000; Razumnikova et al., 2009). The latter creates a non-specific activation impact on the cortical processes and causes some high expression of EEG components. So, obviously, the pattern established by us is a manifestation of a certain decrease in the non-specific activation processes in this group of testees.

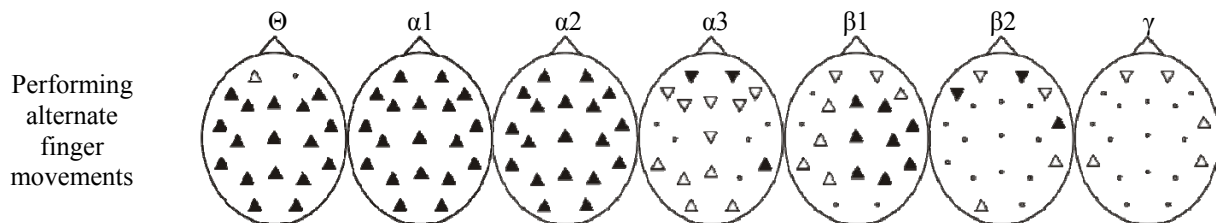


Fig. 3. Intergroup differences in spectral power of EEG fluctuations during performance of alternate finger movements by female subgroups: Δ , \blacktriangle , ∇ , \blacktriangledown – higher (lower) power in women with a low I α F in comparison with women with a high I α F, $P < 0.05$ (white triangle), $P < 0.01$ (black triangle)

Against the background of these changes, a generalized growth of the PS of the EEG θ -oscillations was revealed in women from both groups. According to scientists (Boldyreva et al., 2000; Pavlovych et al., 2012), it can be interpreted as a correlate strengthening of the emotional and motivational backgrounds being modulated by the limbic system. It should be emphasized that women with lower I α F had spectral power changes in the θ -activity of less significance. According to data from the literature (Klimesch et al., 2007), the increment in the $\alpha 1$ - and $\beta 2$ -activity of the frontal areas in all the women may reflect, on the one hand, the updating processes of the memory which allow a person to keep the necessary focus of sensory and motor information and manipulate it, but on the other hand, the increase in the power of $\alpha 1$ -oscillations in the frontal area ($P < 0.05$), may be associated with the increased selective attention as a mechanism to facilitate functioning of the active cortical structures. A more generalized growth capacity of the β - and γ -activity was recorded in the cortexes of women with lower I α F, which may be a nonspecific correlate enhancing the cortical activity (Pulvermuller et al., 1997).

According to sources in the literature (Klimesch et al., 2007; Razumnikova et al., 2009), higher θ -capacity and lower α -activity is associated with some decrease in the state of the readiness and maintenance of some attention and the decrease of the $\alpha 3$ -, β - and γ -oscillations in the frontal areas – with the organization of specific forms of attention necessary for higher cognitive functions. Then, the differences found by us in EEG frequency components of power between the groups of testees may indicate the status regarding a lower specific cortical tone, its readiness for any activity and control of information processes in testees with lower I α F compared with those testees with higher I α F. At the same time, higher PS in the posterior cortical areas in the high frequency ranges of the EEG ($\alpha 3$ -, β - and γ -) may indicate a predominance of the non-specific activation patterns in the reaction of encephalic processes (Pulvermuller et al., 1997; Boldyreva et al., 2000; Morenko et al., 2014).

Conclusions

The theoretical generalization of research results makes it possible to outline the features of the brain processes that were observed during the execution of successive finger movements initiated by the sensory signals in people with different modal frequencies of α -rhythm. Alternate female finger movements were accompanied by a decrease in the EEG $\alpha 2$ - and $\alpha 3$ -activities in the posterior cortical areas, and $\beta 1$ - and γ -activities in the frontal, temporal and central areas of the cortex compared with the same in the immobile state; they were also characterized by the generalized growth of θ -oscillations and local (in the frontal leads) – $\alpha 1$ - and $\beta 2$ -activities. Thus, in both groups of women surveyed an increase in activity of those cortical structures that ensure its implementation – sensory perception, motor start and motor programming commands and a sense-motor coordination, was found. When MM were performed by women with higher output α -frequency, they were characterized by more local changes in the electrical activity of the cerebral cortex. People with lower modal α -frequency were characterized by somewhat less specific and differentiated features of the cortex activation. Alternating movements of fingers performed by women with lower I α F were associated with higher EEG θ -, $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -activities, generally in the cortex, and $\alpha 3$ -, β - and γ -oscillations – in the posterior areas than in those with higher I α F. Instead of this, a relatively lower power spectral EEG was recorded in the frontal leads of the range consisting of $\alpha 3$ -, β - and γ -oscillations. Intergroup differences found by us may indicate a higher status regarding a specific cortical tone, its readiness for activity and control of information processes in people with higher I α F in comparison with those who had lower I α F.

A different level of features of such activation systems is natural for achievement of specific outcomes in testees with a different starting I α F. Women with higher I α F had better speed characteristics of nervous processes.

The results of the study indicate that the value of a female α -frequency mode determined in the state of the immobility may have a prognostic value with regard to the reaction of cortical processes during performance of alternating movements by the fingers.

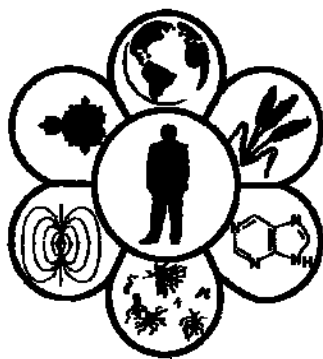
Acknowledgments

This research has been conducted under the frame of the science topic of the Biological Faculty of Lesia Ukrainka Eastern European National University – “Neurophysiological mechanisms of sensorimotor organization and system of human (age and sexual aspects)”, No 0111U002143 (2009–2011).

References

- Angelakis, E., Lubar, J.F., Stathopoulou, S., Kounios, J., 2004. Peak alpha frequency: An electroencephalographic measure of cognitive preparedness. *Clin. Neurophysiol.* 115, 887–897.
- Anokhin, A., Muller, V., Lindenberger, U., Heath, A., Myers, E., 2006. Genetic influences on dynamic complexity of brain oscillations. *Neurosci Lett.* 397, 93–98.
- Bazanov, O.M., Aftanas, L.I., 2007. Individualnye pokazateli alfa-aktivnosti elektroencefalogramy i neverbalnaja kreativnost [Individual alpha activity of electroencefalogram and nonverbal creativity]. *Russ. Fiziol. Zh. im. I. M. Sechenova* 93(1), 14–26 (in Russian).
- Begleiter, H., Porjesz, B., 2006. Genetics of human brain oscillations. *Int. J. Psychophysiol.* 60(2), 162–171.
- Boldyreva, G.N., Sharova, Y.V., Dobronravova, I.S., 2000. Rol' regulatorynyh struktur mozga v formirovanii EEG cheloveka [Regulatory role in the formation of structures in the brain EEG]. *Fiziol. Cheloveka* 26(5), 19–34 (in Russian).
- Buzsáki, G., 2006. *Rhythms of the Brain*. Oxford University Press, New York.
- Cavallo, A., Catmur, C., Sowden, S., Iani, F., Becchio, C., 2014. Stopping movements: When others slow us down. *European J. Neurosci.* 40(5), 2842–2849.
- Grandy, T.H., Werkle-Bergner, M., Chicherio, C., Schmeidek, F., Lövdén, M., Lindenberger, U., 2013. Peak individual alpha frequency qualifies as a stable neurophysiological trait marker in healthy younger and older adults. *Psychophysiol.* 50, 570–582.
- Grigal, P.P., Kurganskiy, A.V., 2010. Napravlennyye kortiko-kortikalnyye funktsionalnyye vzaimodejstviya na rannih stadijah serijnogo naucheniya u vzroslyh i detej semi-vosmi let [Directed corticocortical functional connectivity at the early stages of serial learning in adults and seven- to eight-year-old children]. *Fiziol. Cheloveka* 36(4), 408–419 (in Russian).
- Hatfield, B.D., Haufler, A.J., Hung, T.M., Spalding, T.W., 2004. Electroencephalographic studies of skilled psychomotor performance. *J. Clin. Neurophysiol.* 21(3), 144–156.
- Ioffe, M., 2003. Mozgovyye mehanizmy formirovaniya novykh dvizheniy pri obuchenii: Evoljutsiya klassicheskikh predstavleniy [Neural basis of learning new movements: Evolution of classical concepts]. *I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity* 53(1), 5–21 (in Russian).
- Kaplan, A.Y., Borisov, S.V., 2003. Dynamika segmentnykh harakteristik alfa-aktivnosti EEG cheloveka v pokoje i pri kognitivnykh nagruzkah [Dynamic properties of segmental characteristics of EEG alpha activity in rest conditions and during cognitive tasks]. *I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity* 53(1), 22–32 (in Russian).
- Klimesch, W., Sauseng, P., Hanslmayr, S., 2007. EEG alpha oscillations: The inhibition-timing hypothesis. *Brain Res. Rev.* 53, 63–88.
- Kristeva, R., Chakarov, V., Losch, F., Hummel, S., Popa, T., Schulte-Mönting, J., 2005. Electroencephalographic spectral power in writer's cramp patients: Evidence for motor cortex malfunctioning during the cramp. *NeuroImage* 27(3), 706–714.
- Morenko, A.G., Tsjos, A.V., Kotsan, I.Y., 2014. Features of the cortical activity of men having a high or low alpha-frequency background of the EEG while performing alternate finger movements. *Health Problems of Civilization* 8(1), 24–31.
- Ng, S.C., Raveendran, P., 2007. EEG peak alpha frequency as an indicator for physical fatigue. *Medicon* 16, 517–520.
- Page, A.J., O'Donnell, T.A., Blackshaw, L.A., 2006. Inhibition of mechanosensitivity in visceral primary afferents by GABA(B) receptors involves calcium and potassium channels. *Neurosci.* 137(2), 627–636.
- Pavlovych, O.S., Morenko, A.G., Kotyk, O.A., Vlasjuk, S.S., 2012. Cortical arousal strategies in left-handers during the aural perception and manual playback of mono and polyphonic rhythmical patterns. *Journal of Life Sciences* 6(12), 1408–1413.
- Pulvermuller, F., Birbaumer, N., Lutzenberger, W., Mohr, B., 1997. High-frequency brain activity: Its possible role in attention, perception and language processing. *Prog. Neurobiol.* 52(5), 427–445.
- Razumnikova, O.M., Tarasova, I.V., Volf, N.V., 2009. Osobennosti aktivnitsii kory u lic s vysokoy i nizkoj verbalnoj kreativnostju: Analiz alfa-1, -2 ritmov [Features of cortical activation in individuals with high and low verbal creativity: an analysis of the alpha-1, -2 rhythms]. *I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity* 59(5), 581–586 (in Russian).
- Revest, P.A., Jones, H.C., Abbott, N.J., 1994. Transendothelial electrical potential across pial vessels in anaesthetised rats: A study of ion permeability and transport at the blood-brain barrier. *Brain Res.* 652(1), 76–84.
- Rhodes, B., Bullock, J., Verwey, W.B., Averbec, B.B., Page, M.P.A., 2004. Learning and production of movement sequences: Behavioral, neurophysiological and modeling perspectives. *Hum. Movement Sci.* 23(5), 699–746.
- Sheth, B.R., Shimojo, S., 2002. How the lack of visuomotor feedback affects even the early stages of goal-directed pointing movements. *Exp. Brain Res.* 143(2), 181–190.
- Spergel, D.J., 2007. Calcium and small-conductance calcium-activated potassium channels in gonadotropin-releasing hormone neurons before, during, and after puberty. *J. Endocrinol.* 148(5), 2383–2390.
- Tebenova, K.C., 2009. Izuchenije bioelektricheskoy aktivnosti mozga operatorov telefonnykh stantsiy [The study of brain bioelectrical activity of telephone station operators]. *Sovremennyya Problemy Nauki i Obrazovaniya* 4, 138–141 (in Russian).
- Wise, S.P., Willingham, D.T., 2009. Motor skill learning. In: Squire, L.R. (ed.). *Encyclopedia of Neuroscience*. Academic Press, Oxford. Vol. 5, pp. 1057–1066.
- Zhavoronkova, L., 2009. Pravshy-Levshy. Mezhpolutsharnaja asimetriya biopotentsyalov mozga cheloveka [Right-handed and Left-handed: Hemispheric asymmetry of brain potentials of man]. *Press Ekoinvest, Krasnodar* (in Russian).

Надійшла до редколегії 14.03.2016



Зміст

Харів М.І. Динаміка активності амінотрансфераз сироватки крові щурів за оксидативного стресу та дії ліпосомального препарату	3
Мартышук Т.В. Вплив оксидативного стресу на систему антиоксидантного захисту організму щурів	8
Дейнега А.О., Лесова В.О., Анацький А.С. Оцінка ефективності використання ферментного препарату «Целовіридин Гх20» у складі кормів для годівлі свиней	13
Третьяк Т.О., Севериновська О.В., Бойко М. Зв'язок успішності навчання та когнітивних здібностей студентів із психофізіологічними особливостями	18
Паронік, В.А. Шаульська О.Е., Дяченко Л.М., Шевцова А.І. Вплив кардіопротекторів на протеазно-інгібіторний потенціал крові та серця щурів з адреналін-індукованою ішемією міокарда	27
Аль-Маалі Г.А., Бісько Н.А., Остапчук А.М. Вплив сульфатів та цитратів металів на вуглеводний склад біомаси лікарського гриба <i>Trametes versicolor</i> (Polyporales, Polyporaceae)	32
Комшук Т.С. Морфологічні паралелі зв'язків між структурами циркумвентрикулярної системи в осіб юнацького віку	37
Иванченко Е.З. Роль опорної функції нижніх кінечностей в премоторних изменениях Н-рефлекса камбаловидной мускулатуры	43
Соколенко В.Л., Соколенко С.В. Вплив помірних фізичних навантажень на показники імунної системи у мешканців радіаційно забруднених територій	48
Жалко-Титаренко В.П., Синетар Е.О., Савощенко С.І. Біотехнологічна характеристика катетеризованих сечовивідних шляхів як проточної системи	53
Письменецкая И.Ю., Баттерс Т.Д. Молекулярно-клеточные механизмы изменения спектра заряженной фракции свободных олигосахаридов плазмы крови при миелолипролиферативных заболеваниях	59
Моренко А.Г. Біоелектрична активність мозку під час виконання маніпулятивної моторики у жінок із різною модальною альфа-частотою	65

Content

Khariv M. Dynamics of indices of aminotransferase activity in the blood serum of rats under conditions of oxidative stress and effect of liposomal medicinal product	3
Martyshuk T.V. The influence of oxidative stress on the state of the antioxidant defense system in the organism of rats	8
Dejnega A.O., Lesova V.O., Anatsky A.S. Evaluation of efficiency of using the enzyme preparation «Celloviridin Dx20» in the content of pig feed	13
Tretiak T.O., Severynovska O.V., Boyko M. Connection of students' academic performance and cognitive abilities with their psychological characteristics	18
Paronik V., Shaul's'ka O., Diachenko L., Shevtsova A. The effect of cardioprotectors on protease-inhibitory potential in blood and heart of rats with epinephrine-induced myocardial ischemia	27
Al-Maali G.A., Bisko N.A., Ostapchuk A.M. The effect of citrate and sulfate of different metals on carbohydrates composition of medicinal mushroom <i>Trametes versicolor</i> (Polyporales, Polyporaceae)	32
Komshuk T.S. Morphological parallels of communications between the circumventricular system in adolescents	37
Ivanchenko E.Z. The role of the supporting lower limb function in the premotor changes in the H-reflex of <i>m. soleus</i>	43
Sokolenko V.L., Sokolenko S.V. Influence of moderate physical load on parameters of the immune system among residents of contaminated areas	48
Zhalco-Tytarenko V.P., Synetar E.A., Savoschenko S.I. Biotechnological characteristic of catheterized urinary tract as flow system	53
Pishmenetskaya I.U., Butters T.D. Molecular and cellular mechanisms of profile changes of charged blood plasma free oligosaccharides in myeloproliferative disorders	59
Morenko A.G. Bioelectrical activity of the brain during performance of manipulative movements in women with different modal alpha-frequencies	65